

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación *in vitro* e *in silico* de la actividad citotóxica de una librería de diterpenos de origen marino

Abel Mateo Forero Tunjano

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2019

Evaluación *in vitro* e *in silico* de la actividad citotóxica de una librería de diterpenos de origen marino

Abel Mateo Forero Tunjano

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister
en Ciencias Farmacéuticas

Director:

PhD. Freddy Alejandro Ramos Rodríguez

Codirector:

PhD. Fabián H. López Vallejo

Línea de Investigación: Química medicinal

Grupo de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Grupo de investigación en química de productos naturales vegetales bioactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2019

Self-discipline is a form of freedom. Freedom from laziness and lethargy, freedom from the expectations and demands of others, freedom from weakness and fear – and doubt. Self-discipline allows a person to feel his individuality, his inner strength, his talent. He is the master of, rather than a slave to, his thoughts and emotions

H. A. Dorfman

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, de la cual recibí toda mi formación tanto profesional como investigativa, en los niveles de pregrado y posgrado. Especialmente al Departamento de Farmacia quien me entregó una gran cantidad de herramientas para formarme como profesional y al Departamento de Química en donde desarrollé todo mi trabajo investigativo.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional, por la Beca Auxiliar Docente durante todo mi proceso de formación en la maestría.

A la Dirección de Investigación y Extensión de la sede Bogotá (DIEB) por la financiación del proyecto 45403.

A la profesora Luzineide Tinoco de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ) en Rio de Janeiro, Brasil, quien fue la persona que con su gran pasión y amor por la ciencia me permitió conocer y adentrarme en el mundo de la RMN. Su buena disposición y gran conocimiento siempre estuvieron disponibles para mi durante mi estancia en su laboratorio. Así mismo a los profesores Carlos Jiménez y Jaime Rodríguez de la Universidade da Coruña (UDC), por su acogida en su laboratorio para llevar a cabo una gran cantidad de trabajos investigativos que en su momento se veían inalcanzables pero gracias a su generosidad y disposición absoluta se lograron contra todo pronóstico. A pesar del corto tiempo que compartí con ustedes aportaron de manera significativa a mi formación profesional y personal. A los integrantes del grupo de investigación QUIMOLMAT (UDC, España), quienes fueron mi compañía por un tiempo, en especial a Diana Martínez con quien hicimos clic desde el primer momento en que nos conocimos y por ser la mejor compañera de trabajo y de fiesta.

A mis padres Luz Dary y José, por su apoyo incondicional siempre, por permitirme crecer, soñar y realizarme en muchos aspectos de la vida, por recordarme que no hay mejor lugar que el hogar y que frente a todas las adversidades por más complejas que sean hay que sobreponerse y salir adelante como siempre lo han hecho ustedes dos a lo largo de su vida.

Al profesor Leonardo Castellanos, por todo su apoyo y la confianza depositada, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y por ser un referente profesional de lo que algún día me gustaría ser. Espero haberlo representado bien con Carlos y Jaime, pues para mi fue un honor que en ocasiones pusieran mi trabajo a su nivel.

Al profesor Freddy Alejandro Ramos, por su invaluable orientación y por creer en mí. Por exigirme siempre el nivel más alto, por ayudarme a cumplir sueños durante estos 4 años, por la excelente formación investigativa que me brindo, por llevarme por diferentes caminos de la investigación en productos naturales y ponerme tareas varias siempre. Además me dio la oportunidad de ser su amigo y acompañarlo tanto en momentos buenos y malos. Sé con certeza que seremos amigos hasta que la vida lo permita.

Al profesor Fabián López, por su excelente disposición y generosidad conmigo es una de las mejores personas que pude conocer durante este camino. Siempre su punto de vista, criterio y opinión eran uno de los más importantes para mí.

Al profesor Adrián Sandoval, por todo su apoyo en la realización de los ensayos biológicos sus aportes fueron de gran ayuda para poder llevar a cabo este trabajo.

Al grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia”, que se convirtió en mi hogar durante los últimos años y en cuyas instalaciones se desarrolló este trabajo.

A todos los marineros pasados y presentes: Luz Adriana Betancur y Sandra Naranjo con quienes fueron innumerables las horas de trabajo fuerte que compartimos pero así mismo me convertí en su hijo del doctorado y ustedes en mis madres adoptivas. Farja Isabel Ayala, una excelente compañera de trabajo y amiga nunca un día de trabajo a su lado fue

aburrido. Srta Adriana Romero, Carolina Meneses, Sandra Molina, Fabián Amaya, Diana Vinchira, Carlos Andrés, Paola Martínez, Juan David Cárdenas. Ustedes hicieron que cada día de trabajo fuera como estar en casa, he aprendido demasiado de todos.

A Paula Michelle Sepúlveda, porque comenzamos un camino hace 7 años y afortunadamente nuestros caminos se cruzaron. Eres sin lugar a dudas una de las personas más importantes de mi vida.

A Simón por ser una persona incondicional siempre y es de los grandes amigos que me deja la Universidad.

A mis amigos (casi hermanos) Daniela y Nicolás con quienes son innumerables los momentos compartidos gracias por permitirme ser parte de sus vidas y siempre estar ahí de manera incondicional.

A mis abuelos y demás familia por siempre creer en mí.

A Jota, porque en definitiva es una persona fundamental y completamente importante en mi vida.

A Stefa, por ser mi soul mate en definitiva somos almas gemelas y en ti encuentro un refugio y un lugar donde podemos ser nosotros mismos, cada momento que compartimos es reconfortante para nuestras vidas. Y sin importar lo lejos que estemos el uno del otro hasta allá llegaremos.

Gracias a todos los que fueron artífices de este proyecto.

.

Resumen

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por un crecimiento descontrolado de células anormales y la colonización otros tejidos, que puede resultar en la muerte del paciente. Estas enfermedades tienen una alta prevalencia, incidencia y mortalidad a nivel mundial. Actualmente, existe un gran arsenal terapéutico para el tratamiento de estas enfermedades, sin embargo existe una necesidad constante de buscar compuestos nuevos y con mayor efectividad en la terapéutica de esta patología.

Dentro de los compuestos de origen natural, que se han caracterizado por ser buenos agentes citotóxicos, los diterpenos han mostrado ser uno de los metabolitos especializados con mayor potencial para el tratamiento del cáncer. Los organismos marinos, como los octocorales y las algas, son una fuente prolífica de diterpenos, convirtiéndolos en una fuente rica de agentes antitumorales.

Como parte de los estudios llevados a cabo al interior del grupo de investigación Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia, sobre los diterpenos aislados de octocorales, en este trabajo se evaluó la actividad citotóxica de una librería compuesta por 32 miembros, de origen tanto natural como semisintético, frente a tres líneas celulares de cáncer humano, A549 (cáncer de pulmón), MCF7 (adenocarcinoma de mama) y PC3 (cáncer de próstata) a través del ensayo de viabilidad celular MTT. Así, se seleccionaron tres diterpenos con actividad citotóxica frente a las tres líneas celulares, los compuestos **1**, **17** y **26**, quienes presentaron valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) menores a 30 μ M.

Para determinar si los compuestos activos son inductores de la apoptosis o de necrosis, se evaluó el tipo de efecto citotóxico a través del uso de ensayos de citometría de flujo empleando los fluorocromos Anexina V y 7AAD. Se evaluaron las concentraciones IC₂₅, IC₅₀ y IC₇₅ de cada uno de los compuestos frente a línea celular A549. A través del análisis

de la población celular positiva para cada uno de los fluorocromos se determinó que los tres compuestos fueron inductores de la apoptosis en esta línea celular.

Posteriormente, para determinar si la inducción de la apoptosis observada es a través de un efecto antimitótico, se evaluó la interacción de los tres ligandos con la tubulina por RMN. Esto fue llevado a cabo, a través del experimento STD, donde fue posible determinar los epítomos de unión de cada uno de los ligandos. Adicionalmente, a través de medidas de los tiempos de relajación T_1 y T_2 y del coeficiente de difusión se caracterizó completamente la interacción observada en el experimento STD.

Finalmente, un estudio computacional que incluyó estudios de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular en los sitios de unión del taxol y la colchicina fue llevado a cabo para establecer un modelo de unión ligando-receptor. Con esto se logró proponer que estos ligandos interactúan con la tubulina en el sitio de unión del taxol, encontrando interacciones con residuos clave de este sitio de unión, como la Thr276, His229 y Arg284. Así mismo, estas interacciones fueron observadas a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular indicando una alta estabilidad en este sitio de unión.

De esta manera, este estudio se presenta como punto de partida para la identificación y optimización de los diterpenos de origen marino seleccionados, con el objetivo de mejorar sus propiedades antitumorales. También se resalta el poder que tienen la integración de estudios de interacción por RMN, con ensayos de actividad biológica *in vitro* y predicciones computacionales en la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral.

Palabras clave: Cáncer; Apoptosis; Tubulina; Diterpenos; RMN; STD, Tiempos de relajación T_1 y T_2 , Docking molecular, Dinámica Molecular.

Abstract

Cancer is a group of diseases characterized by the uncontrolled growth and spread of abnormal cells to other tissues, that can result in the death of the patient. These diseases have a high prevalence, incidence and mortality worldwide. Currently there is a large therapeutic arsenal for the treatment of these diseases, however there is a constant need for new and more compounds for the effective treatment of these diseases.

Among the compounds from natural origin, diterpenes have proved to be useful for the treatment of cancer. Marine organisms, such as octocorals and algae, have been described as prolific producers of these diterpenes, making them a rich source of antitumor agents. As part of the studies made by the research group Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia, on the diterpenes isolated from octocorals, the cytotoxic activity of a library composed of 32 members, of both natural and semi-synthetic origin, was evaluated against three human cancer cell lines, A549 (lung cancer), MCF7 (breast adenocarcinoma) and PC3 (prostate cancer) through the MTT cell viability assay. From these, three diterpenes with cytotoxic activity were selected by its activity against the three cell lines here evaluated, namely compounds **1**, **17** and **26**, whose presented values of inhibitory concentration 50 (IC_{50}) lower than 30 μ M.

In order to establish if the active compounds are apoptosis or necrosis inducers, the type of cytotoxic effect was evaluated through flow cytometry analysis using the Annexin V and 7AAD fluorochromes. The inhibitory concentrations IC_{25} , IC_{50} and IC_{75} of each compound were evaluated against the cell line A549. Through the positive cell population analysis of each fluorochrome, it was possible to determine that the three compounds are apoptosis inducers in this cell line.

Then, in order to determine if the observed apoptosis was generated by an antimetabolic effect, the interaction with tubulin of the three ligands was assessed by an NMR study. With the STD experiment it was possible to determine the binding epitopes of each ligand, and the relaxation measurements T_1 and T_2 , along with diffusion measurements allowed completing the characterization of the interaction observed on the STD experiment.

Finally, a computational study using molecular Docking and molecular dynamics simulations at the binding sites of taxol and colchicine was carried out to establish a ligand-receptor model. These computational methods allowed proposing that the ligands interact with tubulin in the binding site of taxol by the observed interactions with key residues in this binding site, such as Thr276, His229 and Arg284. Likewise, these interactions were observed throughout the molecular dynamics simulations indicating a high stability in this binding site.

Finally, this study represents a starting point for the identification and optimization of selected marine diterpenes, with the aim of improving their antitumor properties. In addition, the power of the integration of NMR interaction studies, with *in vitro* and computational predictions in the search for compounds with antitumor activity is also highlighted in this work.

Keywords: Cancer; Tubulin; Apoptosis; Diterpenes; NMR; STD NMR; Relaxation times T_1 and T_2 ; Molecular Docking; Molecular dynamics.

Contenido

	Pág.
1. Integración de experimentos de RMN, métodos computacionales y ensayos de actividad biológica para la evaluación de la actividad citotóxica de una librería de diterpenos marinos	5
1.1 Aspectos teóricos y estado del arte	5
1.1.1 Una mirada hacia el cáncer	5
1.1.2 Muerte celular	8
1.1.3 Diterpenos y el cáncer	12
1.1.4 Métodos para la evaluación de la actividad citotóxica	19
1.1.5 Búsqueda racional de agentes terapéuticos	20
1.1.6 Métodos computacionales aplicados en el descubrimiento de fármacos	22
1.1.7 RMN en el descubrimiento de fármacos	25
2. Resultados y discusión	37
2.1 Construcción de la librería de diterpenos de origen marino	37
2.2 Evaluación de la actividad citotóxica de la librería de diterpenos.....	43
2.3 Estudio del proceso de muerte celular.....	46
2.4 Estudio de la interacción por RMN de los compuestos activos con el blanco molecular tubulina.....	53
2.5 Estudios de acoplamiento molecular de los ligandos 1, 17 y 26 con la tubulina	64
2.6 Simulaciones de dinámica molecular.....	72
3. Conclusiones y recomendaciones.....	81
4. Materiales y métodos	83
4.1 General	83
4.2 Ensayos de viabilidad celular	83
4.3 Caracterización del proceso de muerte celular	84
4.4 Preparación de las muestras para los análisis por RMN.....	85
4.5 Experimentos de STD para la determinación de la interacción de los compuestos activos con la tubulina.....	85
4.6 Caracterización de la interacción ligando-tubulina a través de medidas de relajación	86
4.7 Medidas de difusión para la estimación de la constante de disociación (K_D)	86
4.8 Acoplamiento molecular	87
4.9 Simulaciones de dinámica molecular.....	88
5. Referencias.....	89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Número de nuevos casos y muertes para ambos sexos reportados en el año 2018. Tomado de GLOBOCAN 2018 [1]	6
Figura 1.2 Transición de una lesión precancerosa a un cáncer invasivo. Tomado de The Making of a PreCancer Atlas: Promises, Challenges, and Opportunities 2018 [20].	8
Figura 1.3 Apoptosis extrínseca e intrínseca. La apoptosis extrínseca es mediada por estímulos externos y la interacción con receptores de muerte celular, para la activación de las caspasas 8 y 10, y posteriormente activación de los efectores de la apoptosis. La apoptosis intrínseca por otro lado es inducida por alteraciones intracelulares, que perturban la membrana externa de la mitocondria, activan la caspasa 9 y finalmente las caspasas 3, 6 y 7 (efectores). Tomada de [30].....	9
Figura 1.4 Estructuras químicas del triptolido (A) y su derivado minnelido (B).....	14
Figura 1.5 Estructuras químicas del paclitaxel (A) y la eleuterobina (B).....	14
Figura 1.6 Proporción de actividades biológicas por tipo de compuestos aislados de organismos marinos [89].	16
Figura 1.7 Algunos núcleos estructurales de diterpenos con actividad citotóxica. (A) cembranos, (B) dollabelanos, (C) briaranos, (D) xenianos y (E) guaianos.....	17
Figura 1.8 Estructuras químicas de las protoxenocinas A y B (A, B) y del paquicladino A (C).....	18
Figura 1.9 Fármacos aprobados en el 2018 por área terapéutica [101].	20
Figura 1.10 Esquema de trabajo en diseño de fármacos basado en la estructura. Tomado de [114].	23
Figura 1.11 RMN en el proceso de descubrimiento de fármacos. 1-Determinación de la estructura 3D de proteínas sin conocimiento de la estructura primaria. 2-Información de la estructura y la dinámica del receptor en solución. 3-Elucidación estructural de los ligandos, determinación de estructura 3D, información de formación de agregados, información acerca de la estabilidad en solución. 4-Identificación de compuestos de media a baja afinidad. 5-Generación de ligandos de mayor afinidad. 6-Análisis de metabolitos en fluidos biológicos. 7-Análisis de células y fluidos para identificar individuos sanos y enfermos. Tomada y adaptada de [137].	27
Figura 1.12 Esquema del experimento STD [144].	30
Figura 1.13 Variación de los tiempos de relajación T_1 y T_2 en función del aumento en el tiempo de correlación molecular [147].	31

Figura 1.14. Esquema del experimento WaterLOGSY (tomado y adaptado de [9] y http://fragmentech.univ-lyon1.fr/waterlogsy-experiment/).	32
Figura 1.15 Métodos para la optimización de <i>hits</i> basados en NOEs interligando [9].	34
Figura 2.1 Compuestos de la librería de diterpenos de origen marino considerados en este trabajo.....	42
Figura 2.2 Resultados de los ensayos de inducción de apoptosis por citometría de flujo. Diagrama de cuadrantes células sin tratamiento (A), IC ₂₅ del compuesto 1 (B); diagrama de cuadrantes de las células tratadas con la IC ₅₀ de 1 (C); células tratadas con la IC ₇₅ (D); histograma de la proporción de células positivas para cada uno de los fluorocromos.	49
Figura 2.3 Resultados de los ensayos de inducción de apoptosis por citometría de flujo. Diagrama de cuadrantes células sin tratamiento (A), IC ₂₅ del compuesto 17 (B); diagrama de cuadrantes de las células tratadas con la IC ₅₀ de 17 (C); células tratadas con la IC ₇₅ (D); histograma de la proporción de células positivas para cada uno de los fluorocromos.	50
Figura 2.4 Resultados de los ensayos de inducción de apoptosis por citometría de flujo. Diagrama de cuadrantes células vivas (A), IC ₂₅ del compuesto 26 (B); diagrama de cuadrantes de las células tratadas con la IC ₅₀ de 26 (C); células tratadas con la IC ₇₅ (D); histograma de la proporción de células positivas para cada uno de los fluorocromos.	52
Figura 2.5 Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz) del compuesto 17 en medio acuoso (buffer fosfato pH 7.4, 300 mM NaCl y 10% D ₂ O).....	53
Figura 2.6 Espectro de RMN- ¹ H del ligando 1 en presencia de la tubulina antes de proceso de ultrafiltración (A) y espectro de RMN- ¹ H de 1 en presencia de la tubulina tras el proceso de ultrafiltración, en donde se observan las señales de 1 (B).....	54
Figura 2.7 Espectro STD de referencia para el compuesto 17 en ausencia de la tubulina.	55
Figura 2.8 Análisis de la interacción del compuesto 1 con la tubulina a través del experimento STD en buffer fosfato salino pH 7.4 con 10 % D ₂ O. A) Espectro DPFGE de 1 en ausencia de la tubulina; B) espectro STD de 1 en presencia de la tubulina; C) espectro STD de referencia del compuesto 1 en ausencia de la tubulina; D) espectro DPFGE de 1 en presencia de la tubulina. Los epítomos de unión están resaltados en azul.	56
Figura 2.9 Análisis de la interacción del compuesto 17 con la tubulina a través del experimento STD en buffer fosfato salino pH 7.4 con 10 % D ₂ O. A) Espectro DPFGE de 17 en ausencia de la tubulina; B) espectro STD de 17 en presencia de la tubulina; C) espectro STD de referencia del compuesto 17 en ausencia de la tubulina; D) espectro DPFGE de 17 en presencia de la tubulina. Los epítomos de unión están resaltados en rojo.....	57
Figura 2.10 Análisis de la interacción del compuesto 26 con la tubulina a través del experimento STD en buffer fosfato salino pH 7.4 con 10 % D ₂ O. A) Espectro DPFGE de 26 en ausencia de la tubulina; B) espectro STD de 26 en presencia de la tubulina; C) espectro STD de referencia del compuesto 26 en ausencia de la tubulina; D) espectro DPFGE de 26 en presencia de la tubulina. Los epítomos de unión están resaltados en verde.....	58
Figura 2.11 Epítomos de unión de los ligandos 1 , 17 y 26 frente a la tubulina identificados a través del experimento STD.....	59

Figura 2.12. Cambio en el tiempo de relajación T_1 para los ligandos 1 , 17 y 26 . El tamaño de las esferas representa la magnitud del cambio observado.	60
Figura 2.13 Cambio en el tiempo de relajación T_2 para los ligandos 2 y 18 . El tamaño de las esferas representa la magnitud del cambio observado.	61
Figura 2.14 Diagrama de interacciones de los ligandos 1 , 17 y 26 en comparación con el taxol.	66
Figura 2.15. Sistema de las subunidades alfa y beta de la tubulina en donde se señalan los sitios de unión del taxol y la colchicina.	68
Figura 2.16 Diagramas 2D de interacción para los complejos ligando-proteína 1 (A), 17 (B) y 26 (C) en el sitio de unión del taxol.	69
Figura 2.17. Esquematización de la afectación de la estructura de los protofilamentos y consecuentemente de los microtúbulos tras la interacción de un fármaco en el sitio de unión del taxol, lo cual conlleva al arresto mitótico y posterior muerte celular por la inducción de heterogeneidad en la estructura y afectación de los contactos laterales para la generación de la unión o costura entre las dos subunidades de la tubulina. En rojo se identifica la presencia de un estabilizante de tubulina. Tomada y adaptada de [214].	70
Figura 2.18 Diagrama de interacciones de los ligandos 1 , 17 y 26 en comparación con la colchicina.	71
Figura 2.19 Diagramas 2D de interacción para los complejos ligando-proteína 1 (A), 17 (B) y 26 (C) en el sitio de unión de la colchicina.	73
Figura 2.20 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de 1 con la proteína, en azul aguamarina se tienen interacciones de tipo polar y en azul rey interacciones de tipo polar cargadas positivamente(C)	75
Figura 2.21 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de 17 con la proteína (C).	76
Figura 2.22 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de 26 con la proteína (C).	77
Figura 2.23 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de 1 con la proteína (C).	80

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1 Concentración inhibitoria 50 de cada uno de los compuestos de la librería, expresada como concentración inhibitoria $50 \pm$ error estándar	44
Tabla 2. Coeficientes de difusión medidos y K_d para los ligandos 1 , 17 y 26 en presencia y ausencia de la tubulina. D_{libre} coeficiente de difusión para los ligandos en ausencia de la tubulina, D_{int} coeficiente de difusión para los ligandos en presencia de la tubulina.....	63
Tabla 3. Valores de energía libre de unión calculada y coeficiente de similitud para cada uno de los ligandos en el sitio de unión del taxol y la colchicina, respectivamente.....	65

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADME	Absorción Distribución Metabolismo Eliminación
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosil Trifosfato
BPPLED	<i>Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Current Delay</i>
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
D1	<i>Relaxation Delay</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Medium Modified</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPFGSE	<i>Double pulsed field gradient spin echo pulse sequence</i>
FBDD	<i>Fragment Based Drug Discovery</i>
FBS	<i>Fragment Based Screening</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GLOBOCAN	Observatorio Global del Cáncer
HTS	<i>High throughput screening</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
ITC	Titulación Calorimétrica Isotérmica
Kex	Velocidad de Intercambio Químico
LBVS	<i>Ligand Based Virtual Screening</i>
MD	Dinámica Molecular
MM	Mecánica Molecular
MM/GBSA	Mecánica molecular/área superficial generalizada
MM/PBSA	Mecánica molecular/área superficial de Poisson-Boltzman
Ms	Milisegundos
MST	<i>Micro Scale Titration</i>
MTS	5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazo)-3-(4-sulfofenil) tetrazolio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Ns	Nanosegundos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
PFG	<i>Pulse Field Gradient</i>
Ppm	Partes por Millón

Abreviatura	Término
Ps	Picosegundos
Pw90	Pulso de 90°
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Median Square Deviation</i>
SAR	<i>Structure Activity Relationship</i>
SBVS	<i>Structure Based Virtual Screening</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
Sw	<i>Spectral Window</i>
TR-NOESY	Experimento NOESY de transferencia
WST-1	4-[3-4-iodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)- 1,3-benceno disulfonato
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5- carboxanilida-2H-tetrazolio
ΔG	Cambio en la Energía Libre de Gibbs
$\Delta\omega$	Diferencia en el Valor de la Frecuencia

Introducción

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, teniendo altos índices de incidencia, prevalencia y mortalidad a nivel global [1]. Diferentes investigaciones son llevadas a cabo para contribuir a la solución de esta problemática, dentro de las que se encuentran aquellas enfocadas en la búsqueda y descubrimiento de agentes quimioterapéuticos los cuales podrían servir en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, o en combinación con otras estrategias podrían contribuir a la erradicación de las células tumorales [2], para lo cual se dirigen gran cantidad de esfuerzos a nivel mundial en este tipo de investigaciones.

En este sentido, el hombre ha dirigido su mirada hacia la naturaleza en busca de sustancias con actividad biológica. En sus orígenes, y por mucho tiempo, los estudios estuvieron dirigidos exclusivamente hacia los productos naturales vegetales, puesto que venían de organismos con los que compartían su hábitat. Un ambiente mucho más hostil para el ser humano como el océano, el cual representaba una fuente que lo proveyó casi exclusivamente de alimentos, permaneció inexplorado hasta hace relativamente poco tiempo. Este ecosistema constituye aproximadamente tres cuartas partes de la superficie de la tierra y actualmente representa una fuente rica de nuevos compuestos químicos, particularmente en ambientes tropicales debido a la diversidad biológica y química allí presente [3]–[6].

Al respecto, nuestro país no sólo se encuentra en la zona intertropical, sino que adicionalmente cuenta con dos costas, las cuales, a pesar de los esfuerzos de un pequeño grupo de investigadores, siguen siendo poco exploradas desde el punto de vista químico y en sus posibles aplicaciones terapéuticas. El grupo de “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia durante sus más de 30 años de trayectoria, se ha encargado de contribuir al estudio de diversos organismos presentes en el Caribe Colombiano, encontrando una gran variedad

de moléculas con actividades biológicas, como los diterpenos, provenientes principalmente de organismos como los octocorales y algas. Generando una lista de más de 50 compuestos aislados y más de 20 análogos semisintéticos, de los cuales su potencial como agentes citotóxicos no ha sido suficientemente explorado. Por esta razón, se requiere dar un siguiente paso en la evaluación de su actividad citotóxica y posibles aplicaciones como agentes antitumorales.

Para el descubrimiento de estos agentes, múltiples herramientas tanto bioquímicas como biofísicas se han desarrollado, siendo estas últimas las más ampliamente distribuidas en las campañas de descubrimiento de fármacos debido a la implementación del *high throughput screening* (HTS). Recientemente, la proporción de resultados falsos positivos y/o inadecuados obtenidos a partir de esta metodología ha ido en aumento [7], [8], haciendo necesaria la introducción de otro tipo de herramientas que complementen los resultados obtenidos por HTS y permitan obtener resultados más informativos y fiables.

Una de las herramientas empleadas es la resonancia magnética nuclear (RMN), la cual se usa en estos programas desde hace más de 20 años, principalmente por la versatilidad que ésta ofrece logrando ser aplicada no solo en los procesos de descubrimiento de fármacos sino en los de optimización para la obtención de compuestos líderes [9]. La RMN permite la identificación de los epítomos de unión con una resolución a nivel atómico de moléculas pequeñas, como compuestos orgánicos de bajo peso molecular, péptidos y oligosacáridos, mientras estos están interactuando con biomoléculas, como proteínas y/o ácidos nucleicos [10]; además permite una caracterización completa de la interacción ligando-receptor y la determinación del sitio de unión específico para los ligandos en el receptor. Adicionalmente, es posible obtener información acerca de la conformación de unión en la macromolécula, junto con el mapeo farmacofórico el cual permite llevar a cabo estudios de relación estructura actividad (REA) en etapas posteriores del proceso de descubrimiento de fármacos [11]–[13].

De manera complementaria, los métodos computacionales han creado una relación sinérgica con las técnicas experimentales en el proceso de descubrimiento racional de fármacos, ya que las técnicas biofísicas, como la RMN, proveen solo la evidencia de la unión entre los ligandos y la proteína de interés a través de la detección de los núcleos más abundantes naturalmente (^1H , ^{13}C y ^{15}N), y en su gran mayoría son incapaces de

indicar las interacciones de tipo polar que se pueden presentar en las cavidades proteicas. Es así como los estudios de acoplamiento molecular proveen información acerca del modo de unión y el tipo de interacción de los ligandos que presentan afinidad física con la macromolécula de interés. Debido a que la presencia de esta afinidad física no se correlaciona inequívocamente con la presencia de actividad biológica es necesario el complemento de estos estudios con metodologías *in vitro* e *in vivo* que terminen de dar soporte experimental a las interacciones descritas por RMN y predichas o explicadas por cálculos computacionales.

Así, este trabajo parte de la necesidad de implementar experimentos de RMN que aporten una mayor cantidad de información en proyectos de descubrimiento de fármacos, lo cual, junto con su integración con la información generada por métodos computacionales permite comprender la interacción ligando-receptor, para así contribuir a la descripción de los mecanismos de acción de fármacos, siendo esta la primera investigación desarrollada en esta área, tanto en el grupo de investigación, como en el país.

Esta investigación contribuye al conocimiento de la potencial aplicación terapéutica que tiene una librería de diterpenos producidos por organismos marinos para ser empleados como agentes citotóxicos, siendo este el primer paso para un futuro aprovechamiento de la biodiversidad marina colombiana en la búsqueda de compuestos líderes para el desarrollo de fármacos.

Para esto se planteó como objetivo general: Evaluar el potencial citotóxico que tienen una librería de diterpenos de origen marino, a través de la integración de herramientas computacionales y biofísicas con ensayos de actividad citotóxica *in vitro*. Para cumplir con esto se plantearon como objetivos específicos: 1-Identificar moléculas activas a partir de una librería de diterpenos marinos por medio de ensayos de viabilidad celular. 2-Determinar la afinidad que tienen los compuestos con mejor perfil de actividad citotóxica frente al blanco molecular tubulina, haciendo uso de experimentos de RMN como STD, TRNOESY, entre otros. 3-Establecer un modelo de unión ligando-receptor mediante estudios de acoplamiento molecular entre los compuestos más promisorios y la tubulina.

Los resultados se presentarán de manera conjunta y complementaria para cada uno de los pasos de la evaluación de la librería de diterpenos marinos. Comenzando con los

resultados de actividad citotóxica frente a tres líneas celulares de cáncer humano, empleada aquí como estrategia de tamizaje. Para los compuestos que presentaron actividad citotóxica frente a las tres líneas celulares evaluadas se realizó una caracterización preliminar de los procesos de muerte celular logrando ver si la citotoxicidad era el resultado de procesos de apoptosis o necrosis. Aquellos compuestos que fueron inductores de la apoptosis en células cancerosas fueron evaluados frente a la tubulina a través de experimentos de RMN como STD, medidas de tiempos de relajación T_1 y T_2 y determinación de coeficiente de difusión. Estos compuestos fueron sometidos a predicciones computacionales, como acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular para establecer un modelo de unión ligando-receptor de estos compuestos con la tubulina.

1.Integración de experimentos de RMN, métodos computacionales y ensayos de actividad biológica para la evaluación de la actividad citotóxica de una librería de diterpenos marinos

1.1 Aspectos teóricos y estado del arte

1.1.1 Una mirada hacia el cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y propagación de células anormales. Si la propagación no es controlada, esta puede resultar en la muerte. A pesar de que la causa de muchos tipos de cáncer permanece desconocida, particularmente para aquellos que ocurren durante la infancia, se han identificado algunos factores de riesgo asociados a la aparición de cáncer tales como factores del estilo de vida (el tabaco y el sobrepeso) y factores inherentes (mutaciones genéticas, condiciones hormonales e inmunes, etc.). Estos factores de riesgo pueden actuar de manera simultánea o secuencial para iniciar y/o promover el crecimiento tumoral. Alrededor de 10 años transcurren después de la exposición a factores externos y la aparición de un cáncer detectable [14], [15].

De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) se estima que el cáncer causa más muertes que todas las enfermedades cardíacas coronarias o los infartos y se espera que para el año 2025 se reporten cerca de 20 millones de nuevos casos. Según los datos reportados por GLOBOCAN, 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y 9.6 millones de muertes fueron reportadas en el 2018. Los tipos de cánceres más comúnmente

diagnosticados fueron el cáncer de pulmón (2.09 millones), cáncer de seno (2.08 millones) y cáncer colorrectal (1.85 millones). Los cáncer que causaron más muertes fueron el cáncer de pulmón (1.76 millones de muertes), cáncer colorrectal (880.792 muertes) y cáncer de estómago (782.685 muertes) [1] (Figura 1.1).

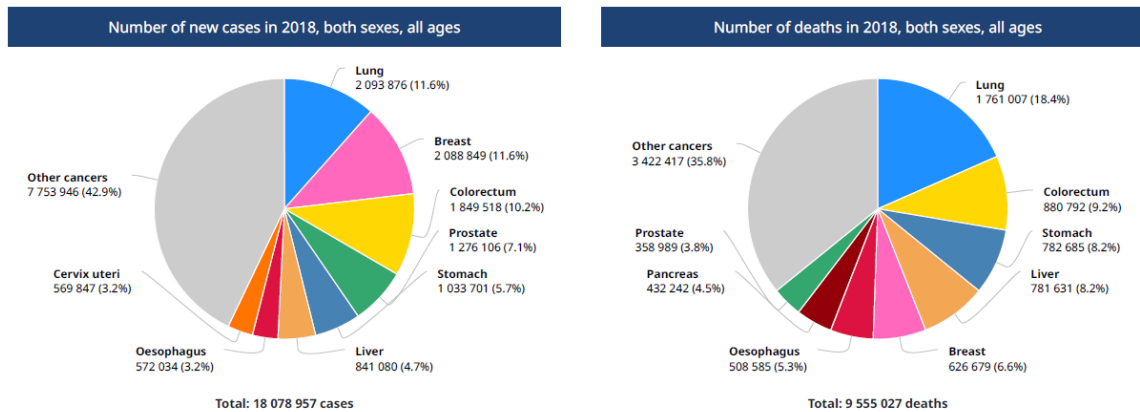


Figura 1.1 Número de nuevos casos y muertes para ambos sexos reportados en el año 2018. Tomado de GLOBOCAN 2018 [1]

Para Colombia, en el año 2018, se reportaron 101.893 nuevos casos de cáncer y 46.057 muertes. [1]. Entre los hombres, las principales localizaciones de cáncer fueron: próstata, estómago, pulmón, colorrectal, pulmón y linfomas no-Hodking. Entre las mujeres, las principales localizaciones fueron: mama, colorrectal, tiroides, cérvix, y estómago. En el caso de los niños, el cáncer no representa más del 3 % de los casos nuevos del país, pero si presenta altas tasas de mortalidad, especialmente por leucemias agudas pediátricas [16], [17].

Respecto a la enfermedad, las células cancerosas se diferencian de las células normales de múltiples maneras dentro de las cuales está la capacidad de crecer sin control y convertirse en células invasivas. Dentro de estas características, una de las principales diferencias radica en el grado de especialización celular, ya que las células cancerosas son menos especializadas que las células normales. Esto debido a que las primeras tienen tiempos de maduración mucho más cortos que las células normales [18]. Adicionalmente, las células cancerosas pueden ignorar las señales de muerte celular programada, las cuales mantienen la homeostasis de la división celular como lo son las rutas apoptóticas.

Actualmente, existen alrededor de 100 tipos diferentes de cáncer. La mayoría de estos toman el nombre del órgano o de las células en donde empiezan; por ejemplo, el cáncer que empieza en estómago se llama cáncer de estómago, el cáncer de seno comienza en el seno, etc. Linfoma es un tipo de cáncer que empieza en el sistema linfático y leucemia es cáncer que empieza en los glóbulos blancos (leucocitos) [19].

Muchos tipos de cáncer inician con la aparición de lesiones precancerosas que preceden el desarrollo de carcinomas invasivos y están asociadas a un riesgo elevado de la aparición de cáncer. Es más probable la aparición de un tipo de cáncer a partir de estas lesiones que de sus contrapartes sanas (Figura 1.2) [20]. Estas lesiones están caracterizadas por características histológicas e inmunohistológicas anormales, combinadas con alteraciones moleculares y que posteriormente pueden transformarse en cáncer invasivos, pasando por estados de hiperplasia y displasia. Inicialmente, el tejido normal presenta hiperplasia, el cual es caracterizado por un aumento en el número de células que componen el tejido, pero al microscopio se sigue viendo normal generando infiltración de células inmunes. Posteriormente, este tejido hiperplásico presenta displasia en donde las células se observan anormales, pero no son cáncer. Finalmente, este tejido puede convertirse en un cáncer invasivo, en el cual, como se observa en la Figura 1.2, hay una alta infiltración de células inmunes [20].

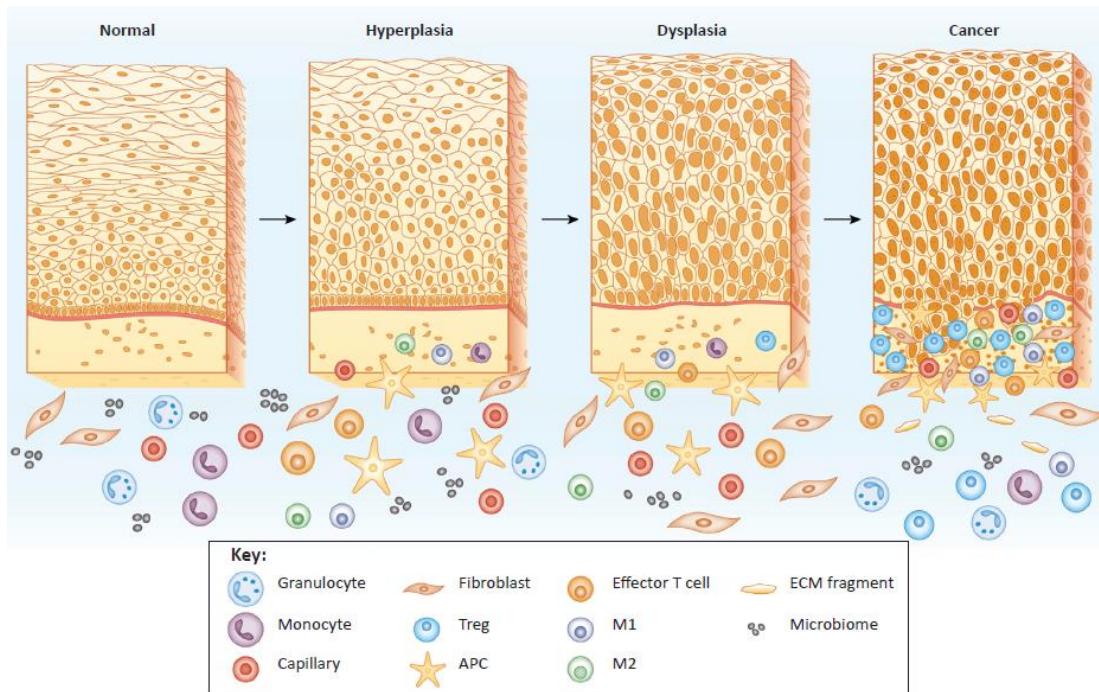


Figura 1.2 Transición de una lesión precancerosa a un cáncer invasivo. Tomado de The Making of a PreCancer Atlas: Promises, Challenges, and Opportunities 2018 [20].

Autores como Hanahan y Winberg identificaron seis características principales en los tumores humanos, dentro de los cuales se pueden encontrar: la capacidad de ser autosuficientes en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti proliferativas, evasión de la muerte programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y la capacidad de invadir tejidos y generar metástasis [21], [22] convirtiéndose esta señales en potenciales blancos terapéuticos en la terapia anti-cáncer.

1.1.2 Muerte celular

La muerte celular es un proceso fundamental cuya regulación es altamente compleja, así como los procesos de división y diferenciación celular. En un contexto fisiológico como el desarrollo embrional y la renovación de los tejidos, o como una respuesta patológica al daño celular y patógenos infecciosos, la muerte celular es orquestada con múltiples propósitos que benefician al organismo [23].

La muerte celular se manifiesta con alteraciones morfológicas macroscópicas, que generan morfotipos característicos que representan el mecanismo de muerte celular

generado. En la muerte celular tipo I o apoptosis, se observa contracción citoplasmática, condensación de la cromatina (piknosis), fragmentación del núcleo (karyorrhexis) y alteración de la membrana plasmática (*blebbing*). Este proceso culmina con la formación de pequeñas vesículas aparentemente intactas, denominadas cuerpos apoptóticos. Estos son eficientemente tomados por células vecinas con actividad fagocítica y degradados por acción de lisosomas [24]. La muerte celular tipo II o autofagia, es caracterizada por una alta vacuolización del citoplasma y similarmente termina con la fagocitación y consecuente degradación lisosomal por células especializadas.[25]. Finalmente, la muerte celular tipo III o necrosis, no presenta características distintivas de los tipos I y II. En su finalización se observan los residuos celulares en ausencia de actividades fagocíticas y lisosomales [26].

La muerte celular tipo I o apoptosis, es uno de los mecanismos más estudiados hasta el momento y el preferido en la inducción de muerte celular en células cancerosas, debido a su alto grado de regulación [27], [28], por lo cual esta revisión se enfocará en este mecanismo de muerte celular. Existen dos rutas principales por las cuales se puede generar apoptosis, la vía intrínseca y extrínseca (Figura 1.3) [29].

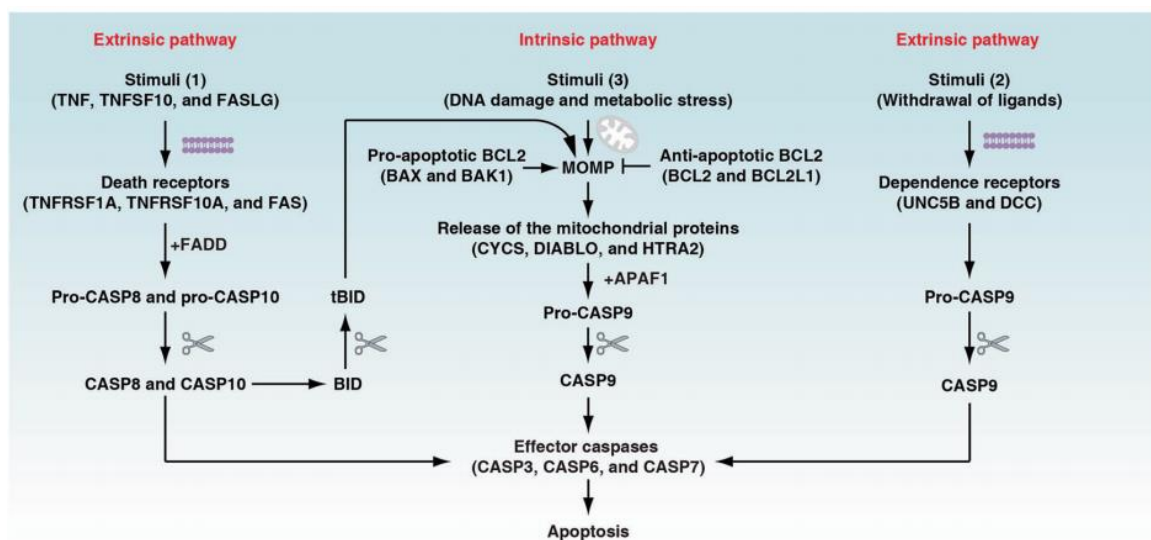


Figura 1.3 Apoptosis extrínseca e intrínseca. La apoptosis extrínseca es mediada por estímulos externos y la interacción con receptores de muerte celular, para la activación de las caspasas 8 y 10, y posteriormente activación de los efectores de la apoptosis. La apoptosis intrínseca por otro lado es inducida por alteraciones intracelulares, que perturban

la membrana externa de la mitocondria, activan la caspasa 9 y finalmente las caspasas 3, 6 y 7 (efectores). Tomada de [30]

- Vía intrínseca. La apoptosis intrínseca puede ser iniciada por una amplia variedad de perturbaciones en el microambiente celular, dentro de estas se pueden encontrar disminución del factor de crecimiento, daño en el ADN, estrés en el retículo endoplasmático, una alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés en la replicación celular, alteraciones en los microtúbulos o defectos mitóticos [31]–[34]. El paso crítico para la apoptosis intrínseca es la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) [35], [36], esta es controlada por las proteínas de la familia BCL2. Estas proteínas (BAX, Puma, Noxa y Siva) generan la permeabilización de la membrana de la mitocondria a través de la formación de canales que facilitan el transporte de elementos activadores de la apoptosis, como el citocromo C [37]–[39]. Adicionalmente, estas proteínas pueden interactuar con otras proteínas como el canal dependiente de voltaje aniónico (VDAC) para generar canales en la membrana [40]. En el citosol, el citocromo C se une al factor apoptótico activante de proteasas (APAF-1) el cual genera el apoptosoma que finalmente recluta y activa la pro-caspasa 9. Finalmente, la caspasa 9 activa las pro-caspasas 3, 6 y 7 las cuales en su forma activa son los efectores de la apoptosis, gracias a su actividad proteolítica y su amplia variedad de sustratos [41].
- Vía extrínseca. En esta vía la muerte celular es iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular [42], [43]. La apoptosis extrínseca es principalmente mediada por dos tipos de receptores de membrana: receptores de muerte, cuya activación depende de la unión de ligandos afines por estos receptores; receptores de dependencia, cuya activación ocurre cuando los niveles de un ligando específico alcanza una concentración crítica para activar este receptor [44], [45]. Dentro de los receptores de muerte celular se pueden encontrar: receptor de muerte superficial (FAS, también conocido como CD95 o APO-1) y la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF): 1A (TNFRSF1A, mejor conocido como TNFR1), 10a (TNFRSF10A, mejor conocido como TRAILR1 o DR4) y 10b (TNFRSF10B), mejor conocido como TRAILR2 o DR5) [46], [47]. Tras la unión del ligando específico al

receptor de muerte celular, se genera la formación de un complejo multi proteína al interior de la célula, denominado “complejo de señalización de muerte inducida” (DISC) [48]. Existen dos tipos de complejos, el complejo I y II, los cuales operan como una plataforma para regular la activación y función de las caspasas 8 y 10, las cuales posteriormente activarán los efectores de la apoptosis (caspasas 3, 6 y 7), siendo este el punto en común de la vía intrínseca [49].

Los microtúbulos, hacen parte fundamental de varios procesos que son vitales para la célula debido a que son los componentes principales del citoesqueleto, están involucrados en el transporte intracelular, son los encargados de procesos de motilidad y morfología celular así como en la división celular. Adicionalmente, están involucrados en varios procesos diferenciales en las células tumorales.

Estos son constituidos por la polimerización de las subunidades alfa y beta de la tubulina, existen en un estado dinámico continuo de elongación y disminución del tamaño a través de la asociación y disociación reversible de las subunidades alfa y beta de la tubulina [50]. Los microtúbulos cumplen diferentes funciones en varios procesos celulares. son el componente principal del citoesqueleto, están involucrados en la segregación de los cromosomas durante el evento mitótico, en la formación del uso mitótico, así como en la motilidad y otros procesos celulares fundamentales [51], [52].

El proceso dinámico de polimerización-depolimerización de la tubulina es esencial para el proceso de la segregación de los cromosomas, cualquier interferencia en la dinámica de los microtúbulos tiene un impacto significativo en el proceso de división celular que podrían terminar en defectos genéticos [53]. Es por esto que la segregación de los cromosomas es uno de los procesos más críticos en la división celular, gobernado completamente por la acción de los microtúbulos. La presencia de puntos de control (*check points*) detectan defectos en este proceso, deteniendo así el evento mitótico e induciendo la muerte celular programada o apoptosis a través de la activación de la vía intrínseca [54].

Con ese panorama diferentes estrategias terapéuticas han sido desarrolladas, dentro de estas se tienen: la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia, la terapia dirigida, la terapia hormonal, el trasplante de células madre, la medicina de precisión y la quimioterapia. Esta última consiste en la utilización de fármacos para erradicar a las células cancerígenas. La quimioterapia actúa a través del detenimiento o disminución del crecimiento de este tipo

de células, las cuales crecen y se dividen rápidamente [55]; esta terapia puede tener tres objetivos diferentes: curar, controlar o atenuar los síntomas generados por la enfermedad.

Actualmente existen más de 100 agentes quimioterapéuticos que son usados para el tratamiento del cáncer, solos o en combinación con otros agentes o terapias. Estos tienen diferente composición química, mecanismos de acción diferentes y efectos colaterales diversos. Estos pueden ser: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores mitóticos y corticoesteroides entre otros [56].

Como se mencionó anteriormente, la tubulina juega un rol muy importante en el desarrollo procesos celulares fundamentales, haciéndola un buen blanco terapéutico en la búsqueda de agentes para el tratamiento del cáncer. Así, los microtúbulos y su dinámica con blancos terapéuticos para un diverso grupo de sustancias, denominadas agentes antimitóticos. Estos agentes interactúan con la tubulina en diferentes sitios de unión, interfiriendo con la dinámica de la tubulina y ejerciendo así su actividad antimitótica [57]. Esta interferencia en la dinámica de la tubulina puede ser generada a través de la estabilización o desestabilización del proceso de polimerización de la tubulina para generar los microtúbulos. En ambos casos la alteración de este proceso culmina en la muerte celular [58].

Finalmente, la presencia de varios isotipos de β -tubulina durante los procesos de carcinogénesis, como la β -tubulina clase III en cáncer de pulmón [59], β -tubulina clase IV en cáncer de hígado [60] y la β -tubulina clase V en cáncer epitelial [61], hacen necesaria la continuidad en la búsqueda de agentes antimitóticos que contribuyan al tratamiento de estos tipos de cáncer.

1.1.3 Diterpenos y el cáncer

Dentro de la gran diversidad estructural que ofrecen los compuestos de origen natural, los diterpenos tienen un gran potencial en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer [62]. Estos compuestos son una clase estructuralmente diversa los cuales tienen como núcleo básico 20 átomos de carbono, se encuentran ampliamente distribuidos en la

naturaleza y son originados por la condensación de cuatro unidades de isopreno derivados de la ruta biosintética del mevalonato [63]. La biosíntesis de estos metabolitos es llevada a cabo en tres pasos principales, los cuales contribuyen cada uno a la diversidad estructural de estos compuestos [64].

Inicialmente, las enzimas terpensintasas (TPS) convierten las unidades lineales de isopreno en diterpenos lineales o cíclicos funcionalizados con dobles enlaces o alcoholes en sus estructuras, generando así los núcleos básicos de cada diterpeno [65]. Las variaciones en estas funcionalizaciones y ciclaciones son las responsables de alta diversidad en núcleos estructurales reportada [66]–[69]. Posteriormente, estos núcleos son usualmente oxidados en posiciones específicas y con estereoquímica definida por acción de las enzimas oxigenasas del complejo citocromo P450 (CYPs) [70], las cuales se caracterizan por contener un grupo hemo en su estructura, pueden ser encontradas en todas las especies y son consideradas como uno de los principales contribuyentes a la amplia diversidad metabólica observada en estos compuestos. Estas enzimas catalizan una amplia gama de reacciones, en donde se incluyen oxidaciones, deshidrataciones, ruptura de enlaces C-C, descarboxilaciones, dimerizaciones, isomerizaciones, reducciones y rearreglos de los núcleos básicos mediante la formación de enlaces C-C. El número de diterpenos identificados que provienen de reacciones con CYPs excede el número de CYPs conocidas que están involucradas en la biosíntesis de estos compuestos [71], [72]. Esto muestra una alta promiscuidad en el sustrato para estas enzimas y la capacidad que estas tienen para llevar a cabo oxidaciones en diferentes posiciones del sustrato, resultado de una ventaja evolutiva para la supervivencia de los organismos [73], [74]. Finalmente, en ocasiones ocurre un paso de funcionalización adicional de los diterpenos oxidados, en donde se observa la adición de grupos acilo, benzoilo, glicosilaciones e incluso la adición de grupos alcaloidales [64].

Es así como más de 55.000 estructuras han sido identificadas, generando una amplia diversidad estructural que se ve reflejada en la gran variedad de actividades biológicas que estos tienen [64], [75], [76]. Dentro de estas la actividad antitumoral es una de las más promisorias, varios diterpenos con potencial antitumoral y sus derivados han sido descritos actualmente como la oridonina [77], el andrografólido [78], diterpenos derivados del tabaco dentro de los cuáles se resaltan aquellos con núcleo cembrano [79].

Actualmente, un derivado del triptólido (Figura 1.4 A) un diterpeno obtenido de la vid del dios del trueno, *Tripterygium wilfordii* [80] se encuentra en la fase II de los estudios clínicos para el tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas que no responden al tratamiento convencional [81]. Este derivado es el minnelido (Figura 1.4 B) un pro fármaco del tripolido, el cuál al aumentar su solubilidad en agua se observa una disminución en los efectos tóxicos observados en el triptolido y mantiene la actividad observada en el triptólido [82].

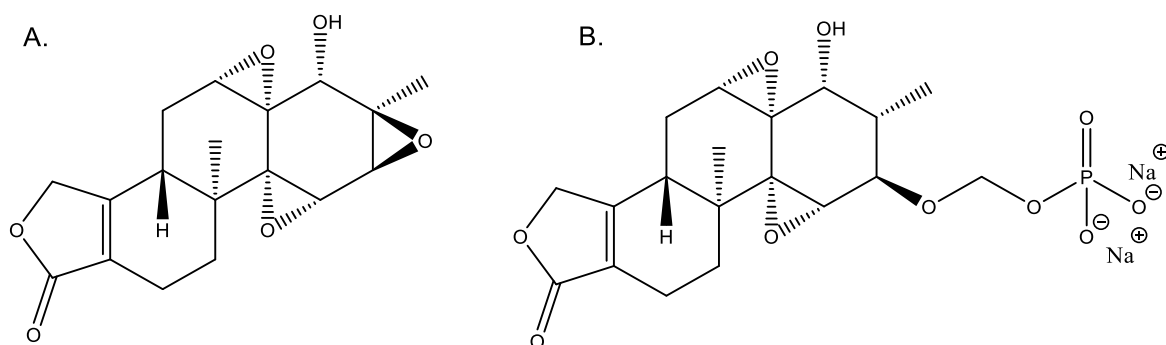


Figura 1.4 Estructuras químicas del triptólido (A) y su derivado minnelido (B).

El ejemplo más relevante de diterpenos como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer, es el paclitaxel (Figura 1.5 A) un diterpeno aislado de la corteza del tejo del pacífico *Taxus brevifolia*, el cual hoy en día hace parte del set terapéutico para tratar diferentes tipos de cáncer [83].

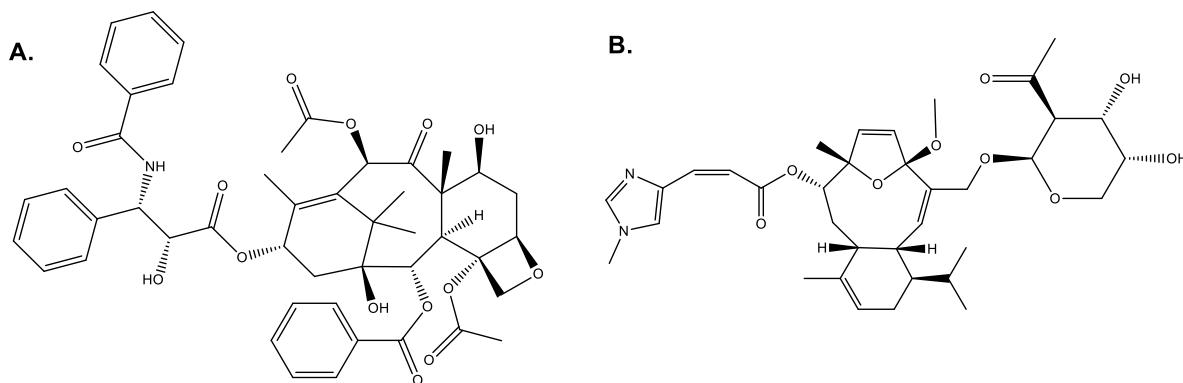


Figura 1.5 Estructuras químicas del paclitaxel (A) y la eleuterobina (B).

Como se mencionó anteriormente, los diterpenos son una clase altamente diversa en términos tanto estructurales como de actividad biológica, siendo la actividad antitumoral una de las más prometedoras y prolíficas hasta el momento. En un principio, el conocimiento y aprovechamiento de esta diversidad era solo hecha en medios terrestres, específicamente hablando sobre los diterpenos derivados de organismos como las plantas. Varios núcleos estructurales que se encuentran en organismos terrestres son también encontrados en otro tipo de organismos como lo son los organismos marinos. Dentro de estos núcleos, se encuentran los diterpenos con núcleo cembrano los cuales son ampliamente distribuidos en el ecosistema marino [84].

Dado que en el ecosistema marino las condiciones medioambientales son extremas presentando alta salinidad, alta presión, baja concentración de nutrientes, bajas temperaturas, poco espacio para el asentamiento, entre otras, esto hace que los organismos que allí viven se vean obligados a desarrollar habilidades para su supervivencia en dicho ambiente. Derivado de estas estrategias de supervivencia, se genera una enorme diversidad estructural en los metabolitos especializados producidos por estos organismos, en donde si bien se comparten núcleos básicos de diterpenos con organismos terrestres también existen núcleos que son exclusivos del ecosistema marino como es el caso de los briaranos, los cuáles son una clase estructuralmente amplia y presentan varios tipos de actividades biológicas, siendo la actividad antitumoral y antiinflamatoria las que más se han evaluado [85].

Un ejemplo de diterpenos marinos con actividad antitumoral es la eleuterobina (Figura 1.4 B), un diterpeno glicosilado aislado del octocoral caribeño *Erythropodium caribaeorum*. Este diterpeno fue descrito por primera vez en un estudio desarrollado por Lindel y colaboradores en el octocoral *Eleutherobia* sp. recolectado en Australia [86]. Posteriormente, en la Universidad British Columbia en Canadá, el Profesor Raymond Andersen en la búsqueda de compuestos con actividad antimetabólica de organismos marinos, aisló la eleuterobina y seis nuevos análogos denominados desmetileleuterobina, desacetileleuterobina, isoeleuterobina A, Z-eleuterobina, caribaeosido y caribaeolin [87]. La eleuterobina presentó actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colon multiresistente, presentando un mecanismo de acción asociado a la estabilización de los microtúbulos de tubulina, impidiendo la terminación del ciclo celular y conllevando a la muerte celular, un mecanismo de acción similar al del Paclitaxel [88].

Así, los organismos marinos son considerados una fuente prolífica de diterpenos con actividad anti-cáncer. Alrededor del 40 % de los compuestos aislados de organismos marinos cada año, corresponden a terpenos, de estos, más del 50 % tienen actividad anti cáncer (Figura 1.6) [89]. Dentro de estos, son varios los núcleos de diterpenos con actividad citotóxica como los dollabelanos, hidroazulenoides, xenianos, entre otros (Figura 1.7). Éstos, en su mayoría, han sido aislados de algas marinas pertenecientes a la familia Dictyotaceae y de octocorales de diferentes familias [90].

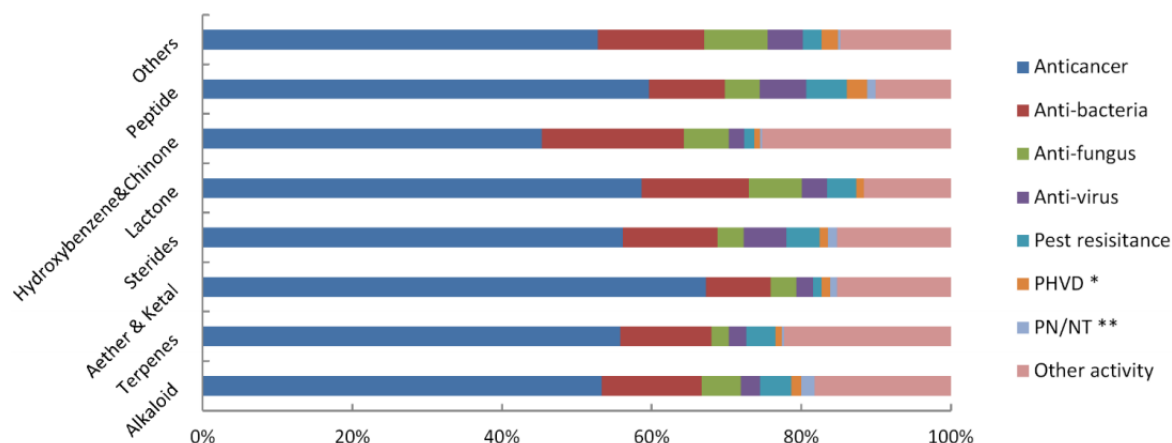


Figura 1.6 Proporción de actividades biológicas por tipo de compuestos aislados de organismos marinos [89].

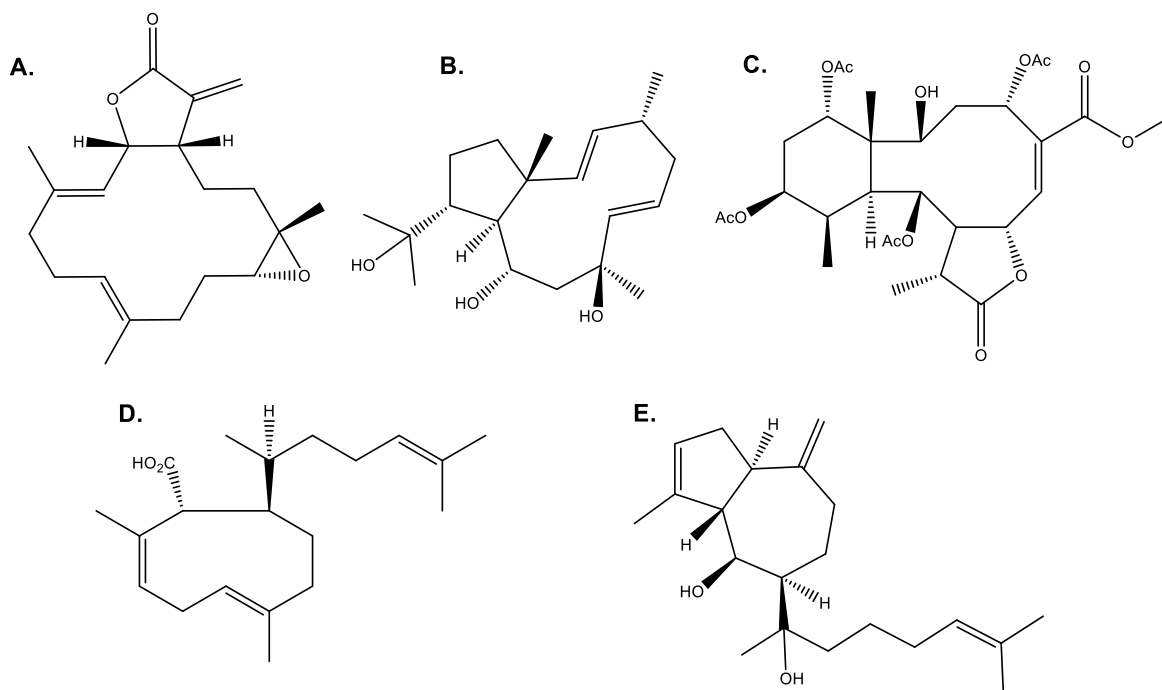


Figura 1.7 Algunos núcleos estructurales de diterpenos con actividad citotóxica. (A) cembranos, (B) dollabelanos, (C) briaranos, (D) xenianos y (E) guaianos.

Las protoxenicanas A y B (Figura 1.8 A y B), diterpenos con núcleo xenicano aislados del coral blando *Protodendron repens*, presentaron buenos valores de actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de seno (MDA-MB-231), cáncer de colón (HT-29) y cáncer de pulmón (NSLC A-549), con valores de concentración letal 50 (CL₅₀) para la protoxenicina A de 3.8, 2.2 y 1.1 μM respectivamente. De igual manera, la protoxenicina B presentó valores de 2.4, >17.2 y >17.2 μM para cada una de las líneas celulares [91]. Por otro lado, los diterpenos de núcleo eunicelano como los paquicladinos (Figura 1.8 C) producidos por el coral blando *Cladiella pachyclados* tienen un buen perfil de actividad anti cáncer, a través de la inhibición del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR); con valores alrededor de 1.0 μM para este tipo de compuestos [92].

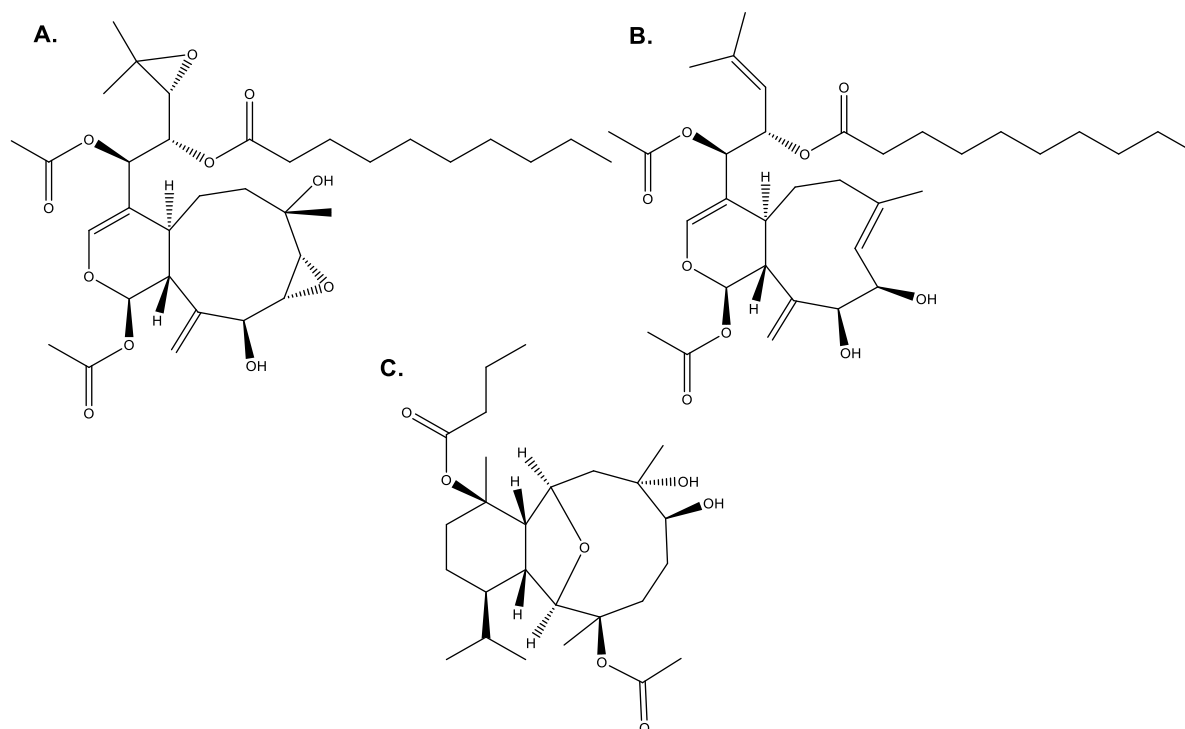


Figura 1.8 Estructuras químicas de las protoxenicinas A y B (A, B) y del paquicladino A (C).

Otro tipo de núcleos estructurales con actividad citotóxica son los cembranos, los cuales, en varios reportes, han presentado buena actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares como SF-268 (cáncer del sistema nervioso central), MCF-7 (adenocarcinoma mamario), H460 (cáncer de pulmón), entre otras [93]. Como ejemplo, un estudio de acoplamiento molecular llevado a cabo con diterpenos de núcleo cembranoide, como los sarcofitólidos, se encontró una alta afinidad con proteínas como la tubulina, presentando una conformación bastante similar a la reportada en la estructura cristalina con el ligando podofilotoxina [94]. Otro ejemplo de núcleos de diterpenos con potencial como agentes citotóxicos son los briaranos [85]. Dentro de estos, los gemmacólidos AS-AY presentaron actividad citotóxica frente a la línea celular MG-63 (osteosarcoma humano) con valores de 7.2 μM [95].

1.1.4 Métodos para la evaluación de la actividad citotóxica

Uno de los métodos más ampliamente usados para la determinación de la actividad citotóxica de compuestos, ya sea de origen natural, semisintético o sintético, son los ensayos de viabilidad celular, los cuales son diseñados para medir actividades celulares atribuidas a la supervivencia celular. Esta actividad se mide por biomarcadores típicos de actividad metabólica como las enzimas reductasas mitocondriales [96]. La premisa de estos ensayos radica en que estas actividades son directamente proporcionales al número de células viables después de un periodo de tratamiento.

Los ensayos basados en la reducción de los colorantes derivados de la resazurina se han convertido en uno de los primeros indicadores de viabilidad celular. La inherente capacidad reductiva de las células viables puede ser convenientemente medida haciendo uso de un indicador redox, como el colorante resazurina y sus derivados [97]. Éste es soluble bajo condiciones fisiológicas y puede ser añadido directamente a los cultivos en crecimiento en un solo paso. El producto resultante de la reducción de este colorante es la resofurina, el cual puede ser medido utilizando métodos colorimétricos mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda de 492 nm. Existen diferentes tipos de colorantes derivados de la resazurina que pueden ser usados, tales como el (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-carboxanilida-2H-tetrazolio (XTT), el (4-[3-4-iodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benceno disulfonato) (WST-1), el 5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazo)-3-(4-sulfofenil) tetrazolio (MTS) y el más ampliamente usado el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), cuyo producto de reducción es el colorante formazan.

Desde la perspectiva de los resultados esperados en este tipo de ensayos, en tiempos cortos de incubación (8 horas o menos), una reducción o desaparición completa de estas actividades biomarcadoras es un indicador fuerte de citotoxicidad por daño en las membranas (necrosis primaria) [98]. Por otro lado, una reducción en la actividad biomarcadora, comparada con el control en largos periodos de incubación, indica una reducción en la tasa de división normal (arresto del ciclo celular) o muerte celular por mecanismos de eliminación programada como la apoptosis [99], [100].

1.1.5 Búsqueda racional de agentes terapéuticos

Una vez declarado el interés en una molécula por su actividad farmacológica en estudios preliminares, el desarrollo de un fármaco requiere examinar su eficacia, toxicidad y perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos, haciendo uso de ensayos basados en modelos celulares o animales, todo esto constituye la etapa de ensayos preclínicos. Acto seguido a estos estudios, normalmente es examinada su seguridad en voluntarios sanos, posteriormente su eficacia en humanos dando lugar a las fases clínicas que típicamente incluyen 4 etapas.

En el 2018 la FDA aprobó 59 fármacos, superando el récord de 53 fármacos en 1996. De estos, 16 tienen aplicaciones oncológicas (Figura 1.9) y alrededor del 30 % de los fármacos aprobados cada año hacen parte de la terapéutica contra el cáncer [101].

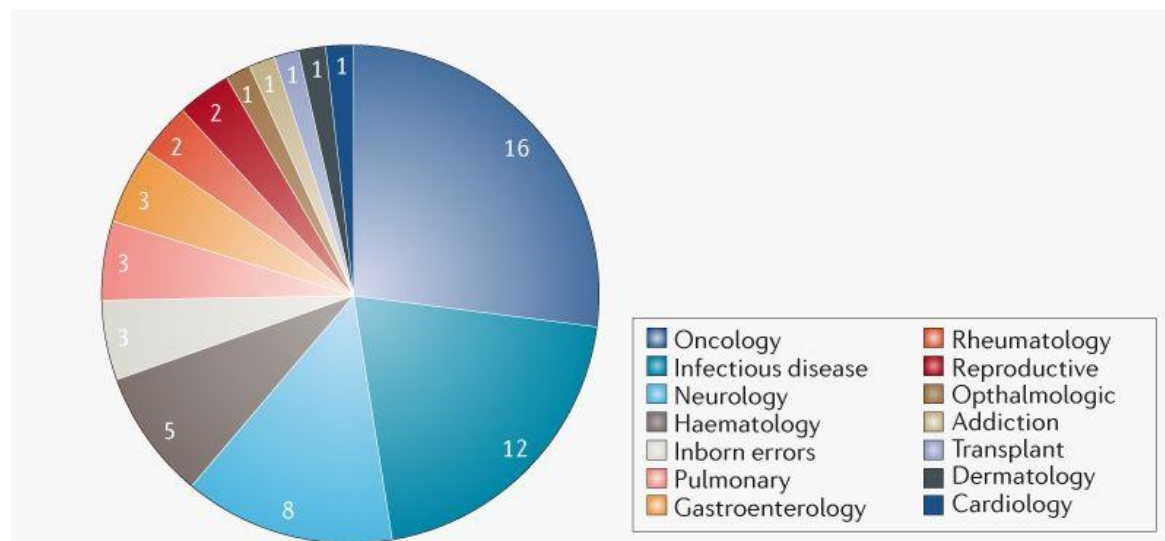


Figura 1.9 Fármacos aprobados en el 2018 por área terapéutica [101].

Sin embargo, el proceso de desarrollo de un fármaco usualmente está asociado con una alta proporción de fracasos. La mayoría de estos fracasos son debidos a una falta de eficacia en los estudios clínicos de fase II [102]. Los estudios clínicos en oncología están asociados con la proporción más alta de fracasos en comparación con otras áreas terapéuticas, donde solo 1 de cada 5000 a 10000 posibles agentes anti cáncer es aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), la entidad reguladora de los Estados Unidos),

y solo el 5 % de los fármacos oncológicos que han entrado a la fase I de los estudios clínicos son eventualmente aprobados [103].

Anteriormente, la identificación de los ligandos endógenamente activos era realizada mucho antes de conocer el receptor biomolecular con el que estos interactuaban [104], [105]; la información acerca de la estructura química del ligando era rudimentaria y escasa comparada con la gran cantidad de detalles que proveen las técnicas experimentales modernas. Sin embargo, esta información era suficiente para inferir conocimiento y desarrollar una hipótesis sobre la relevancia fisiológica de estos ligandos, a pesar de que los mecanismos fisiológicos subyacentes eran desconocidos. Las hormonas esteroidales extraídas de los ácidos biliares a comienzos del siglo XX son un ejemplo emblemático de este paradigma, en donde la cristalografía de rayos X permitió conocer la distribución tridimensional de los átomos que constituyen el núcleo esteroidal y la estereoquímica de sus sustituyentes, lo que conllevó a realizar variaciones en el núcleo esteroidal y relacionarlo con una actividad biológica específica [106].

Con el conocimiento de la estructura molecular del blanco terapéutico de interés, surgen aproximaciones como el cribado de alta eficiencia (HTS) que permiten evaluar una gran cantidad de moléculas para determinar si presentan interacciones con estos blancos terapéuticos. Sin embargo, los métodos de HTS han producido falsos positivos. Esto ha generado un déficit de información entre los *hits* identificados y los demás criterios que deben ser cumplidos en paralelo para convertirse en candidatos que tengan una oportunidad real de convertirse en un fármaco [8].

Esta brecha puede ser suplida mediante la investigación de las interacciones entre los ligandos y sus receptores, haciendo uso de diferentes herramientas como la resonancia magnética nuclear, cristalografía de rayos X, la bioinformática y el modelamiento molecular. De esta manera, la década pasada fue testigo de un cambio del paradigma en el descubrimiento de fármacos desde una aproximación clásica, hacia el diseño basado en la estructura.

Actualmente, el descubrimiento de fármacos está diseñado con base en blancos moleculares, estudios genéticos, estudios en modelos animales transgénicos, biología molecular, tecnología génica y la ciencia de proteínas. El conocimiento estructural del

receptor y el ligando, junto con la utilización de técnicas biofísicas y los métodos computacionales han permitido estimar la afinidad de unión de nuevas entidades moleculares con actividad farmacológica, haciendo que el descubrimiento de fármacos se torne hacia un proceso más racional dejando de lado la serendipia [8], [107].

En lo que se refiere al cáncer, los avances en el conocimiento acerca de su fisiopatología han permitido establecer que perturbaciones en más de 500 moléculas señalizadoras contribuyen a su desarrollo. Sin embargo, la mayoría de los fármacos anti-cáncer identificados a la fecha están basados en solo unas pocas de estas moléculas señalizadoras [47], [48]. Actualmente, para muchos de los agentes quimioterapéuticos usados, el descubrimiento racional y las terapias dirigidas tienen roles mínimos, mientras que la serendipia y la coincidencia continúan jugando un papel importante. Dentro de aquellos agentes identificados por serendipia podemos encontrar el trióxido de arsénico, la artemisinina, la metformina, el metrotexate, la procarbazona, la talidomida y la rapamicina, entre otros [110].

1.1.6 Métodos computacionales aplicados en el descubrimiento de fármacos

Las ciencias bioquímicas experimentales y los métodos teóricos computacionales han desarrollado una relación sinérgica que ha venido creciendo en los últimos años, ya que han generado grandes beneficios en diferentes áreas de las ciencias biológicas, especialmente en la bioquímica y la biología molecular. Adicionalmente, han permitido grandes avances en la química medicinal para el diseño racional de fármacos [111]. Respecto al estudio teórico de los sistemas bioquímicos, uno de los más grandes beneficios es el conocimiento a nivel molecular de las estructuras actualmente estudiadas; esos estudios siguen un exhaustivo análisis de los sistemas biológicos, y el hallazgo de respuestas significativas a preguntas de investigación que son confrontadas con pruebas en los laboratorios.

Actualmente, existen diferentes metodologías computacionales que son usadas como herramientas bioinformáticas para el estudio de sistemas biológicos y el descubrimiento de fármacos. El uso de una u otra herramienta está ligado a los intereses investigativos, el nivel de cálculo deseado, las posibles limitaciones técnicas y el cómo y qué tipo de

información puede ser obtenida de los datos analizados y procesados. Algunos de los métodos principales son: el *docking* o acoplamiento molecular, diseño *de novo*, relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR), simulaciones de dinámica molecular (MDs) y el modelamiento molecular (MM) [112], [113].

La mayoría de estos métodos siguen un esquema de trabajo general que consiste en la selección de un blanco molecular, la validación de la estructura de este, la identificación del sitio de unión de los ligandos a evaluar en el blanco terapéutico, cálculos teóricos en el sitio de unión elegido, la optimización de los compuestos con afinidad para finalmente obtener un candidato a fármaco (Figura 1.10) [114].

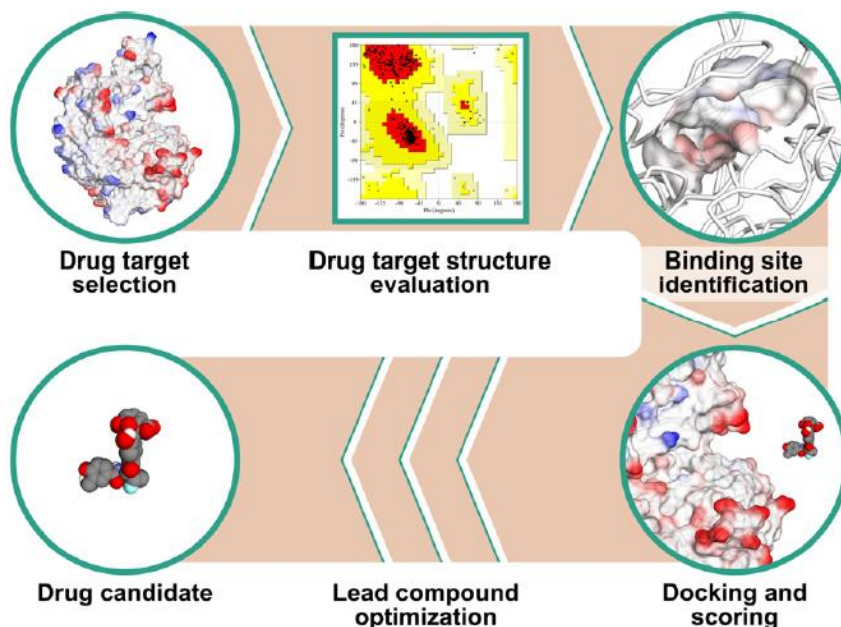


Figura 1.10 Esquema de trabajo en diseño de fármacos basado en la estructura. Tomado de [114].

Dentro de los principales métodos computacionales se pueden encontrar:

- Acoplamiento molecular (*Docking*). El objetivo principal de este método es predecir con la mayor exactitud posible el mejor modo de unión (conformación y orientación) de un ligando en su interacción con el receptor, mediante el uso de una función de puntuación, en un área conformacional que es definida por el sitio de unión del blanco molecular [115].

Las funciones puntuación tienen algunas desventajas debido a que estas no tienen en cuenta todas las fuerzas que intervienen entre el ligando y el receptor; además, también fallan en la contabilización de la solvatación del ligando, los cambios entrópicos que se generan cuando el ligando se une al receptor, la flexibilidad del receptor y los cambios conformacionales que se inducen al formarse el complejo ligando-receptor [116].

Para mejorar la afinidad de las predicciones, un proceso de re-puntuación con otras funciones sencillas o funciones de puntuación basadas en la solvatación son típicamente llevadas a cabo. Así, a las conformaciones generadas por los programas de *docking* se les aplican otros métodos como el MM/PBSA (mecánica molecular/área superficial de Poisson-Boltzman) y MM/GBSA (mecánica molecular/área superficial generalizada), los cuales incluyen la solvatación de los ligandos mejorando así la exactitud del *docking* [117], [118]. Otra estrategia es el uso de simulaciones de dinámica molecular (MDs) en las cuales se obtiene la información conformacional de los complejos obtenidos en el *docking*, para así obtener un cálculo de la energía de unión [119]. Con estas aproximaciones, la flexibilidad del receptor y la presencia de las moléculas de agua explícitas contribuyen a una descripción más realista del sistema de estudio, lo cual tendría una gran influencia en el cálculo de la energía de unión [113].

El *docking* es aplicado en diferentes etapas del proceso de diseño de fármacos para predecir el modo de unión de ligandos previamente conocidos [120]; también para la identificación de nuevos y potentes ligandos [121] y como una herramienta predictiva de la afinidad de unión [122]. Algunos de los ejemplos de la aplicación de este método en el diseño racional de fármacos pueden ser: el estudio teórico de agentes anti mitóticos con actividad anti cáncer [123], el estudio de los sitios de unión del receptor de estrógenos [124], la predicción de fármacos para el tratamiento de cáncer hipo faríngeo [125], la determinación del patrón de interacción entre las neurotoxinas de anemonas marinas y el canal de potasio Kv1.3 [126] y el comportamiento metabólico del anisol [127], entre otros.

- Diseño *de novo*. Esta metodología ha sido usada para encontrar nuevos y potentes ligandos selectivos. Es utilizada como una herramienta para el descubrimiento de nuevos ligandos y la optimización de estos [128], generando así nuevas estructuras moleculares con las propiedades farmacológicas deseadas [129], para luego ser sometidas a procesos de acoplamiento molecular y así obtener las afinidades y modos de unión.
- Cribado virtual. Su principal objetivo es la búsqueda de información específica en librerías de compuestos o moléculas con propiedades estructurales similares, en donde éstas puedan interactuar aceptablemente con un blanco terapéutico y es una herramienta importante para la generación de nuevos compuestos con propiedades *drug-like* [130]. El cribado virtual puede ser presentado en dos aproximaciones: aquellas basadas en el ligando (LBVS) y las basadas en la estructura (SBVS). La primera aplica en aquellos casos donde no se conoce la estructura tridimensional de la diana molecular (receptor), y se tiene un grupo de moléculas con alguna actividad biológica frente al receptor; pudiendo en estos casos determinar la relación estructura-actividad de estas [131]. Por otro lado, el SBVS establece un mecanismo de acción en el blanco molecular estudiado y comienza con la identificación de un potencial ligando que se una a un sitio de unión determinado. El desafío más grande que se tiene en esta aproximación es la determinación de la estructura 3D del receptor, haciendo uso de técnicas como RMN, cristalografía de rayos X o modelamiento molecular [113].

1.1.7 RMN en el descubrimiento de fármacos

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica transversal, cuyos fundamentos y/o aplicaciones abarcan todo el ámbito de las ciencias experimentales clásicas (matemáticas, física, química, biología y geología), las tecnologías (informática, ciencia de materiales) y las ciencias de la salud, en especial la medicina [132].

La espectroscopia RMN tiene un amplio rango de aplicaciones en la industria farmacéutica, la mayoría relacionadas al descubrimiento de fármacos. Dentro de las aplicaciones se incluyen su rol en la rutina analítica, siendo la más importante la elucidación estructural de candidatos sintéticos a fármacos y moléculas relacionadas, así como una importante

herramienta en la biología estructural, análisis de formulaciones y aplicaciones metabolómicas. El rol de la RMN en el descubrimiento de fármacos está definido como: la identificación de las propiedades estructurales de un ligando, solo o mientras está interactuando con su diana biológica, para guiar el mejoramiento de sus características farmacéuticas a través de la manipulación química [9].

Generalmente, los proyectos de descubrimiento de fármacos buscan encontrar compuestos líderes que modulen la actividad de una diana biológica. Una campaña típica de descubrimiento de fármacos puede ser dividida en varios pasos: descubrimiento del *hit*, validación del *hit* y la subsecuente caracterización y optimización [133]. El descubrimiento de *hits* puede llevarse a cabo usando diferentes estrategias, como el cribado de alta eficiencia (HTS) o el cribado basado en fragmentos (FBS) siendo este último el más popular.

En el HTS se inicia por el tamizaje de muchos compuestos que modulan la actividad de una macromolécula diana. Debido a que en esta estrategia el ensayo se encuentra automatizado para el cribado de alta eficiencia, grandes librerías de compuestos (con más de un millón de compuestos) pueden ser evaluadas. Sin embargo, este tipo de ensayos son altamente propensos a presentar falsos positivos o artefactos. Por lo tanto, en un segundo paso, los *hits* iniciales necesitan ser validados usando metodologías más refinadas como la espectroscopia RMN, con baja eficiencia en términos del número de moléculas que pueden ser evaluadas, pero con un alto poder informativo [133].

Por otro lado, el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos ("Fragment Based Drug Discovery" - FBDD) es una aproximación en la que moléculas pequeñas con características de fragmentos (*fragment-like*) son evaluadas, pero esta vez utilizando métodos biofísicos más robustos y sensibles, como la RMN y la resonancia plasmónica de superficie (SPR). Debido a la alta sensibilidad de estos métodos es posible la detección de interacciones débiles. Esto permite evaluar compuestos de bajo peso molecular, los cuales cubren una diversidad más amplia del espacio químico que las librerías comunes de HTS. Incluso si los fragmentos *hit* son usualmente más débiles en términos de afinidad que los *hits* derivados de procesos de HTS, estos son puntos de partida interesantes para una

futura optimización de la estructura del compuesto o fragmento, dado que su eficiencia del ligando, entendida como la afinidad por átomo, es típicamente más alta [134], [135].

La RMN puede ser aplicada en el proceso de descubrimiento de fármacos desde la fase inicial de genómica estructural y sus funciones donde es hecha la identificación de las dianas biológicas, contribuyendo a la elucidación de sus estructuras tridimensionales [136]. Posteriormente, en la fase de identificación de compuestos líderes, la RMN puede ser usada para la identificación de ligandos. Luego, en una siguiente fase, la RMN es útil en el análisis de metabolitos en fluidos biológicos que pueden ser relevantes en los procesos farmacocinéticos (ADME). Finalmente, en las etapas clínicas puede ser utilizada para diferenciar individuos sanos de pacientes, mediante el análisis metabolómico de células y fluidos (Figura 1.11) [137].

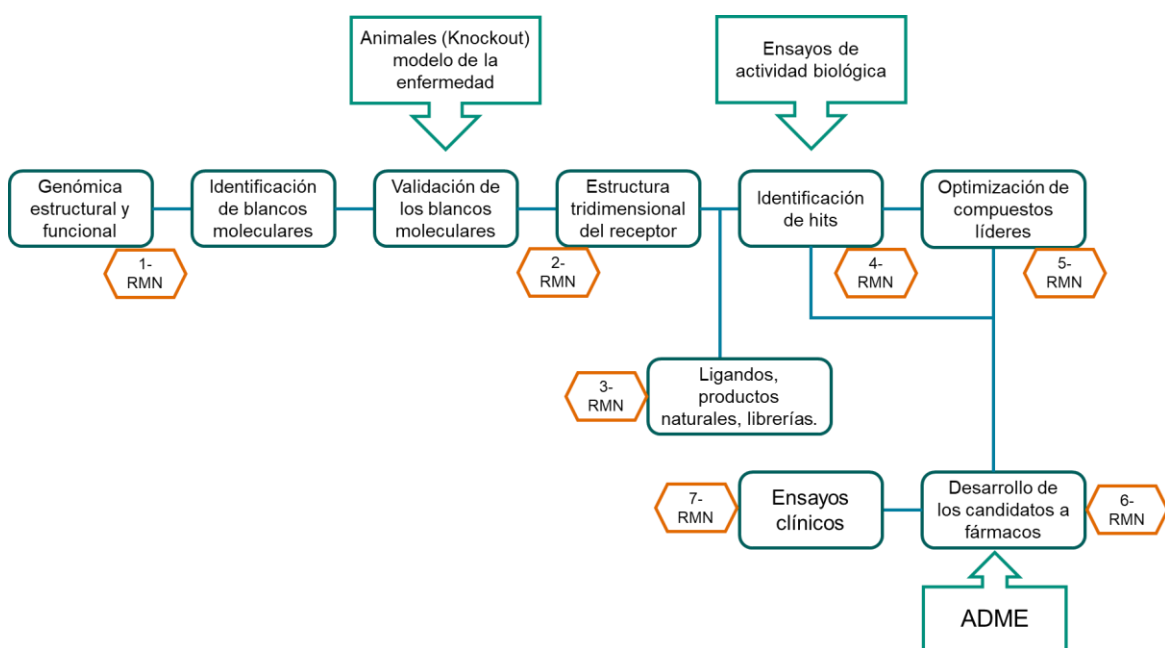


Figura 1.11 RMN en el proceso de descubrimiento de fármacos. 1-Determinación de la estructura 3D de proteínas sin conocimiento de la estructura primaria. 2-Información de la estructura y la dinámica del receptor en solución. 3-Elucidación estructural de los ligandos, determinación de estructura 3D, información de formación de agregados, información acerca de la estabilidad en solución. 4-Identificación de compuestos de media a baja afinidad. 5-Generación de ligandos de mayor afinidad. 6-Análisis de metabolitos en fluidos biológicos. 7-Análisis de células y fluidos para identificar individuos sanos y enfermos. Tomada y adaptada de [137].

La RMN es una de las técnicas analíticas que más proporciona información, superando incluso a métodos como la resonancia plasmónica de superficie (SPR), titulación calorimétrica isotérmica (ITC), ensayos de desplazamiento térmico o calorimetría en microescala (MST), entre otros [138], [139].

Adicionalmente, esta técnica tiene algunas características que la hacen particularmente valiosa para estudiar interacciones de ligandos con macromoléculas. Dentro de estas, se tiene que los estudios son llevados a cabo en solución, haciendo que no sea necesario tener una biomolécula inmovilizada en una superficie o columna, generando así un ambiente más cercano al fisiológico, teniendo flexibilidad conformacional completa y accesibilidad estérica alrededor de todo el volumen de la proteína. Finalmente, permite monitorear directamente el ligando y la biomolécula sin modificaciones [133].

El descubrimiento de fármacos basado en RMN ha ganado importancia en los últimos años [140]. Existen dos tipos de aproximaciones basados en RMN, los cuales son: aquellas basadas en la observación del ligando, en donde los parámetros del ligando son medidos y aquellas basadas en la observación de la diana molecular, donde los cambios en la macromolécula, generalmente perturbaciones en el desplazamiento químico, son evaluados [9].

Dentro de las aproximaciones basadas en el ligando se tienen algunos parámetros sensibles a las interacciones ligando-receptor como los tiempos de relajación, coeficiente de difusión molecular, efecto nuclear *Overhauser* (NOE), entre otros. Para analizar este tipo de interacciones existen los siguientes métodos por RMN:

- Experimentos de diferencia de saturación transferida. El experimento de diferencia de saturación transferida (STD) es el más comúnmente aplicado en los ensayos de observación del ligando [141]. Éste se basa en el experimento de diferencia en el efecto NOE comúnmente conocido como NOE diferencial [142]. Este experimento consiste en la adquisición de un par de espectros unidimensionales con un tren de pulsos de frecuencia selectiva, el cual es insertado en el tiempo de relajación.

En el primer espectro, denominado *off-resonance*, el centro de la frecuencia de excitación de los pulsos es aplicado a una frecuencia vacía de resonancias (alrededor de 30 ppm), con el objetivo de obtener un espectro de referencia donde no se observan las posibles interacciones que se presenten entre el ligando y la macromolécula. En el segundo espectro, *on-resonance*, el centro de la frecuencia reside alrededor de 0 a -2 ppm, la cual tienen el efecto de saturar selectivamente los núcleos de la macromolécula. Esta saturación se propaga virtualmente a todos los protones que resuenen con la proteína por la difusión de espín. El espectro *on-resonance* es luego sustraído del espectro *off-resonance* y la aparición de señales positivas en este espectro diferencial refleja la transferencia de magnetización desde los protones de la proteína a los protones del ligando, lo cual solo ocurre mediante la formación del complejo ligando-proteína (Figura 1.12).

Este experimento permite la selección de ligandos desde una mezcla de posibles ligandos en la presencia de una proteína en baja concentración (1 nM), ya que solo son visibles aquellas señales de los protones de las moléculas que presentan interacción con la proteína. Adicionalmente permite mediante ensayos de competición entre dos ligandos determinar el sitio de unión específico para estos ligandos, así como una estimación de la constante de disociación (K_D) para evaluar la fuerza relativa de la interacción ligando-proteína. Además, las porciones del ligando que interactúan con la proteína también llamadas epitopos son fácilmente identificadas por este método [141], [143].

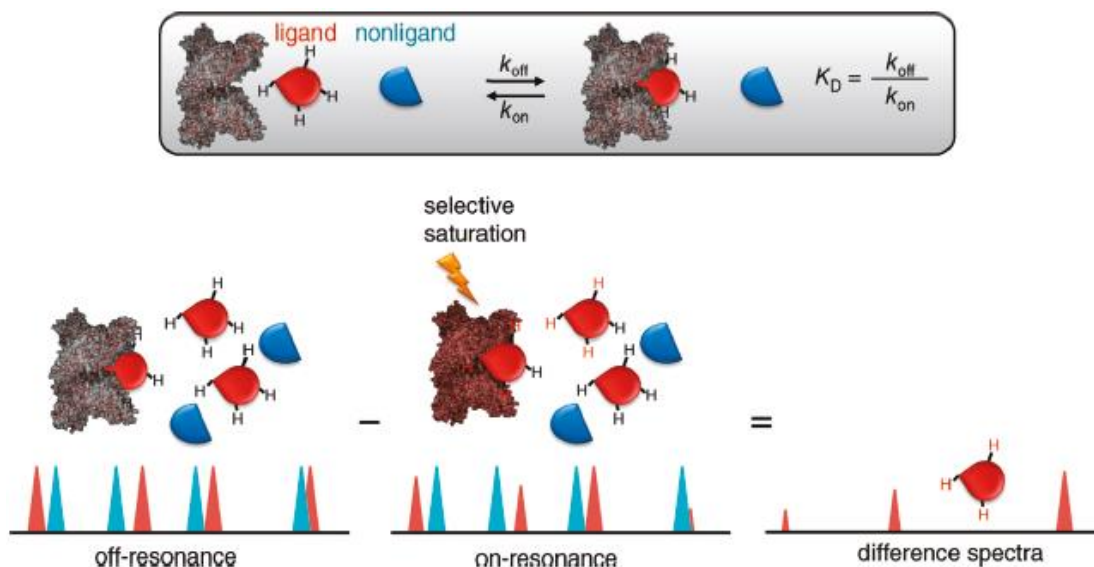


Figura 1.12 Esquema del experimento STD [144].

- Métodos basados en relajación. El tiempo de relajación transversal (T_2) para moléculas pequeñas es generalmente largo comparado con el de las macromoléculas. Es así como las señales de resonancia en un espectro de una molécula pequeña son mucho más finas y definidas que las de una macromolécula. Este fenómeno puede ser usado para detectar y caracterizar la unión de un potencial ligando en ausencia y presencia de una macromolécula objetivo, ya que cuando el ligando está en interacción con la diana molecular sus propiedades de RMN serán similares a las de la macromolécula objetivo (Figura 1.13) [145]. Cuando un ligando se une a una diana molecular, su peso molecular aparente incrementa, generando una relajación transversal más rápida (T_2) y por ende un ensanchamiento concomitante de las señales del ligando y el tiempo de correlación efectiva para el ligando unido, los cuales se incrementan. Cuanto mayor sea el tamaño de la macromolécula, menor será el valor de T_2 y así mismo será el efecto de ensanchamiento de las señales [146].

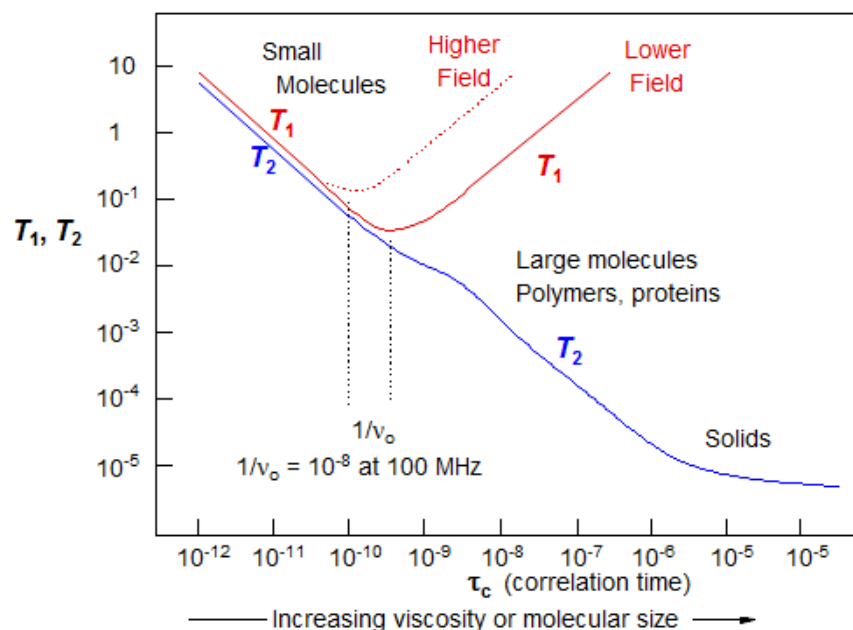


Figura 1.13 Variación de los tiempos de relajación T_1 y T_2 en función del aumento en el tiempo de correlación molecular [147].

- Transferencia de la magnetización ^1H desde el agua al ligando (WaterLOGSY). Así como el experimento STD, este experimento permite la detección de ligandos de bajo peso molecular, a través de la transferencia de magnetización intermolecular de los protones de las moléculas de agua que rodean el sitio de unión y el ligando [148]. Los ligandos interactúan directa o indirectamente con los espines invertidos del agua a través de interacciones dipolo-dipolo con un tiempo de correlación rotacional relativamente largo (asociado al tiempo de correlación del receptor) con una velocidad de relajación cruzada negativa (Figura 1.14). En ausencia de la interacción ligando-proteína, los rápidos movimientos brownianos de las moléculas de agua (tiempos de correlación cortos) y de los posibles ligandos, hacen que la velocidad de relajación cruzada sea positiva. Por otro lado, cuando ocurre la interacción ligando-proteína, al unirse el ligando se genera una transferencia de magnetización con las moléculas de agua unidas a la proteína, experimentando un decaimiento lento, generando NOEs negativos. En este experimento, las señales observadas no son en respuesta a la interacción directa del ligando con la proteína sino a través de la interacción con las moléculas de agua que rodean el sitio de unión del ligando en la proteína [9].

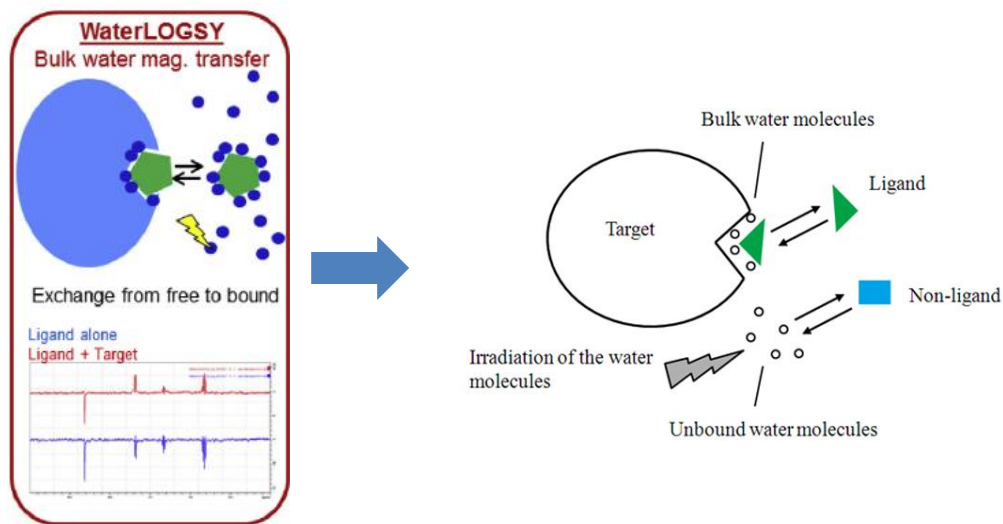


Figura 1.14. Esquema del experimento WaterLOGSY (tomado y adaptado de [9] y <http://fragmentech.univ-lyon1.fr/waterlogsy-experiment/>).

- Métodos basados en la observación de flúor-19. El núcleo de ^{19}F tiene una sensibilidad menor en tan solo un 17 % a la del núcleo de ^1H , además de no presentar interferencias del *background* biológico. Con estas características, estas metodologías se han convertido en una herramienta útil en la detección de ligandos con afinidad por una diana molecular en el cribado de librerías de compuestos [149]. En la observación directa de los núcleos de ^{19}F en un experimento T_2R , los fragmentos que contienen flúor y que se unen a la diana de interés pueden ser identificados de manera análoga a los experimentos de RMN- ^1H , pero con una menor interferencia del *background*. Dado que muchos de los ligandos de interés contienen átomos de flúor en su estructura, una aproximación que registre tanto los núcleos de ^{19}F y ^1H es posible y proveerá mayor información acerca de la interacción generada. Una alternativa para aquellos casos en donde los ligandos no contienen flúor, es el empleo de un ensayo de desplazamiento en donde el blanco molecular es complejado con un ligando marcado con ^{19}F que puede posteriormente ser desplazado competitivamente por los ligandos de interés. Este desplazamiento genera una disminución en el ancho de las señales de ^{19}F en el espectro [9].

-
- Métodos basados en NOEs de transferencia (TRNOE). La unión de ligandos de bajo peso molecular a una diana molecular reduce la velocidad de los movimientos brownianos de los ligandos, en proporción al tamaño del complejo formado. Esto genera incrementos medibles en la tasa de transferencia de magnetización interprotones en el ligando unido comparado con el ligando libre. Estos incrementos son denominados NOEs de transferencia (TRNOE), los cuales pueden ser medidos haciendo uso de experimentos 1D o 2D sobre mezclas de ligandos en presencia de la proteína diana para determinar las distancias interatómicas entre protones [9]. Estos datos son luego usados para descifrar el modo de unión correcto de los ligandos [150]–[152]. Uno de los factores más críticos a considerar en este método es la constante de disociación del complejo ligando-proteína, ya que este es el determinante de la calidad de los espectros obtenidos. Se espera que la velocidad de disociación sea alta, preferiblemente 10 veces más rápida que el tiempo efectivo de relajación T_1 para la correcta aplicación de este experimento [152].
 - Métodos basados en NOEs inter-ligando (ILOE). En este caso el sistema donde se aplican estos métodos son mezclas ternarias, compuestas por un blanco molecular sin marcaje isotópico y dos compuestos orgánicos de bajo peso molecular, proveyendo una poderosa herramienta para elucidar complejos ligando-proteína cuando múltiples ligandos se unen simultáneamente [153]. Su aplicación típica se basa en la identificación de un *hit* secundario que se une al blanco molecular en presencia de un *hit* primario, cuando ambos se unen simultáneamente a la macromolécula en la proximidad de cada uno de ellos, los ILOEs determinan la orientación de las dos moléculas una con respecto a la otra. La magnitud de los ILOEs en el espectro está determinada por la proximidad espacial de los dos compuestos (Figura 1.15).
 - INPHARMA. Con esta metodología es posible detectar la transferencia de magnetización inter-ligando de protones, a través de dos moléculas que nunca han estado en contacto espacial directo, es decir se genera la unión de dos ligandos al mismo sitio de unión en la superficie de la proteína pero en diferentes puntos temporales [154]. Cuando el ligando 1 se une a la proteína (en un sitio de unión conocido), sus protones eficientemente intercambian la magnetización con los protones espacialmente adyacentes en la proteína; en otro punto de tiempo el

ligando 2 se une a la misma cavidad proteica que el ligando 1, así la magnetización transferida por el primer ligando, que ha sido temporalmente almacenada en el sitio de unión de la macromolécula, es transferida ahora al ligando 2. Finalmente, el resultado neto es el intercambio de magnetización (NOE) del ligando 1 al ligando 2. Estos son inhibidores competitivos y de uno de ellos se conoce su modo de unión y afinidad, por lo tanto el patrón e intensidad de los NOEs entre ellos revela el modo de unión relativo de un ligando respecto al otro, así como su afinidad (Figura 1.15) [155]–[157].

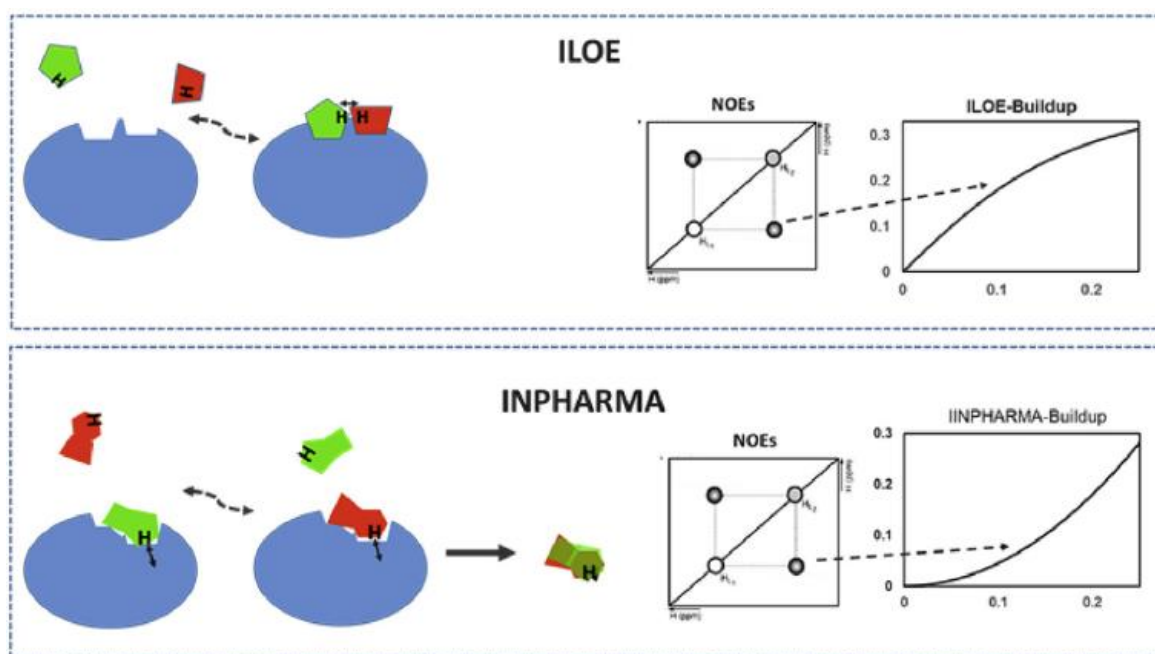


Figura 1.15 Métodos para la optimización de *hits* basados en NOEs interligando [9].

Por otro lado, existen otras aproximaciones basadas en la observación de las señales de la macromolécula de interés. Este tipo de aproximaciones permiten obtener información estructural detallada a nivel atómico de los sitios de unión, la cual puede influenciar directamente la optimización de los *hits* para convertirse en compuestos líderes [9]. Con este tipo de experimentos es posible discernir la localización del sitio de unión en la diana molecular. Adicionalmente, los *hits* pueden ser clasificados de acuerdo a su afinidad, frecuentemente con una pequeña dependencia o independencia de otros ensayos biofísicos o bioquímicos. Los experimentos más comunes son el ^1H - ^{15}N HSQC o ^1H - ^{13}C

HSQC, los cuales requieren el marcaje isotópico de las macromoléculas, bien sea con ^{15}N o ^{13}C y en ocasiones incluso con ^2H aumentando considerablemente los costos, además de requerir una mayor cantidad de macromolécula [158].

Si bien la identificación de los *hits* es un punto crítico para el diseño y desarrollo de un fármaco, la optimización de estos es igual de crítica y se requieren herramientas que faciliten este proceso de transición desde un ligando de baja afinidad hasta un ligando de alta afinidad [159]. Al igual que en la etapa de identificación existen dos tipos de metodologías, aquellas basadas en el ligando y las basadas en el blanco molecular, estas son empleadas usualmente para hacer una determinación rápida del modo de unión de estos ligandos a la macromolécula de interés. Al igual que en los procesos de cribado, los experimentos STD y T_2R , son utilizados en la etapa de optimización, en la determinación de las afinidades de unión *post-screening*, como lo son la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) y el mapeo de grupo epítopo [143].

Finalmente, si bien su desarrollo y mayor campo de aplicación se ha dado a partir de librerías combinatorias, también se han encontrado aplicaciones de estas estrategias como herramientas de cribado y optimización de fármacos de origen natural, contra diferentes dianas biológicas. Una de ellas es mediante la utilización de los experimentos STD, TR-NOESY y STD-TOCSY. Estas aproximaciones hicieron posible la identificación de cómo y qué tipo de compuestos se unen a la albumina bovina sérica en el extracto hidro etanólico de *Rauia reinous*; logrando identificar así, que la isovitexina-2-ramnósido es el compuesto con mayor afinidad por la proteína de interés. Así mismo fue posible obtener el mapeo de epítopo, el cual fue posteriormente confirmado mediante métodos computacionales como el acoplamiento molecular [160].

Otro ejemplo es el reconocimiento molecular del ácido rosmarínico, aislado de *Salvia sclareoides*, por la enzima acetilcolinesterasa mediante el uso de experimentos de STD y TR-NOESY, permitiendo la identificación de un ligando que se une a un sitio de unión diferente al sitio de unión de la acetilcolina, generando un nuevo *scaffold* para el diseño de inhibidores alostéricos de la enzima acetilcolinesterasa en nuevo sitio de unión [161]. En la búsqueda de compuestos útiles para el tratamiento de la tuberculosis, la enzima cisteinil transferasa micotiol ligasa de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*; también ha sido utilizada para entender el modo de unión de diferentes inhibidores de la enzima tRNA

sintetasa, como la ocratoxina A, borrelidina, mupirocina, entre otros, por medio de la combinación de experimentos STD y métodos computacionales que permiten la realización de modelos de acoplamiento molecular. Estos métodos generan información importante para el diseño de nuevos inhibidores basado en la estructura de la enzima y las interacciones claves para presentar la inhibición de la enzima [162].

Con esta revisión se presenta un panorama que resalta por un lado la importancia de la investigación en cáncer, específicamente en la búsqueda de agentes antitumorales que contribuyan a la terapéutica de esta enfermedad enfocándose en los agentes antimetabólicos para la inducción de apoptosis; por otro lado, se muestra una visión general de la diversidad química y el potencial de los diterpenos de presentar actividad antitumoral. Finalmente, se mostró cómo la integración de técnicas biofísicas como la RMN que presenta una gran versatilidad y provee una gran cantidad de información útil en el proceso de descubrimiento de fármacos. Esto permitió evidenciar como la RMN junto con ensayos *in vitro* y métodos computacionales, estos últimos que complementan los resultados obtenidos experimentalmente, pueden ser usados para establecer modelos de unión ligando-receptor útiles en el proceso de optimización de *hits* para la obtención de compuestos líderes, siendo esta la aproximación metodológica seguida para el desarrollo de esta tesis.

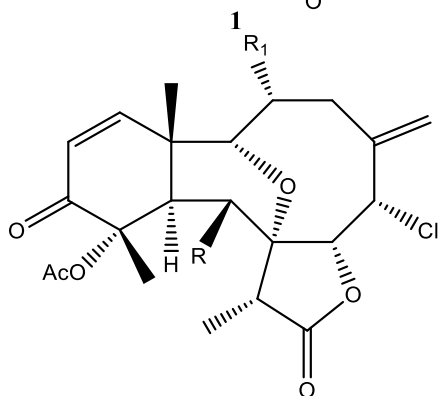
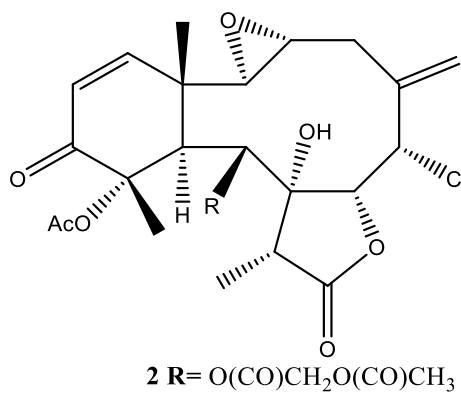
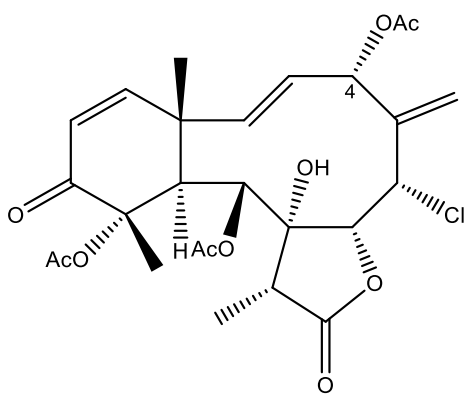
2. Resultados y discusión

2.1 Construcción de la librería de diterpenos de origen marino

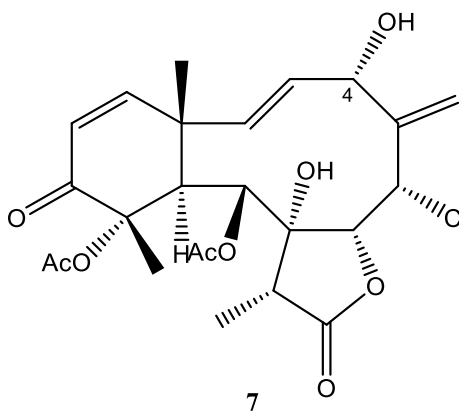
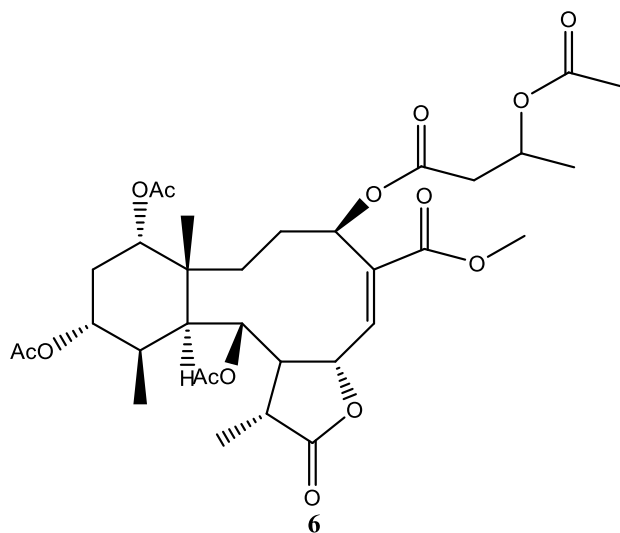
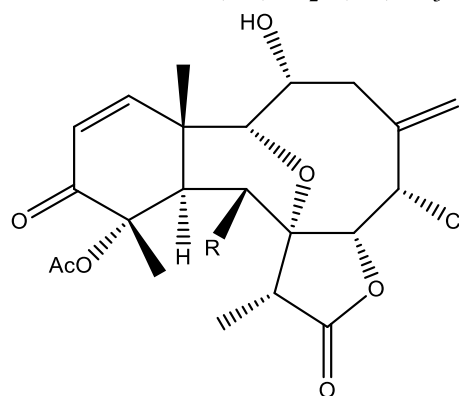
Como se mencionó en los aspectos teóricos y el estado del arte, los productos naturales y en especial los productos naturales marinos son una fuente prolífica para la obtención de moléculas con actividad antitumoral [163]. Dentro de estos, los diterpenos son uno de los más promisorios en términos de compuestos con actividad citotóxica, varios estudios han revelado que este tipo de compuestos presentan interacción con la tubulina [94].

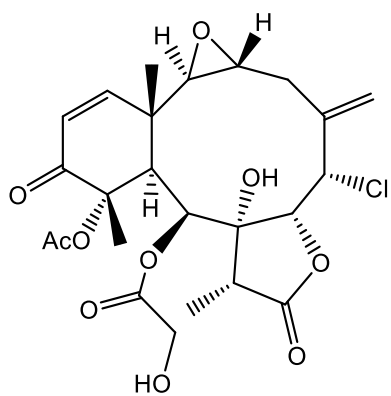
Bajo esta premisa, se seleccionaron una serie de diterpenos, principalmente aislados de octocorales, y algunos semi sintéticos. Una de las condiciones principales que deben cumplir estos compuestos para ser incluidos en la librería, es que cuenten con una cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica y los estudios de interacción por RMN. Con esto, se construyó una librería compuesta por 32 compuestos, 12 con núcleo briarano, 17 cembranos (6 semi-sintéticos y 11 naturales) y 3 con núcleo dolabellano aislados y obtenidos de octocorales de los géneros *Eunicea*, *Plexaura* *Pseudoplexaura* y *Erythropodium*, en varios de los trabajos de nuestro grupo de investigación [164]–[168].

Inicialmente se procedió a evaluar su pureza y estabilidad química a través del uso de técnicas cromatográficas como la cromatografía en capa delgada CCD y por RMN. Aquellos compuestos que estaban puros y no presentaban degradación bajo las condiciones de análisis fueron seleccionados para hacer parte de la librería y son presentados en la Figura 2.1.

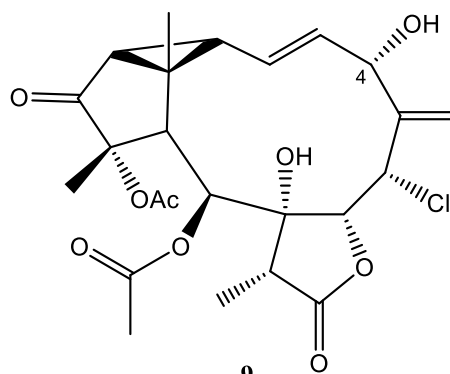


4 R= O(CO)CH₂O(CO)CH₃; R₁= OH

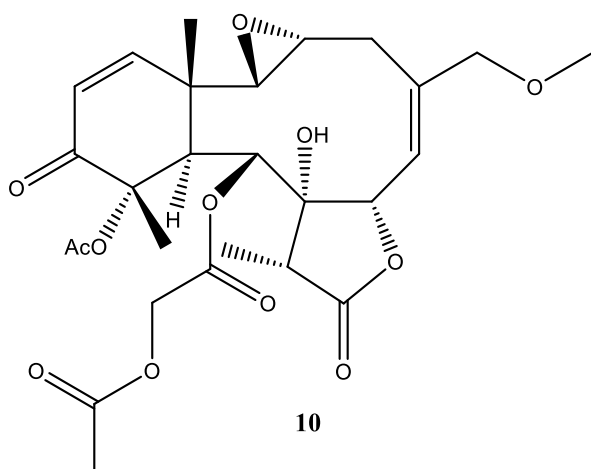




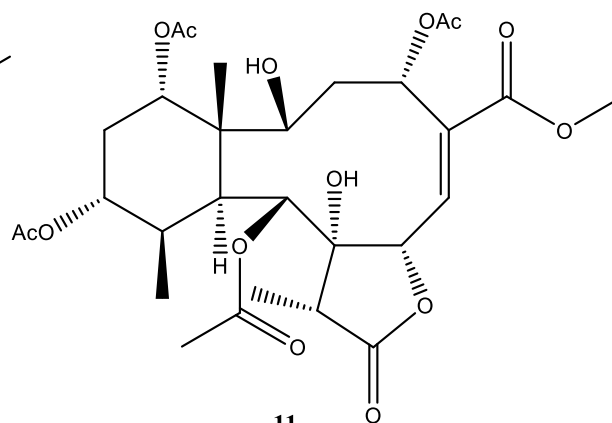
8



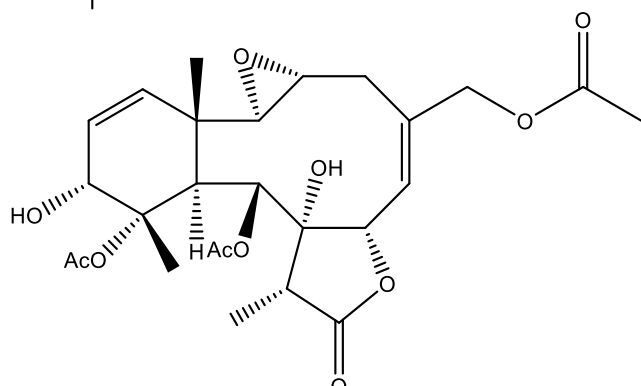
9



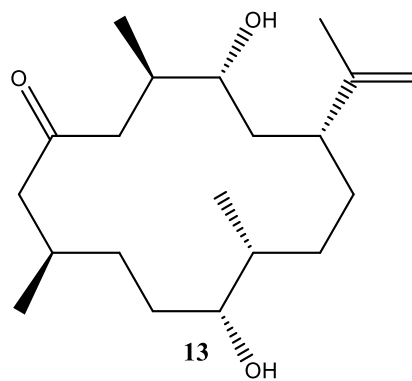
10



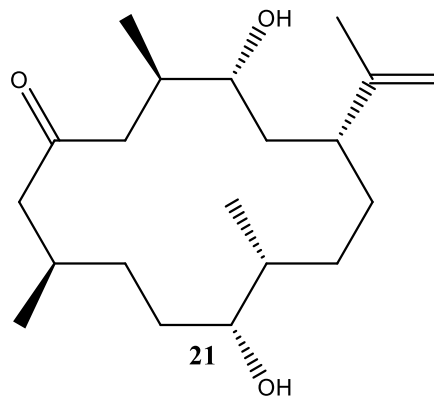
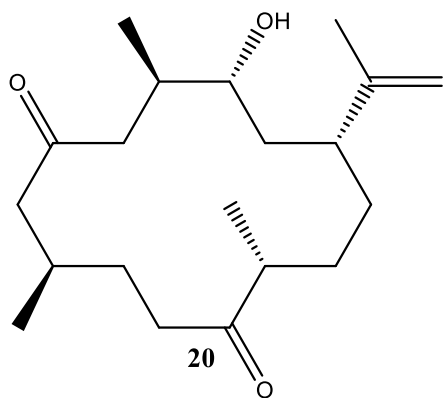
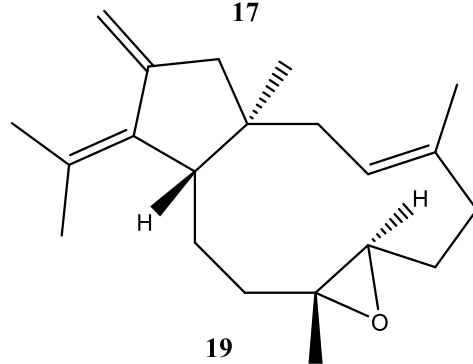
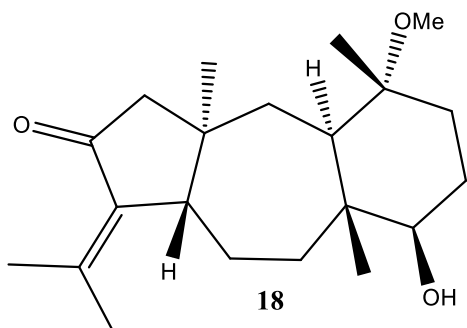
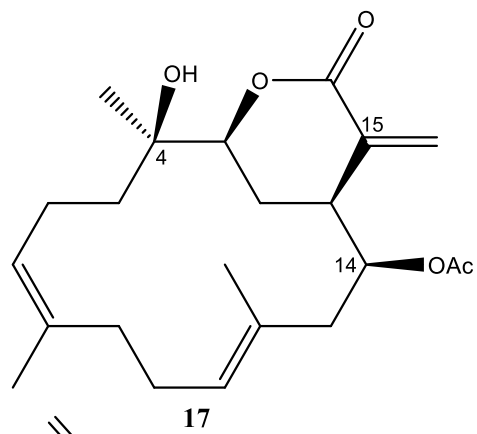
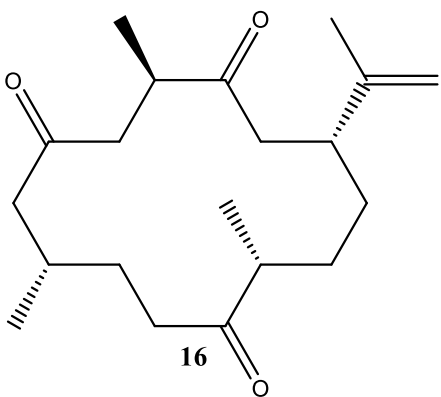
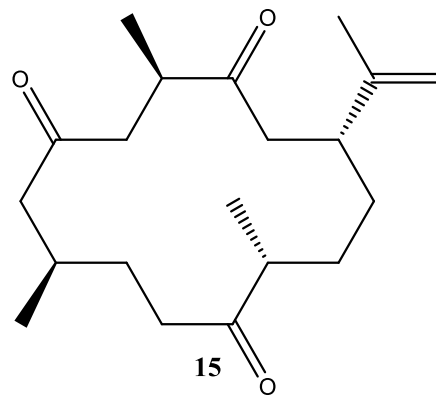
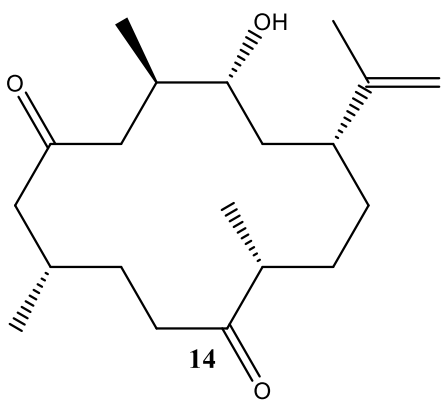
11

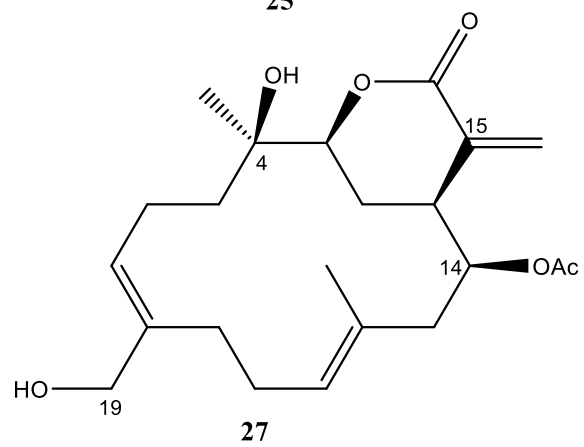
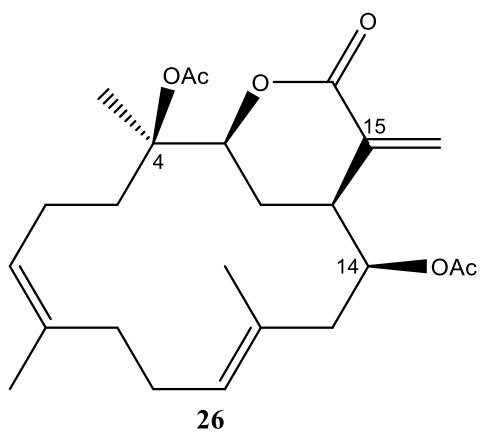
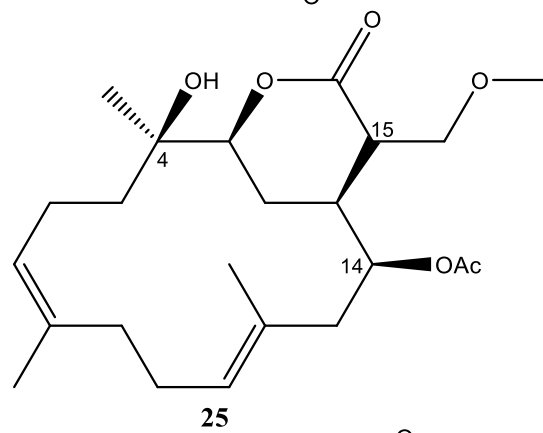
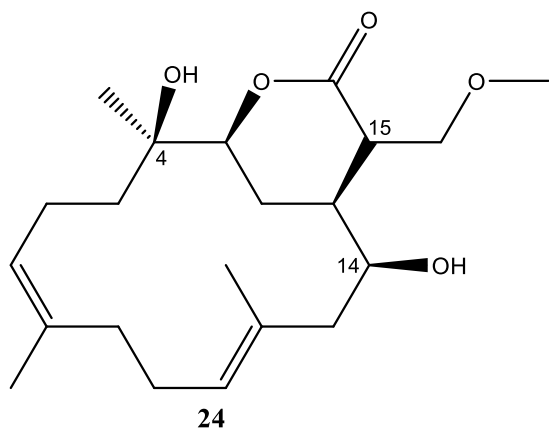
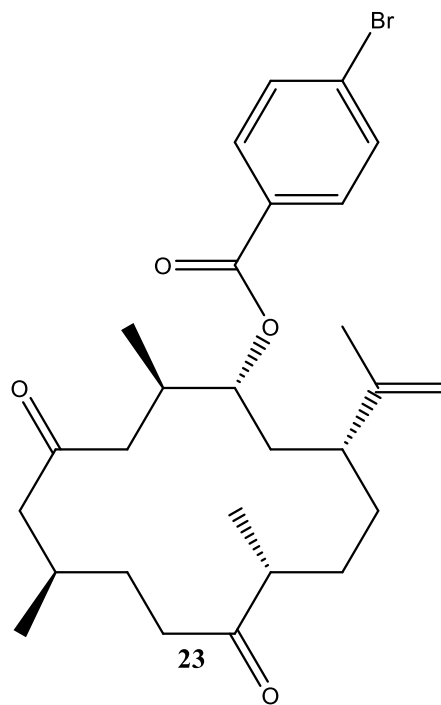
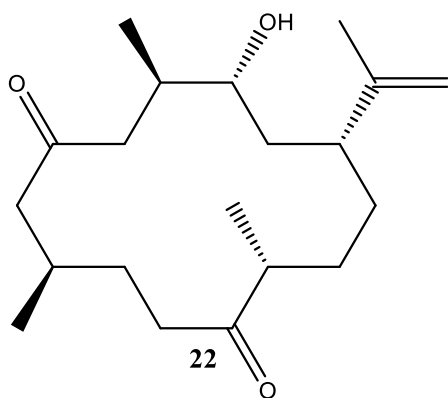


12



13





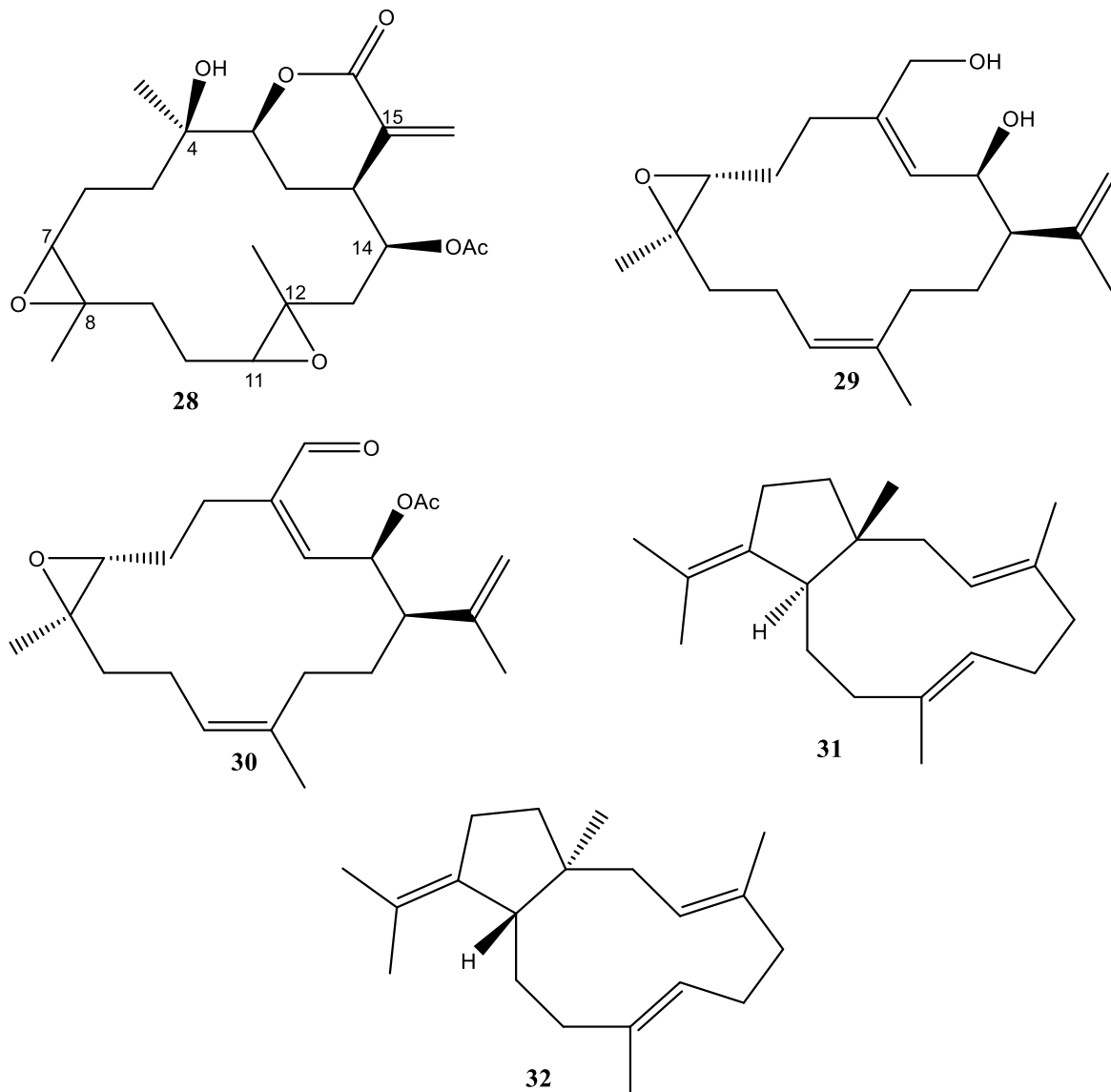


Figura 2.1 Compuestos de la librería de diterpenos de origen marino considerados en este trabajo.

2.2 Evaluación de la actividad citotóxica de la librería de diterpenos

La actividad citotóxica de cada uno de los 32 compuestos de la librería fue evaluada usando el ensayo de viabilidad celular MTT (sección 4.2). El formazan generado por la reducción del MTT por acción de las enzimas oxidorreductasas presentes en las células viables, fue medido como indicativo de viabilidad celular. Los valores de IC_{50} para cada compuesto frente a las 3 líneas tumorales evaluadas son presentados en la Tabla 1, en negrita y resaltados con color azul se encuentran los compuestos más activos y seleccionados.

Aquellos compuestos que presentaban valores de IC_{50} menores a 30 μ M frente a las tres líneas celulares evaluadas, fueron considerados como compuestos citotóxicos y seleccionados para ser evaluados frente a la tubulina y a la caracterización del proceso de muerte celular. De los 32 compuestos, 9 no presentaron actividad frente a ninguna de las 3 líneas celulares evaluadas, 11 presentaron actividad solo frente a una línea celular en su mayoría frente a la línea PC3 y 8 presentaron una actividad citotóxica intermedia. Los compuestos citotóxicos seleccionados fueron **1**, **17** y **26**.

Tabla 1 Concentración inhibitoria 50 de cada uno de los compuestos de la librería, expresada como concentración inhibitoria 50 ± error estándar

ID	IC ₅₀ A549 (µM)	IC ₅₀ MCF7 (µM)	IC ₅₀ PC3 (µM)
1	27.08 ± 4.26	15.21 ± 2.32	6.45 ± 0.96
2	2.57 ± 2.57	42.45 ± 4.34	60 ± 5.55
3	> 120	73.87 ± 5.03	> 120
4	46.49 ± 7.92	116.43 ± 12.97	> 120
5	> 120	> 120	> 120
6	37.93 ± 3.91	56.06 ± 3.78	42.49 ± 3.54
7	75.28 ± 18.31	> 120	> 120
8	36.65 ± 5.84	> 120	> 120
9	101.72 ± 20.72	> 120	> 120
10	> 120	> 120	> 120
11	> 120	> 120	> 120
12	> 120	113.11 ± 16.04	> 120
13	97.65 ± 11.40	> 120	> 120
14	> 120	> 120	61.86 ± 8.87
15	93.17 ± 14.66	> 120	110.24 ± 22.40
16	> 120	> 120	74.98 ± 8.33
17	3.98 ± 1.32	2.06 ± 0.90	0.26 ± 0.03
18	> 120	> 120	> 120
19	47.94 ± 8.59	50.48 ± 6.84	105.63 ± 12.03
20	> 120	> 120	> 120
21	> 120	> 120	> 120
22	> 120	> 120	> 120
23	> 120	> 120	37.56 ± 7.89
24	> 120	> 120	91.81 ± 9.80
25	> 120	> 120	> 120
26	61.35 ± 7.88	6.23 ± 0.53	15.41 ± 1.19
27	42.37 ± 10.44	21.55 ± 2.27	> 120
28	> 120	37.69 ± 7.10	87.76 ± 8.13
29	> 120	> 120	39.61 ± 8.05
30	76.06 ± 12.73	> 120	31.76 ± 3.64
31	> 120	> 120	82.57 ± 9.30
32	> 120	> 120	> 120

El compuesto **1** es un diterpeno con núcleo briarano, de origen natural, aislado del octocoral caribeño *Erythropodium caribaeorum* [169] y corresponde al erythrólido B. Este

compuesto es altamente relacionado con el erythrólido R (**7**), ya cuya única diferencia es la presencia de un grupo hidroxilo libre en la posición 4, que en el compuesto **1** se encuentra acetilado. Esto sugiere la importancia de este grupo en la actividad citotóxica de este diterpeno frente a las líneas celulares evaluadas. Es importante resaltar que el ligando **1** presenta valores de IC₅₀ promisorios, por debajo de 30 µM. Siendo esta la primera vez que se reporta la actividad citotóxica para este compuesto.

Por otro lado, el compuesto **17** corresponde al acetato de crassina, un diterpeno de origen natural aislado por primera vez del octocoral *Pseudoplexaura porosa* en 1970 [170]; este compuesto es conocido por presentar una gran variedad de actividades biológicas dentro de las que se encuentran actividad antiinflamatoria [171], inmunosupresora [172] y es reconocido como uno de los primeros compuestos de origen marino con actividad antitumoral [173]. Este compuesto presentó los valores de IC₅₀ más bajos frente a las tres líneas tumorales de todos los compuestos de la librería, con valores por debajo de 4 µM, perfilándolo así como el compuesto más promisorio de la librería de diterpenos. Finalmente, el compuesto **26**, un derivado semisintético del acetato de crassina presentó valores de actividad citotóxica moderados comparados con los obtenidos para el compuesto **17**.

Es importante resaltar que los compuestos **24**, **25**, **27** y **28** son análogos estructurales del acetato de crassina, los cuales presentan algunas modificaciones semi-sintéticas en su estructura. Estas modificaciones no generaron un aumento en la actividad citotóxica presentada por el precursor (**17**), lo cual indica que la oxidación del doble enlace exo cíclico de la posición 15 y la adición de una cadena alifática de dos átomos de carbono para el caso de **24**, la oxidación de la posición alílica 19 (**27**) ni la epoxidación de los dobles enlaces en las posiciones 7 y 11 (**28**) generan una mejora en el valor de IC₅₀ observado. Con esto es posible inferir que la actividad citotóxica se presenta cuando estas posiciones no se encuentran oxidadas y el tipo de interacciones que presentan con el blanco molecular que están interactuando, son principalmente de tipo hidrofóbicas. Esto en contraste con un trabajo realizado al interior del grupo de investigación Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia de la Universidad Nacional de Colombia, en donde estos mismos compuestos fueron evaluados frente a la enzima acetil colinesterasa, se observó actividad tanto en el precursor acetato de crassina como en sus derivados [174]. Así, una nueva aplicación para estos compuestos es presentada en este trabajo, en donde se observan claras diferencias en términos de relación estructura-

actividad, en este caso para la actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer humano.

Con estos resultados se seleccionaron tres compuestos con actividad citotóxica derivados de una librería de 32 diterpenos marinos, que presentan alto potencial como agentes antitumorales. A continuación se muestra la evaluación de estos compuestos en la caracterización del proceso de muerte celular observado. Esto se hará mediante el uso de ensayos biológicos *in vitro* como la citometría de flujo, con el fin de contribuir a la elucidación del mecanismo de acción por el cual estos compuestos están generando la actividad citotóxica observada.

2.3 Estudio del proceso de muerte celular

El estudio del proceso de muerte celular se llevó a cabo a través del uso de citometría de flujo, el primer aspecto a evaluar fue determinar si la muerte celular observada se genera a través de un mecanismo de muerte programada (apoptosis) o por medio de un mecanismo de necrosis.

Para poder diferenciar las células necróticas de las células apoptóticas se utilizó el ensayo de afinidad anexina V y el marcador de viabilidad celular 7AAD. En donde aquellas células que solo presenten tinción con el fluorocromo 7AAD serán consideradas como células necróticas y aquellas células que presenten tinción con anexina V se encontrarán bajo un proceso de apoptosis.

En las células eucariotas, los fosfolípidos en la membrana citoplasmática se encuentran distribuidos asimétricamente, es decir no existe una agrupación de aminofosfolípidos sino que se encuentran distribuidos en conjunto con fosfatidilcolina y esfingomiolina a lo largo de la membrana citoplasmática sin ningún patrón de distribución [175], [176]. Dentro de estos, los aminofosfolípidos como la fosfatidilserina se encuentran confinados en la porción citoplasmática de la membrana celular en condiciones normales. La distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática, es regulada por tres tipos de enzimas translocasas de fosfolípidos [177] dependientes de la hidrólisis de ATP para ejercer su actividad catalítica. Dentro de estas, las flippasas (cuya función es translocar la fosfatidilserina desde la parte externa de la membrana a la parte interna de la membrana) y las escramblasas (encargadas de translocar la fosfatidilserina desde el interior de la

membrana al exterior) son las más importantes en el proceso de apoptosis [143]. En su estructura las flippasas cuentan con un sitio de unión para las caspasas 3 y 7, las cuáles inactivan de manera irreversible las flippasas impidiendo así la translocación de la fosfatidilserina hacia la parte interna de la membrana [178]. En células apoptóticas, la translocación de la fosfatidilserina al exterior de la membrana celular es generada por la enzima escramblasa Xkr8, la cual tiene un dominio de activación transmembranal de unión a caspasas 3/7; estas se unen al sitio de unión generando de manera irreversible la exposición de la fosfatidilserina, y desactivando el sistema de translocación exterior-interior. La traslocación irreversible de este fosfolípido a la porción externa de la membrana hace posible el reconocimiento y unión del fluorocromo de anexina V generando una respuesta positiva para células en apoptosis.

En cambio en las células vivas, si bien se genera la translocación de la fosfatidilserina al exterior de la membrana, por el sistema de escramblasas independiente de caspasas (TMEM16F) [179], el sistema de flippasas se encuentra activo ya que no se cuenta con la presencia de las caspasas intracelularmente, haciendo que esta translocación sea reversible y la interacción con la anexina V no se genere, logrando así diferenciar de manera inequívoca células vivas de células en apoptosis. Así, esta metodología permite diferenciar adecuadamente las células vivas de aquellas células en procesos de apoptosis, debido a que la anexina V se une de manera específica y con una alta afinidad al amino fosfolípido fosfatidilserina [180].

Por otro lado, para identificar muerte por necrosis se usa al 7AAD como marcador de necrosis. Éste se une al ADN en las regiones de citosina-guanina [181]. Cuando se genera muerte celular por necrosis, se da una ruptura de las membranas celulares lo que permite que el fluorocromo puede ingresar a la célula y unirse al material genético. Adicionalmente, en la etapa final de la apoptosis (apoptosis tardía) se permea la membrana citoplasmática permitiendo la entrada del fluorocromo lo cual genera una respuesta positiva para este [23].

Las células tras ser tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados fueron teñidas con anexina V-FITC y 7AAD como se mencionó en la metodología (Sección 4.3.). Cabe resaltar que, debido al crecimiento adherente de la línea celular evaluada, una de las primeras variables a evaluar y determinar fue el método de desprendimiento de las células de la placa de cultivo sin generar afectaciones. Varios

autores recomiendan el uso de tripsina 1x para el desprendimiento de las células [182]. Inicialmente, se evaluó el desprendimiento de las células mecánicamente, pero se observaba una gran cantidad de células en necrosis debido a la ruptura de las membranas, al igual que haciendo uso de buffers de disociación. Finalmente, se determinó que el método más adecuado para el desprendimiento de las células era el uso de tripsina 1x.

Las células fueron tratadas con concentraciones de los compuestos **1**, **17** y **26** que representaban el 25 %, 50 % y 75 % de muerte celular de cada uno de los compuestos. Luego fueron teñidas con los fluorocromos respectivos y posteriormente analizadas por citometría de flujo. Para el compuesto **1** se observó una inducción de apoptosis en las células tumorales (Figura 2.2 B, C y D), ya que al aumentar la concentración de **1** aumenta la población de células en apoptosis (células en el cuadrante Q1 y Q2). A la concentración IC_{25} se observa que alrededor del 35 % de las células se encuentran en apoptosis temprana (Figura 2.2 E) y un 25 % en apoptosis tardía; al aumentar esta concentración IC_{50} se observa que el 50 % de las células se encuentran en apoptosis tardía lo que indica que este compuesto está generando muerte celular en las células tumorales a través de la activación de los mecanismos de apoptosis. Sin embargo, este compuesto presenta una alta toxicidad debido a que a bajas concentraciones se observa el 50% de células en apoptosis tardía.

El compuesto **17** presenta una toxicidad menor a la de **1**, y también se observa la evidencia de que la muerte celular está ocurriendo a través de un mecanismo de apoptosis. A la concentración IC_{25} se observa que aproximadamente un 15 % de las células está en apoptosis temprana, ya que solo presentan respuesta positiva para el fluorocromo Anexina V-FITC (Figura 2.3 B); con el aumento de la IC_{50} aumenta tanto la población de células en apoptosis temprana como en apoptosis tardía, siendo esta la mayor proporción con un 50% de la población celular en este estadio de muerte celular (Figura 2.3 C); finalmente para la IC_{75} se observa que se mantiene la población de células en apoptosis tardía pero aumenta la población de células en necrosis (Figura 2.3 D y E), lo que puede indicar que a altas concentraciones este compuesto puede estar generando necrosis en las células.

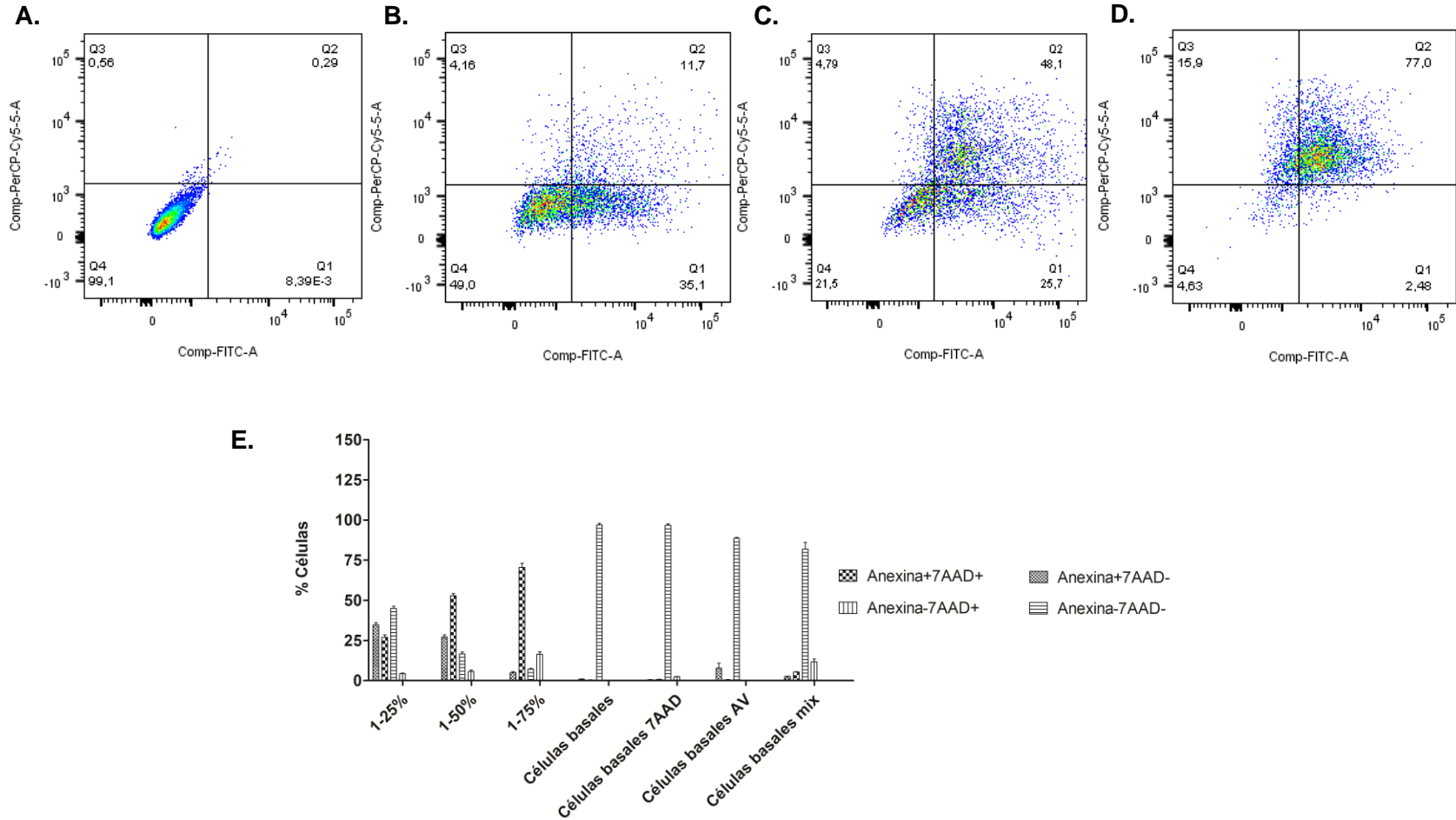


Figura 2.2 Resultados de los ensayos de inducción de apoptosis por citometría de flujo. Diagrama de cuadrantes células sin tratamiento (A), IC_{25} del compuesto **1** (B); diagrama de cuadrantes de las células tratadas con la IC_{50} de **1** (C); células tratadas con la IC_{75} (D); histograma de la proporción de células positivas para cada uno de los fluorocromos.

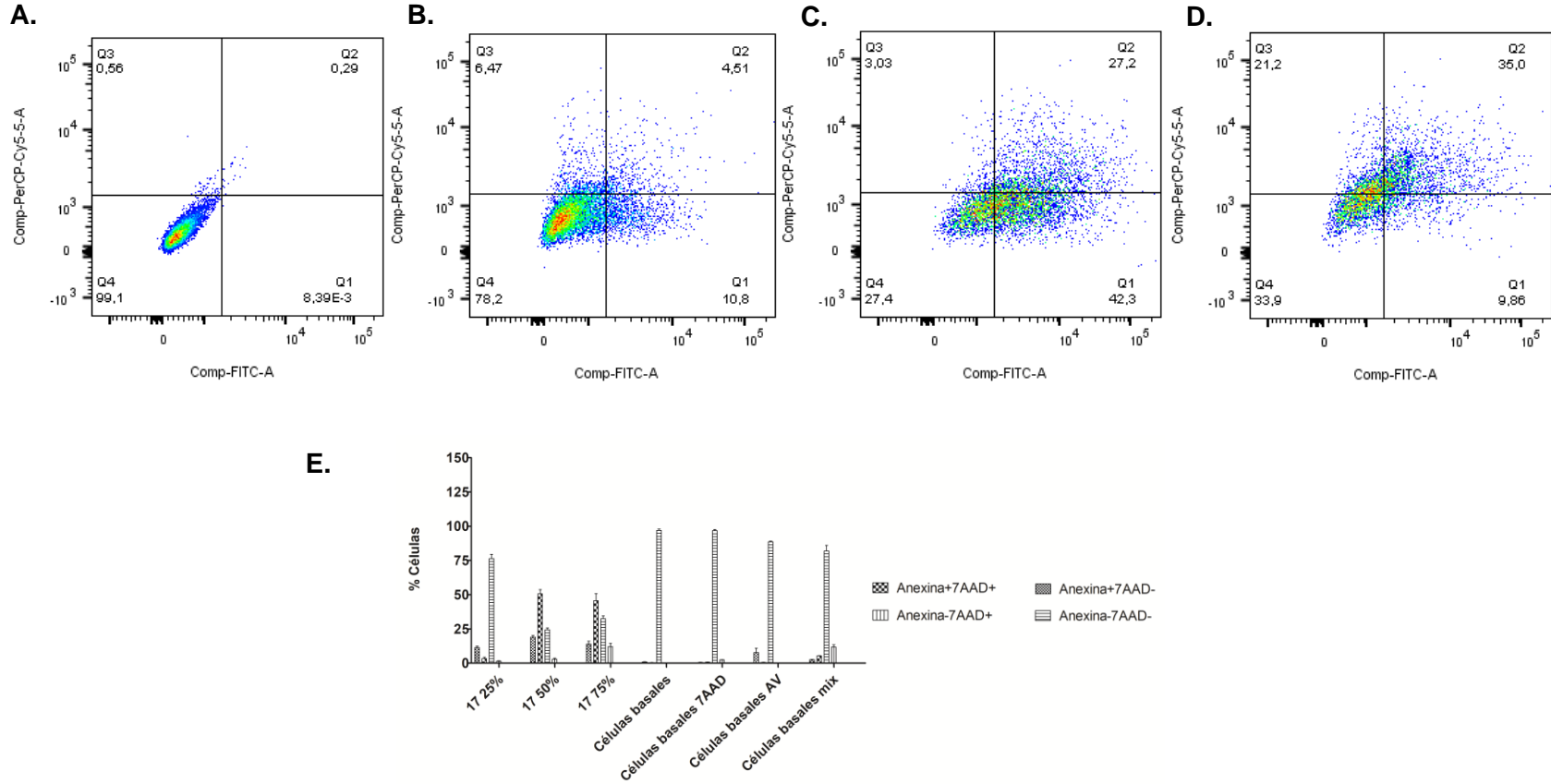


Figura 2.3 Resultados de los ensayos de inducción de apoptosis por citometría de flujo. Diagrama de cuadrantes células sin tratamiento (A), IC₂₅ del compuesto **17** (B); diagrama de cuadrantes de las células tratadas con la IC₅₀ de **17** (C); células tratadas con la IC₇₅ (D); histograma de la proporción de células positivas para cada uno de los fluorocromos.

Finalmente, para el compuesto **26** se observa un comportamiento bastante interesante pues a la concentración IC_{25} se observa una baja proporción de células en apoptosis temprana (Figura 2.4 B y C), con el aumento de la concentración (IC_{50}) aumenta levemente esta proporción de células; a la concentración más elevada IC_{75} aproximadamente el 75 % de las células se encuentra en apoptosis temprana y no se observa una población significativa de células en apoptosis tardía (Figura 2.4 D y E), lo que podría indicar que la toxicidad de este compuesto es moderada y tiene un rango de seguridad más alto que los otros dos compuestos evaluados.

Con estos resultados, fue posible determinar que los compuestos evaluados inducen apoptosis en las células tumorales los cuales terminan en la muerte celular de estas. Esto permite plantear la hipótesis de que el mecanismo de muerte celular ocurre a través de la interacción de los compuestos activos con la tubulina, ya que cuando se altera la dinámica de los microtúbulos por interacción con la tubulina induce procesos de apoptosis a través de la activación de la vía intrínseca [183]–[186]. Sin embargo, el mecanismo de muerte celular completo debe ser caracterizado a través de ensayos adicionales como inmunofluorescencias que indiquen la disrupción de los microtúbulos, ensayos de inducción de caspasas, entre otros, para así poder comprobar la hipótesis planteada. Con esto, en este trabajo se quiso evaluar si uno de los mecanismos por los que los compuestos **1**, **17** y **26** inducen apoptosis podría ser la interacción con la tubulina y afectación de la dinámica de los microtúbulos, para lo cual se realizaron estudios de interacción por RMN con la tubulina y predicciones computacionales, cuyos resultados se presentan a continuación.

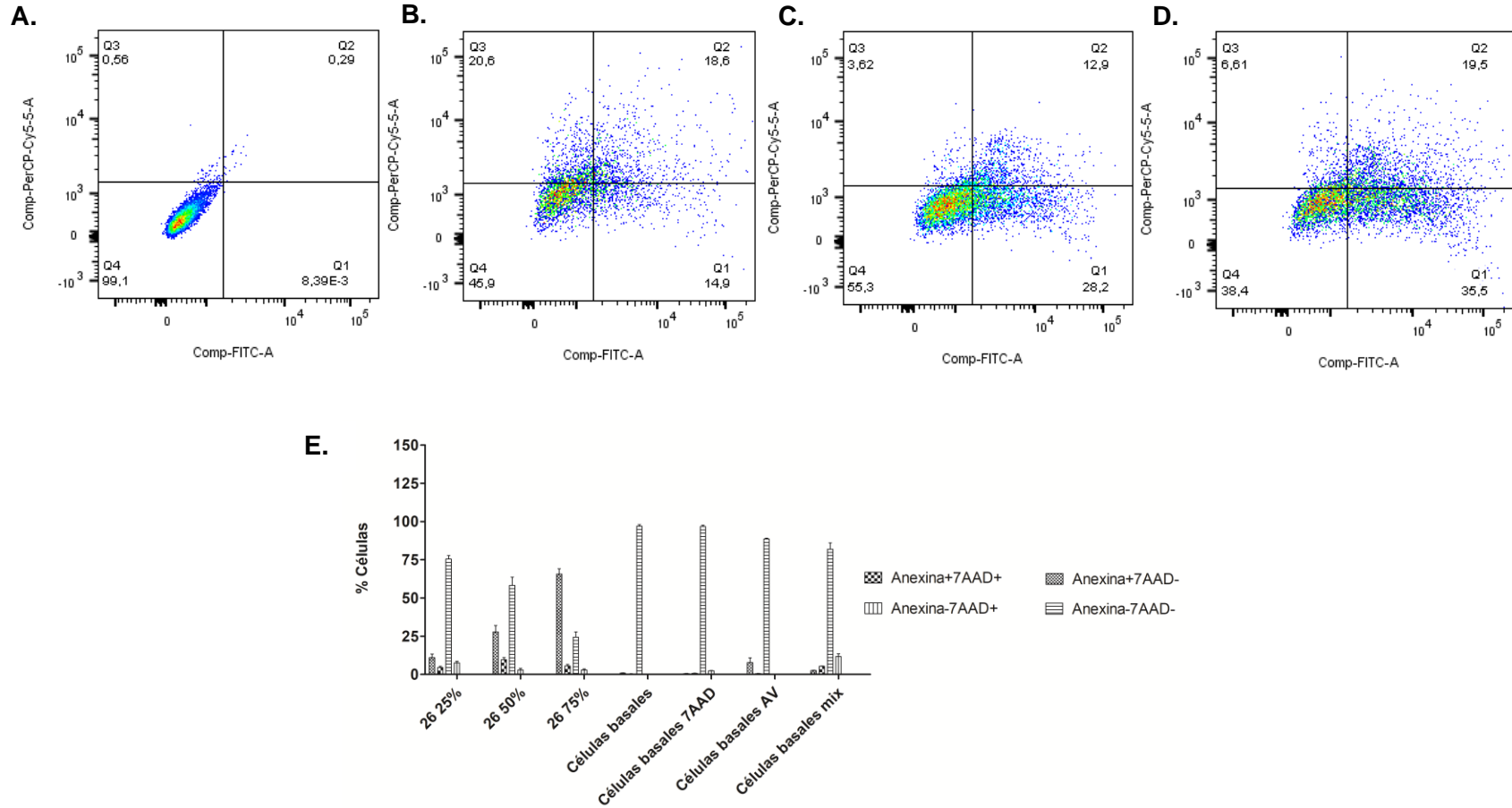


Figura 2.4 Resultados de los ensayos de inducción de apoptosis por citometría de flujo. Diagrama de cuadrantes células vivas (A), IC₂₅ del compuesto **26** (B); diagrama de cuadrantes de las células tratadas con la IC₅₀ de **26** (C); células tratadas con la IC₇₅ (D); histograma de la proporción de células positivas para cada uno de los fluorocromos.

2.4 Estudio de la interacción por RMN de los compuestos activos con el blanco molecular tubulina

Para determinar si los compuestos activos, los cuales han mostrado ser inductores de apoptosis en células tumorales presentan interacción con la tubulina, inicialmente fue necesario llevar a cabo pruebas de solubilidad de los compuestos **1**, **17** y **26** a una concentración de 1 mM en medio acuoso, para así garantizar la disolución completa de cada uno de los compuestos y evitar la formación de agregados solubles. Esto se hizo mediante el análisis de sus espectros de RMN-¹H, en donde se observó que las señales de estos compuestos no presentan ensanchamientos ni pérdida de resolución de las señales [187], tal y como se muestra para el compuesto **17** (Figura 2.5). Adicionalmente, se procedió a realizar la asignación de los desplazamientos químicos de cada uno de los compuestos a evaluar (Anexos 1-3), de manera que cada protón que compone a los ligandos estuviese asignado inequívocamente en medio acuoso.

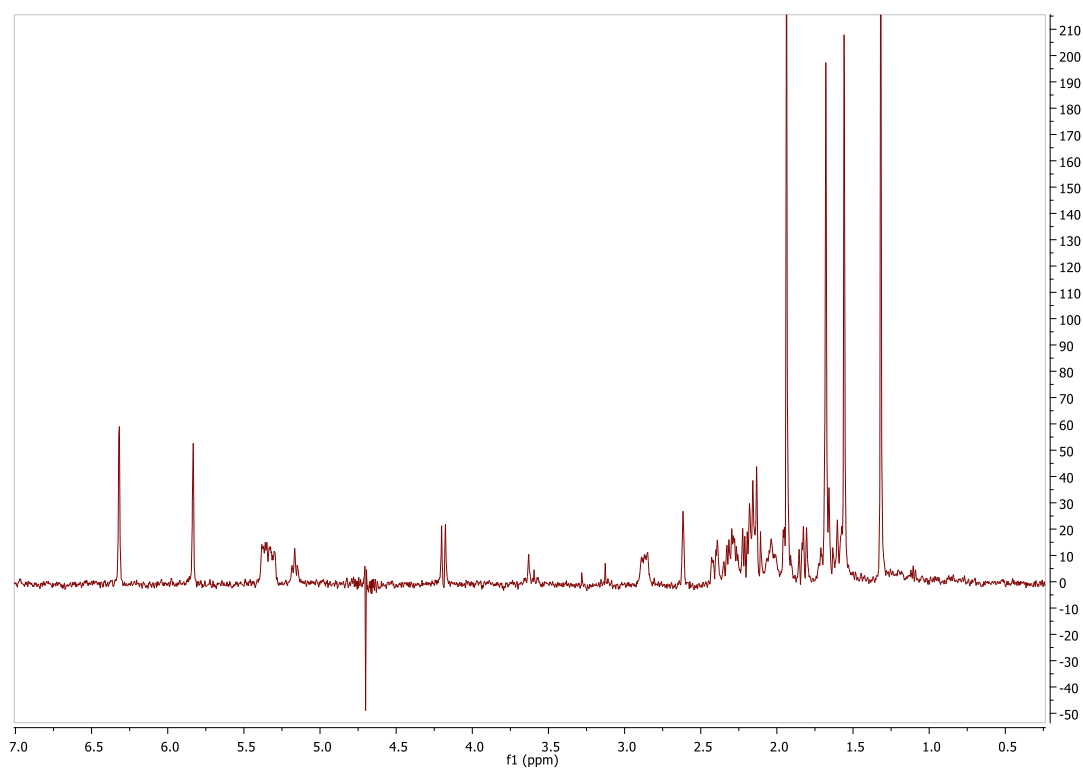


Figura 2.5 Espectro de RMN-¹H (500 MHz) del compuesto **17** en medio acuoso (buffer fosfato pH 7.4, 300 mM NaCl y 10% D₂O).

Una vez asegurada la disolución completa de los compuestos, se procedió a analizar las mezclas binarias de cada uno de los ligandos (1 mM) con la tubulina (100 μ M) adaptando la secuencia descrita por Meyer y Mayer [143] y usando la secuencia DPGSE [188] para la supresión de la señal del agua. En los primeros experimentos obtenidos se observó la presencia de impurezas en una alta concentración, las cuáles, debido a su alta intensidad, no permitían la visualización de las señales del ligando en el espectro de RMN- 1 H. Estas impurezas corresponden a la presencia de guanosil trifosfato (GTP) y glicerol, derivados del proceso de obtención de la proteína. Para la reducción de estos contaminantes fue necesario un proceso de ultrafiltración empleando un filtro Amicon Ultra-4 10K (Merck Millipore). Tras este proceso la concentración de estos contaminantes disminuyó y fue posible la observación de las señales de los ligandos en presencia de la proteína como se observa en la Figura 2.6.

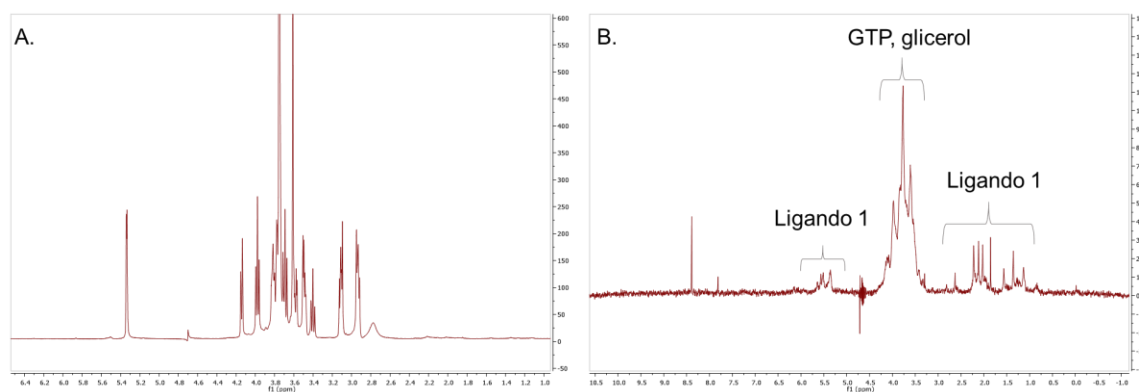


Figura 2.6 Espectro de RMN- 1 H del ligando **1** en presencia de la tubulina antes de proceso de ultrafiltración (A) y espectro de RMN- 1 H de **1** en presencia de la tubulina tras el proceso de ultrafiltración, en donde se observan las señales de **1** (B).

Para asegurar que todas las señales en el espectro STD en presencia de la proteína corresponden a los protones en la estructura del ligando involucrados en la interacción con la tubulina, algunos parámetros como la potencia del pulso de saturación, el tiempo de saturación y la frecuencia de irradiación fueron ajustados en el espectro STD de referencia (en ausencia de la proteína), para así minimizar la presencia de señales correspondientes a artefactos (Figura 2.7). De esta manera se determinaron los siguientes valores como los óptimos para llevar a cabo los estudios de interacción: 10 dB de potencia del pulso, 50 ms de duración para el pulso de saturación y -2897 Hz como frecuencia de irradiación.

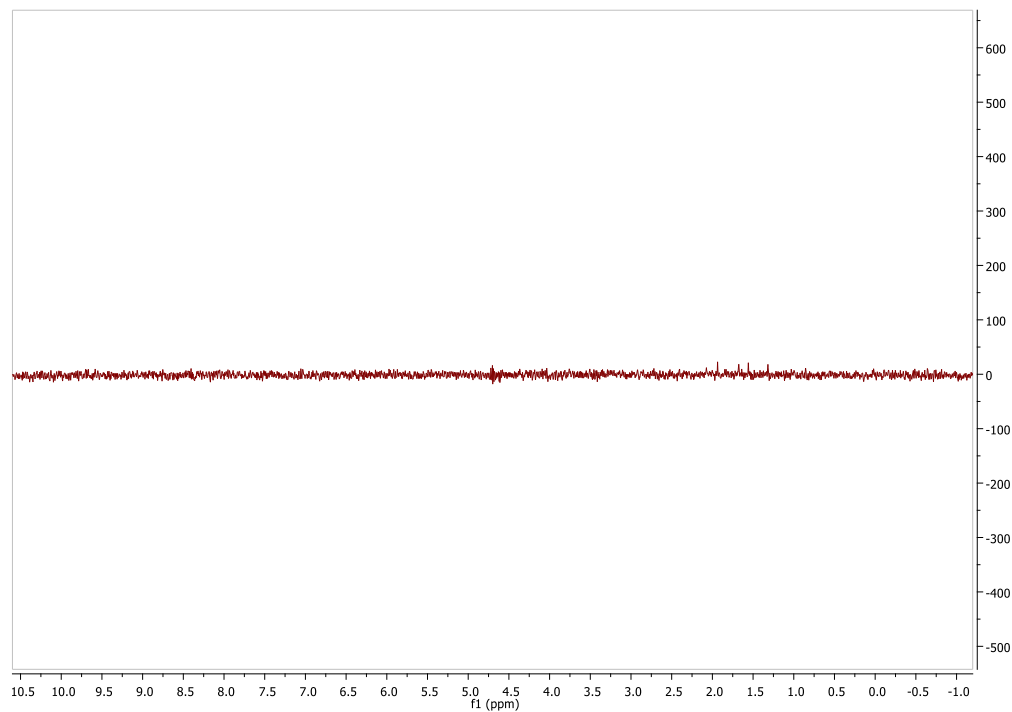


Figura 2.7 Espectro STD de referencia para el compuesto **17** en ausencia de la tubulina.

El ligando **1** presentó señales en el espectro STD en presencia de la tubulina (Figura 2.8 B), lo que indica la presencia de interacciones entre **1** y la tubulina. De acuerdo a los espectros obtenidos se estableció que los epítomos de unión corresponden a los protones H-3 (δ_{H} 5.60 ppm) y H-13 (δ_{H} 6.09 ppm) (Figura 2.8). El espectro STD en ausencia de la tubulina fue utilizado como control, para evitar la selección de falsos positivos debido a la presencia de artefactos en el espectro con los mismos desplazamientos químicos que los epítomos de unión.

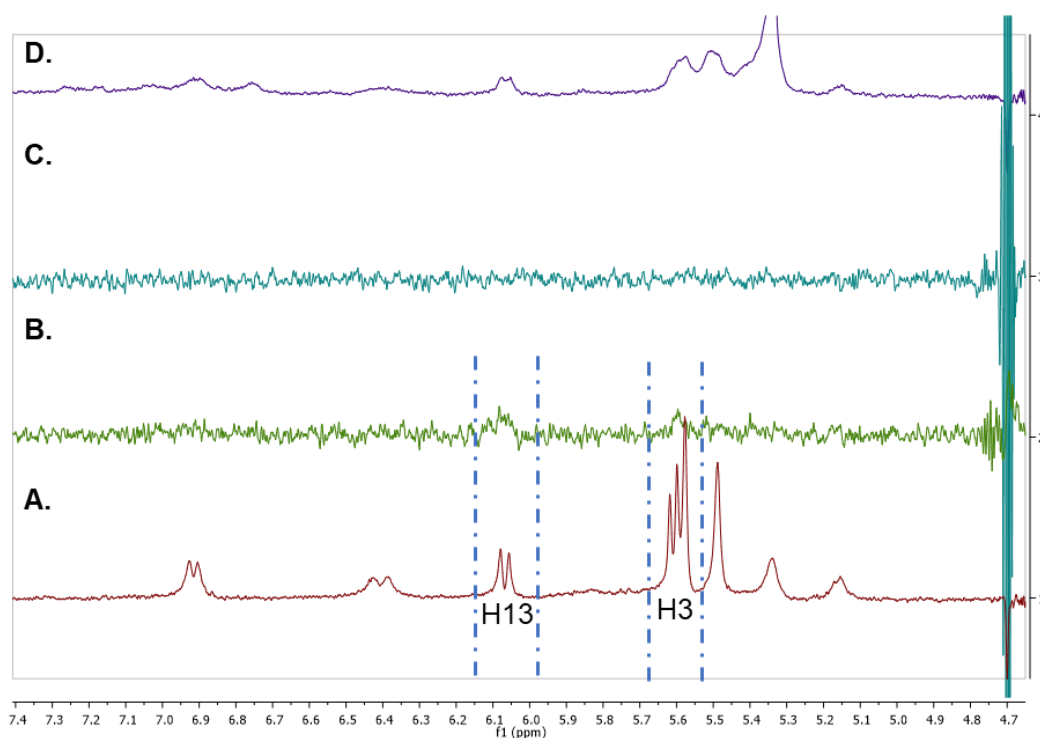


Figura 2.8 Análisis de la interacción del compuesto **1** con la tubulina a través del experimento STD en buffer fosfato salino pH 7.4 con 10 % D₂O. A) Espectro DPFGE de **1** en ausencia de la tubulina; B) espectro STD de **1** en presencia de la tubulina; C) espectro STD de referencia del compuesto **1** en ausencia de la tubulina; D) espectro DPFGE de **1** en presencia de la tubulina. Los epítomos de unión están resaltados en azul.

De manera análoga, el compuesto **17** también presentó señales en el espectro STD en presencia de la tubulina (Figura 2.9). En este caso, los epítomos de unión corresponden a grupos metilo H22 (δ_H 1.93 ppm), H19 (δ_H 1.32 ppm) y H6 (δ_H 2.05 ppm). Es de resaltar que en el espectro DPFGE de **17** en presencia de la tubulina se observa claramente un ensanchamiento de estas señales (Figura 2.9 D), lo cual es un claro indicativo de interacción entre **17** y la tubulina. De manera similar, el compuesto **26** presentó interacciones con la tubulina derivadas de la presencia de señales en el espectro STD (Figura 2.10). El epítomo de unión en este caso es similar al observado para **17**; adicionalmente, la presencia de una interacción del metilo del grupo acetato de la posición 4 evidencia que la modificación semisintética realizada sobre el acetato de crassina contribuye a la interacción con la tubulina. Al igual que **17**, en el espectro DPFGE en presencia de la tubulina se observa un ensanchamiento de las señales (Figura 2.9 D).

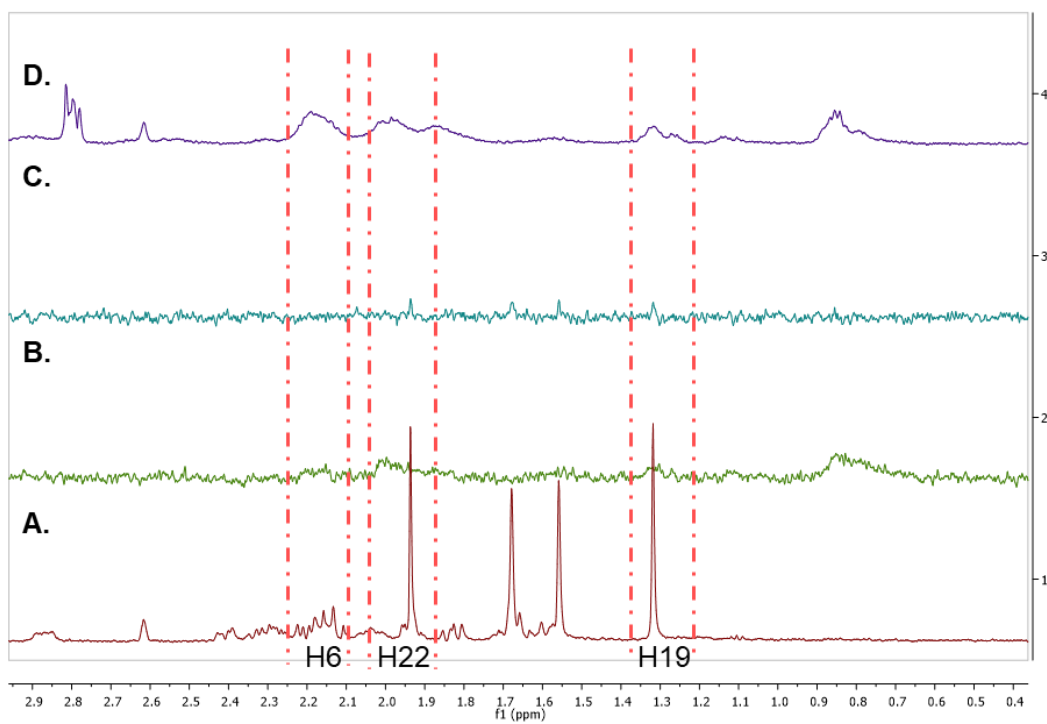


Figura 2.9 Análisis de la interacción del compuesto **17** con la tubulina a través del experimento STD en buffer fosfato salino pH 7.4 con 10 % D₂O. A) Espectro DPGSE de **17** en ausencia de la tubulina; B) espectro STD de **17** en presencia de la tubulina; C) espectro STD de referencia del compuesto **17** en ausencia de la tubulina; D) espectro DPGSE de **17** en presencia de la tubulina. Los epítomos de unión están resaltados en rojo.

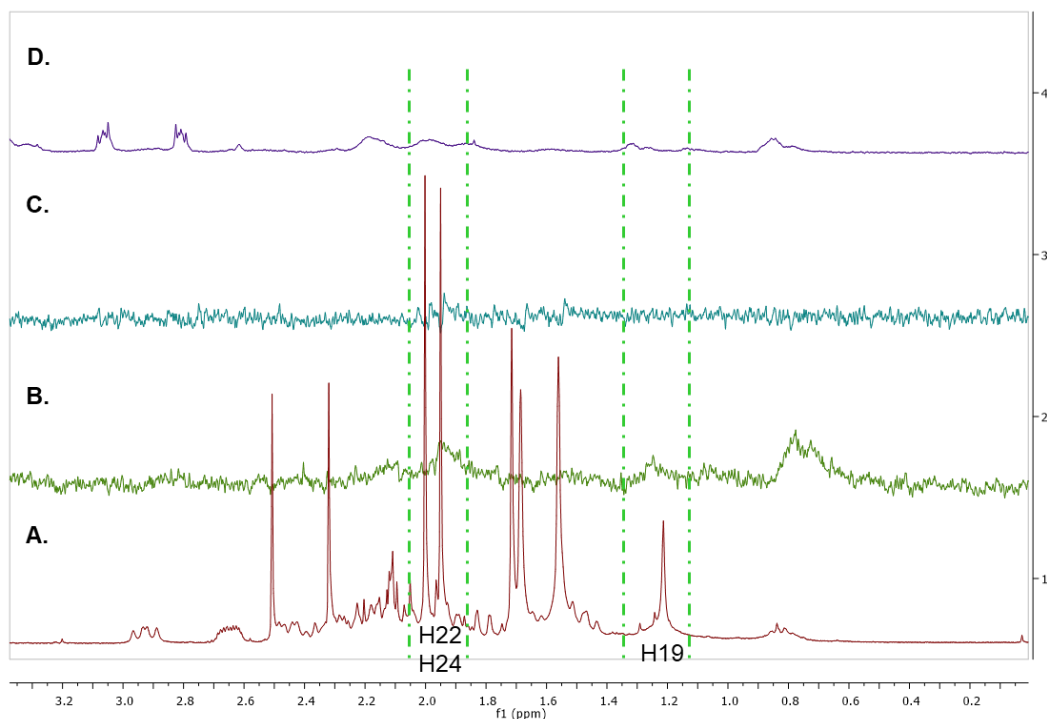


Figura 2.10 Análisis de la interacción del compuesto **26** con la tubulina a través del experimento STD en buffer fosfato salino pH 7.4 con 10 % D₂O. A) Espectro DPGFSE de **26** en ausencia de la tubulina; B) espectro STD de **26** en presencia de la tubulina; C) espectro STD de referencia del compuesto **26** en ausencia de la tubulina; D) espectro DPGFSE de **26** en presencia de la tubulina. Los epítomos de unión están resaltados en verde.

El ensanchamiento de las señales observado es indicativo de que la interacción de los ligandos **17** y **26** se encuentra en el régimen de intercambio químico intermedio [189]. Este régimen se caracteriza por tener una velocidad de intercambio k_{ex} (en unidades de s^{-1}) muy cercana o igual a la diferencia de los desplazamientos químicos del estado libre y el estado unido del ligando (en ausencia y presencia de la macromolécula, respectivamente), expresado como $\Delta\omega$ (en unidades de $rad\ s^{-1}$) [190]. Esto genera que no se obtenga una única señal, bien definida, que represente el promedio de la población del estado libre y el estado ligado del ligando (intercambio rápido), ni tampoco dos señales que representen cada una el estado libre y ligado del ligando; lo que se obtiene en este caso es una señal ancha en el espectro. Esto implica que **17** y **26** se comportan como ligandos de mediana a alta afinidad frente a la tubulina, lo cual hace necesaria una caracterización adicional de

estas interacciones a través del estudio de la dinámica de estos ligandos en presencia de la tubulina. En la Figura 2.11 se presentan las estructuras de los tres compuestos que presentaron interacción con la tubulina con sus epítomos de unión resaltados.

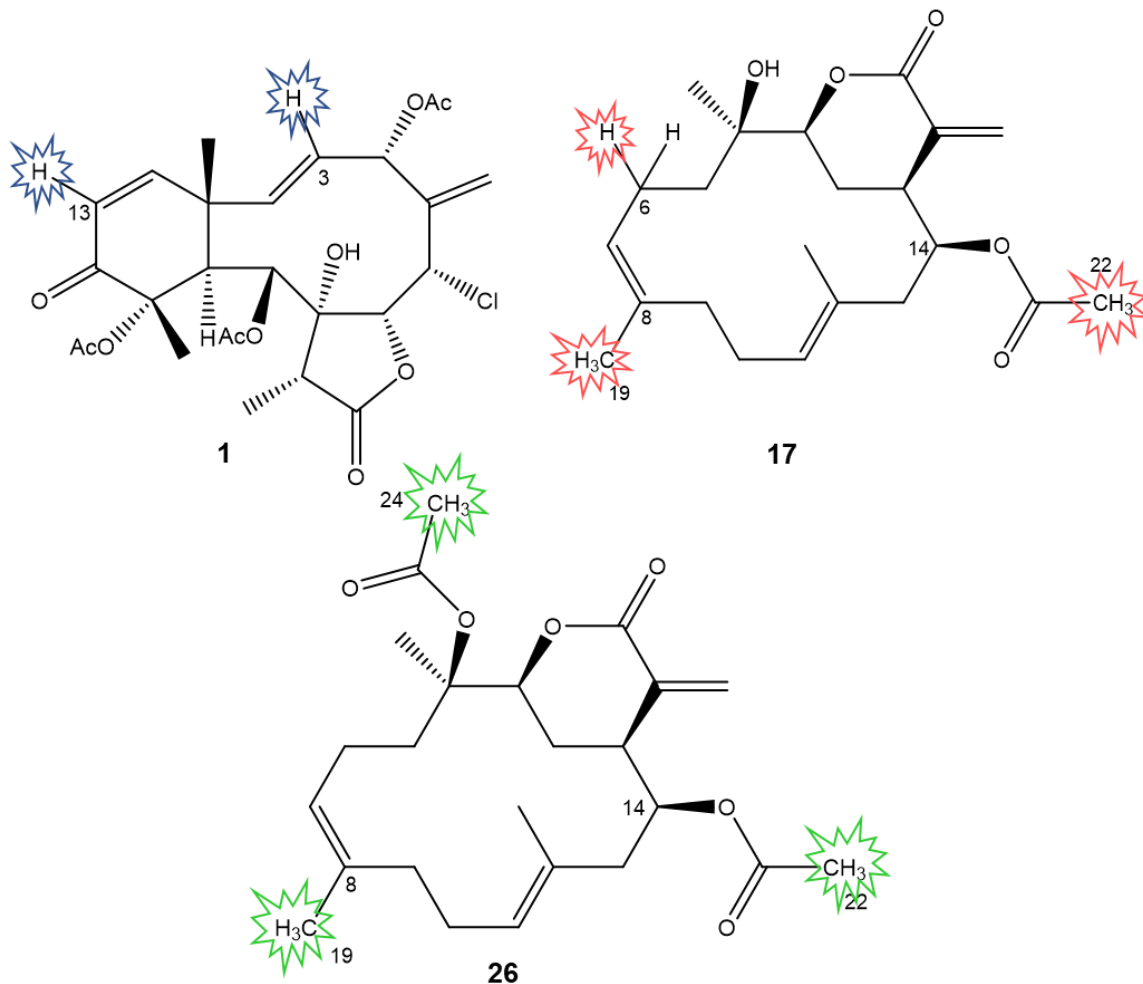


Figura 2.11 Epítomos de unión de los ligandos **1**, **17** y **26** frente a la tubulina identificados a través del experimento STD.

Con el objetivo de continuar con la caracterización de la interacción observada, fueron realizadas las medidas del tiempo de relajación T_1 y T_2 . Tal y como se mencionó en el marco teórico, existen diferentes parámetros de RMN que describen a una molécula específica, los cuales se ven afectados cuando se da la interacción de estos ligandos con macromoléculas [191]. Dentro de estos parámetros el desplazamiento químico, los efectos dipolares (NOE), el coeficiente de difusión y los tiempos de relajación nuclear T_1 y T_2 son los más afectados por estas interacciones, generando aumentos y disminuciones en los

tiempos de relajación T_1 y T_2 , respectivamente cuando hay interacción con macromoléculas.

En este caso la muestra fue preparada en buffer fosfato salino pH 7.4 en 100 % D_2O , debido a que los experimentos para medir los tiempos de relajación no cuentan con una secuencia de pulsos acoplada para la supresión de la señal del agua.

Se determinó el T_1 para cada uno de los núcleos que componen a los ligandos, en ausencia y presencia de la tubulina, y se calculó el diferencial de estos (Anexo 4-6). Para el ligando **1** se observaron cambios en el tiempo de relajación T_1 en los mismos núcleos que se observó la interacción en el espectro STD, junto con nuevas porciones la molécula que presentan variaciones en este parámetro como lo son el metilo del grupo acetilo de la posición 4 y el metilo del acetilo en la posición 11. El mayor cambio observado se da en el protón H-13, con un cambio de 1.53 s. Este resultado confirma que el epítipo de unión de **1** es caracterizado por el protón H-13. Para los compuestos **17** y **26** también se observaron cambios en el tiempo de relajación T_1 en las posiciones previamente identificadas por el experimento STD, junto con nuevas interacciones las cuales son presentadas en la Figura 2.12.

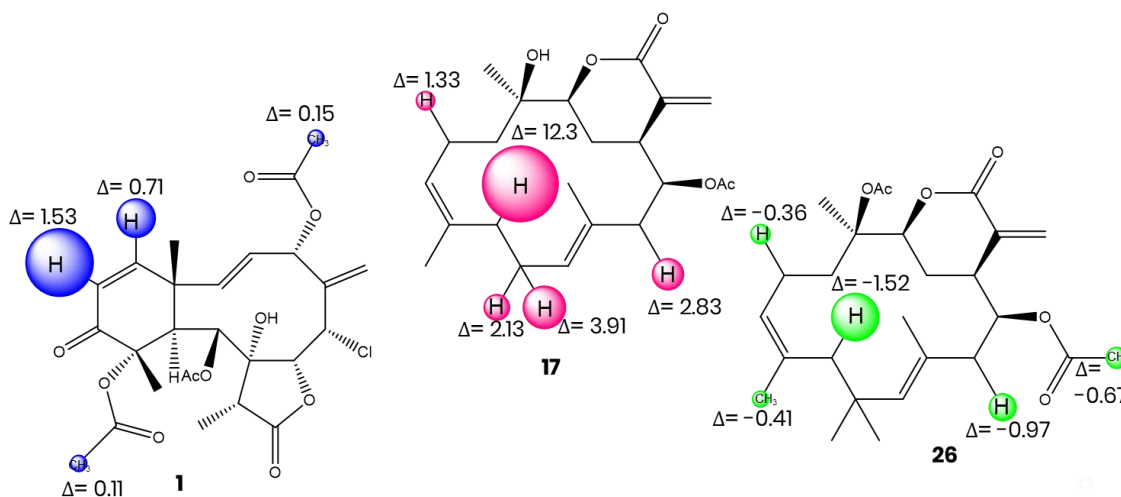


Figura 2.12. Cambio en el tiempo de relajación T_1 para los ligandos **1**, **17** y **26**. El tamaño de las esferas representa la magnitud del cambio observado.

Cabe resaltar que para el compuesto **17** se observó un cambio grande en T_1 (12.3 s) en el protón H-9. El efecto que tienen las interacciones intermoleculares sobre estos parámetros

depende de la intensidad de la interacción presentada. Estos cambios en T_1 son producto de la disminución de los movimientos moleculares cuando el ligando **17** se une a una macromolécula a través del protón H-9, la cual cuenta con una menor cantidad de movimientos moleculares [192], [193]. Así es posible determinar que los protones H-13 para **1**, H-9 para **17** y **26** están involucrados en gran medida con la interacción molecular y el proceso de reconocimiento en la tubulina. Es importante resaltar que se debe tener en cuenta el valor absoluto de la diferencia en los tiempos de relajación T_1 , ya que debido al comportamiento que tiene este parámetro (Sección 1.1.7) presenta valores negativos, los cuales no son indicativo de ningún comportamiento particular.

La presencia de señales altamente ensanchadas por encontrarse en un régimen de intercambio intermedio sugirió la necesidad de realizar la medición del tiempo de relajación T_2 para cada uno de los ligandos en ausencia y presencia de la proteína. Debido a que las macromoléculas por a su amplia red de spin presentan tiempos relajación pequeños, cuando una molécula pequeña o ligando interactúa con una macromolécula el tiempo de relajación del ligando disminuye debido a la formación del complejo ligando-receptor [191].

La medición de T_2 se hizo de manera análoga a T_1 (Anexo 7-8), varios de los núcleos que presentaron cambios en T_1 también presentaron cambios en el tiempo de relajación T_2 , confirmando así la presencia y la magnitud de estas interacciones. Para **17** se observó un cambio de 0.71 s para el metilo del grupo acetilo en la posición 14, esta interacción ya había sido observada en el espectro STD de este compuesto en presencia de la tubulina. Los cambios en T_2 son presentados en la Figura 2.13.

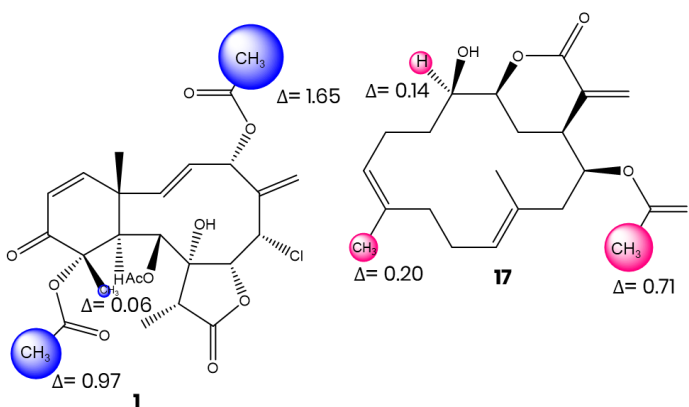


Figura 2.13 Cambio en el tiempo de relajación T_2 para los ligandos **2** y **18**. El tamaño de las esferas representa la magnitud del cambio observado.

Para el compuesto **26** no fue posible hacer la medición de T_2 debido a la desaparición de las señales de este durante en el espectro, producto de una fuerte interacción con la proteína que se ve reflejado como un ensanchamiento extremo de la señal debido a una alta disminución del tiempo de relajación T_2 [146].

Con esto se tiene una caracterización completa de la interacción de los ligandos frente a la tubulina como se describe a continuación: Del compuesto **1** la interacción se da a través de los protones H-13, H-14 y los metilos de los acetatos de las posiciones 4 y 11; Del compuesto **17** a través de los protones H-4, H-6, H-7, H-9, H-10a, H-10b, H13 y el metilo del acetato en la posición 14; y del compuesto **26** a través de los protones H-6, H-9, H10a, H-10b y H-13. Estos resultados permitieron identificar qué regiones de la molécula y con qué intensidad interactúan con la proteína obteniendo así el epítipo de unión para cada ligando.

Finalmente, para la estimación de la constante de disociación (K_d), como un parámetro para determinar la afinidad de los ligandos frente a la tubulina, se utilizaron mediciones del coeficiente de difusión, las cuáles son posibles a través del uso de secuencias de pulsos que incorporan pulsos de gradiente (PFG). Estos pulsos son generados por el paso de una corriente eléctrica a través de un par de bobinas de gradiente ubicadas en la sonda del espectrómetro [194]. Para la medición del coeficiente de difusión se utilizó la secuencia *Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Current Delay* (BPPLIED) [195], en la que los artefactos generados por la presencia de corrientes de Eddy son eliminados, por lo cual es comúnmente aplicada para macromoléculas [195]–[198].

Para la determinación del coeficiente de difusión de los compuestos **1**, **17** y **26** se obtuvo el promedio de cada uno de los coeficientes de difusión medidos para cada señal que compone al ligando en estudio en presencia y ausencia de la proteína (Anexo 9-14). El cambio más evidente fue observado para el ligando **26** en donde en ausencia de la proteína se obtuvo un coeficiente de difusión de $3.098 \pm 0.2642 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y en presencia de la tubulina presentó un coeficiente de difusión de $1.3642 \pm 0.1568 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Esto es un claro indicador de que este compuesto presenta interacciones con la proteína, debido a que el coeficiente de difusión del ligando libre disminuye cuando se da la formación del complejo ligando-proteína. Esta nueva entidad química se comporta como una macromolécula, las cuáles debido a su tamaño molecular y voluminosidad presentan bajos

tiempos de correlación y consecuentemente menores coeficientes de difusión en el medio dónde se encuentran. De manera similar, se observaron cambios para los ligandos **1** y **17** (Tabla 2), lo que confirma y complementa la presencia de las interacciones observadas en el espectro STD y en los experimentos T1 y T2.

Tabla 2. Coeficientes de difusión medidos y K_d para los ligandos **1**, **17** y **26** en presencia y ausencia de la tubulina. D_{libre} coeficiente de difusión para los ligandos en ausencia de la tubulina, D_{int} coeficiente de difusión para los ligandos en presencia de la tubulina

ID	D_{libre} ($\times 10^{-10}$ m ² /s)	D_{int} ($\times 10^{-10}$ m ² /s)	K_d (mM)
1	2.8803 \pm 0.3222	2.447 \pm 0.3745	0.8274
17	2.9242 \pm 0.1402	2.5550 \pm 0.1595	0.7522
26	3.098 \pm 0.2642	1.3642 \pm 0.1568	0.2451

Para la estimación de la K_d , a través de la ecuación descrita por Larive (Sección 4.7) en donde se relacionan los coeficientes de difusión tanto del ligando como de la proteína y las concentraciones de cada uno, es necesario conocer el coeficiente de difusión de la proteína libre. En este caso se utilizó el dato reportado por Krouglova y colaboradores [199], siendo 4.41×10^{-10} m²/s, con este dato y los coeficientes de difusión medidos para los ligandos libres y en presencia de la tubulina se hizo la estimación de la constante de disociación de los ligandos **1**, **17** y **26** (Tabla 2). Con esto, se puede inferir que el ligando que presenta una interacción más fuerte con la tubulina es el ligando **26** ya que presenta un valor de K_d más bajo (0.2451 mM). Sin embargo, esto es solo una estimación de este parámetro termodinámico. Es necesario llevar a cabo otro tipo de experimentos para confirmar este dato, como ensayos de inhibición de la polimerización de la tubulina para a través de otra aproximación obtener un valor de la constante de disociación.

Así, se tienen tres ligandos de mediana-alta afinidad que presentan interacciones con la tubulina. De los cuales se identificaron los epítomos de unión para cada uno y la intensidad de la interacción observada a través de la medición de relajación. Así mismo se hizo una estimación de la constante de disociación, a través de los coeficientes de difusión de cada uno de los ligandos en presencia y ausencia de la proteína. Ahora es necesario determinar

el modo de unión de estos ligandos en cavidades proteicas específicas, para así contrastar la información generada experimentalmente con un modelo computacional y establecer un modelo de unión ligando-receptor para los ligandos que se presentará a continuación.

2.5 Estudios de acoplamiento molecular de los ligandos 1, 17 y 26 con la tubulina

Estudios previos han mostrado que la tubulina cuenta con varios sitios de unión de ligando, el sitio de unión de los alcaloides derivados de la vinca, el sitio de unión de la colchicina y el sitio de unión del taxol [200]. Estos dos últimos los más relevantes en este trabajo dada la similitud estructural de los ligandos seleccionados con reportes previos de ligandos que interactúan en estos sitios de unión [201]. El acoplamiento molecular de los compuestos **1**, **17** y **26** fue llevado a cabo tanto en el sitio de unión del taxol como de la colchicina con el objetivo de establecer el modelo de unión ligando-receptor que correlacione con los datos de la interacción observada experimentalmente por RMN.

Antes de los estudios de acoplamiento molecular, se llevó a cabo el proceso de reproducción del modo de unión tanto del complejo Tax-Tub (Taxol-Tubulina) como el complejo Colch-Tub (Colchicina-Tubulina). En este proceso se observaron energías de afinidad altas para ambos complejos, para el caso del complejo Tax-Tub se obtuvo una energía de unión de -7.40 kcal/mol y para el complejo Colch-Tub -6.92 kcal/mol. Para ambos complejos se obtuvo un valor de RMSD de 0.0 Å, lo que indica que el protocolo de acoplamiento molecular utilizado es adecuado para los ligandos a evaluar (Tabla 3).

El estudio de acoplamiento molecular de los tres ligandos en el sitio de unión del taxol y en el de la colchicina se llevó a cabo usando el software AutoDock4 [202] bajo los parámetros indicados en la metodología (Sección 4.8). Los cincuenta resultados de los modos de unión obtenidos para cada uno de los ligandos se clasificaron en grupos (*clusters*) teniendo en cuenta el valor de energía de unión expresada como energía libre de unión ($\Delta G_{binding}$ kcal/mol), la similitud en el modo de unión, evaluada según el coeficiente de Tanimoto y el valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Tomando como parámetro de clasificación el valor de RMSD, la generación de clúster se lleva a cabo comparando la distancia entre las coordenadas de una conformación (conformación 1) con otra (conformación 2), si la diferencia de RMSD para estas dos conformaciones es menor a 0.5

Á la conformación 2 es ubicada en el mismo *clúster*. En caso de ser mayor, se genera un nuevo clúster y se procede a comparar otra de las conformaciones (conformación 3) con el primer clúster generado [203]. Si la diferencia en el valor de RMSD de estas dos conformaciones es mayor a 0.5, se compara con el segundo *clúster* y así de manera sucesiva hasta completar la comparación de las 50 evaluaciones.

Los resultados de acoplamiento molecular entre la tubulina en el sitio de unión del taxol y los ligandos **1**, **17** y **26** presentaron valores de $\Delta G_{binding}$ en un rango de -5.0 a -7.22 kcal/mol, bastante cercanos a los obtenidos para el taxol (Tabla 3); Para estos mismos calculos llevados a cabo en el sitio de unión de la colchicina se obtuvieron valores de $\Delta G_{binding}$ en un rango de -8.0 a -9.0 kcal/mol. Estos valores al ser negativos e incluso mejores que los obtenidos para los ligandos de referencia indican un acoplamiento energéticamente favorable entre ellos y la tubulina [204].

Adicionalmente, tras llevar a cabo el análisis de similitud de los modos de unión de cada uno de los ligandos respecto al taxol, empleando el coeficiente de Tanimoto, se obtuvo que el ligando **1** es, de los tres ligandos evaluados, el que tiene un modo de unión más similar al del taxol, ya que cuentan con un porcentaje de similitud del 70.7 %. Sin embargo, **17** y **26** también cuentan con un alto grado de similitud con el taxol siendo 55.2 % y 70.0 %, respectivamente (Tabla 3), indicando que el modo de unión de estos ligandos es bastante similar al del taxol y presenta interacciones con los mismos residuos que interactúa con el taxol. En la Figura 2.14 se presenta la matriz de interacciones en donde se observan los residuos donde se muestran interacciones para cada uno de los ligandos con la tubulina en comparación con el taxol.

Tabla 3. Valores de energía libre de unión calculada y coeficiente de similitud para cada uno de los ligandos en el sitio de unión del taxol y la colchicina, respectivamente

Complejo	$\Delta G_{binding}$ (kcal/mol)	Coficiente de similitud (Tanimoto)
Tax-Tub	-7.40	1.000
1-Tub (Taxol)	-5.47	0.707
17-Tub (Taxol)	-7.22	0.700
26-Tub (Taxol)	-7.08	0.552

Colch-Tub	-6.92	1.000
1-Tub (Colch)	-8.39	0.144
17-Tub (Colch)	-8.75	0.101
26-Tub (Colch)	-7.03	0.348

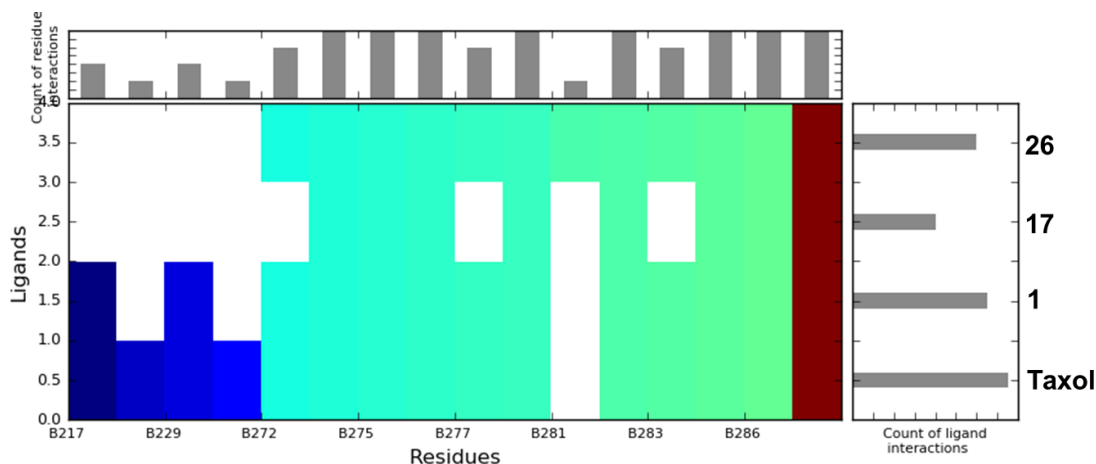


Figura 2.14 Diagrama de interacciones de los ligandos **1**, **17** y **26** en comparación con el taxol.

Estudios de diterpenos con núcleo piranosil cembrano aislados del octocoral *Sarcophyton trocheliophorum*, mostraron que los modelos computacionales obtenidos en el sitio de unión del taxol son comparables con los acá presentados en términos de los valores de energía de unión, obteniéndose en este caso un valor de -8 kcal/mol [205], el cual es bastante cercano para el obtenido por ejemplo para el ligando **17** que presenta un valor de -7.22 kcal/mol. Sin embargo, las interacciones observadas para los compuestos aislados de *S. trocheliophorum* en el sitio de unión del taxol no corresponden con las interacciones claves para presentar la actividad estabilizante de los microtúbulos en este sitio de unión. En otro trabajo, en un *screening* de nuevos agentes anti-tubulina aislados de fuentes naturales tanto terrestres como marinas, los modelos computacionales allí obtenidos presentan valores de energía de unión entre -5 y -7 kcal/mol [50].

Teniendo esto en cuenta, los modelos computacionales obtenidos para los ligandos **1**, **17** y **26** son bastante promisorios tanto en términos de valores de energía de unión y de las interacciones que presentan en el sitio de unión del taxol. Al comparar con los resultados obtenidos para ligandos altamente activos como la eleuterobina, cuyo valor de energía de

unión es de -5.99 kcal/mol [50], los tres ligandos acá evaluados presentan valores similares e incluso mejores en el sitio de unión del taxol, además de presentar interacciones con los residuos clave descritos en la interacción con este sitio de unión.

En la parte inferior de la figura 2.14 se presenta el taxol y los residuos con los que presenta interacción, quien es el ligando de referencia contra quien se comparan los modos de unión de los ligandos y se calcula el coeficiente de Tanimoto. Cada uno de los cuadros de color indica la presencia de una interacción con este residuo y el tipo de interacción, siendo azul claro interacciones de tipo polar, azul oscuro interacciones polares con residuos cargados positivamente y rojo interacciones polares con residuos cargados negativamente.

Analizando las interacciones intermoleculares presentadas por los modelos de los ligandos evaluados en el sitio de unión del taxol (Figura 2.15), se observan interacciones con residuos de aminoácidos que se han descrito como claves para la interacción ligando-receptor con la tubulina. El sitio de unión del taxol en la tubulina se encuentra ubicado en la superficie interna de la subunidad beta formada predominantemente por residuos de tipo hidrofóbico que forman la hélice H7, la hoja beta S7 y los *loops* H6-H7, S7-H9 (M-loop) y S9-S10 [206], [207] (Figura 2.12). El taxol y la tubulina presentan tres interacciones críticas para presentar la actividad estabilizante de los microtúbulos. Dentro de estas se encuentran interacciones de van der Waals entre el benzoilo 3' y la His229, la cual adicionalmente se encuentra posicionada de tal forma que se genera un enlace de hidrógeno con el oxígeno 3'. La interacción a través de un enlace de hidrógeno entre el OH 2' y la Arg369, también hace parte de este set de interacciones [208]. Finalmente, la interacción entre el grupo amino de la cadena lateral del residuo Thr276 con el anillo de oxetano a través de un enlace de hidrógeno es considerada como la interacción más importante para observar el efecto estabilizante [209].

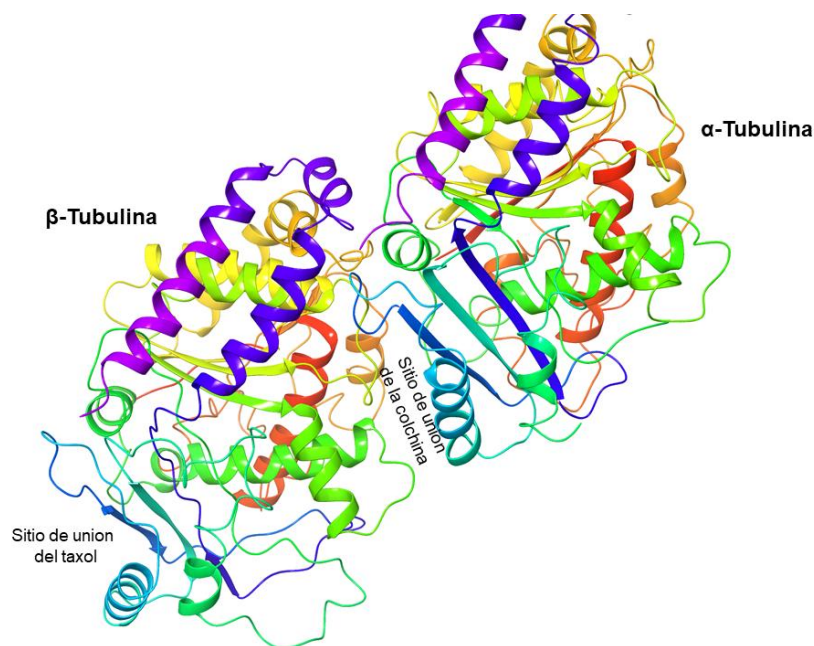


Figura 2.15. Sistema de las subunidades alfa y beta de la tubulina en donde se señalan los sitios de unión del taxol y la colchicina.

En el diagrama de interacciones para **17** y **26** (Figura 2.16 B y C) se observa la interacción con la Thr276 a través de un enlace de hidrógeno, correlacionando con las interacciones observadas por RMN como el protón H-3, el metilo del grupo acetato de la posición 14 e interacciones hidrofóbicas con los protones H-6. Por otro lado, para **1** también se observa la interacción con el residuo Thr276 (Figura 2.16 A), en este caso una interacción de tipo polar, así como las interacciones observadas experimentalmente con los protones H-13, H-14 y el metilo del grupo acetato en la posición 4. Adicionalmente, se observan interacciones hidrofóbicas con otros residuos que, si bien no hacen parte de la triada de interacciones críticas, contribuyen a la estabilización del complejo ligando-tubulina.

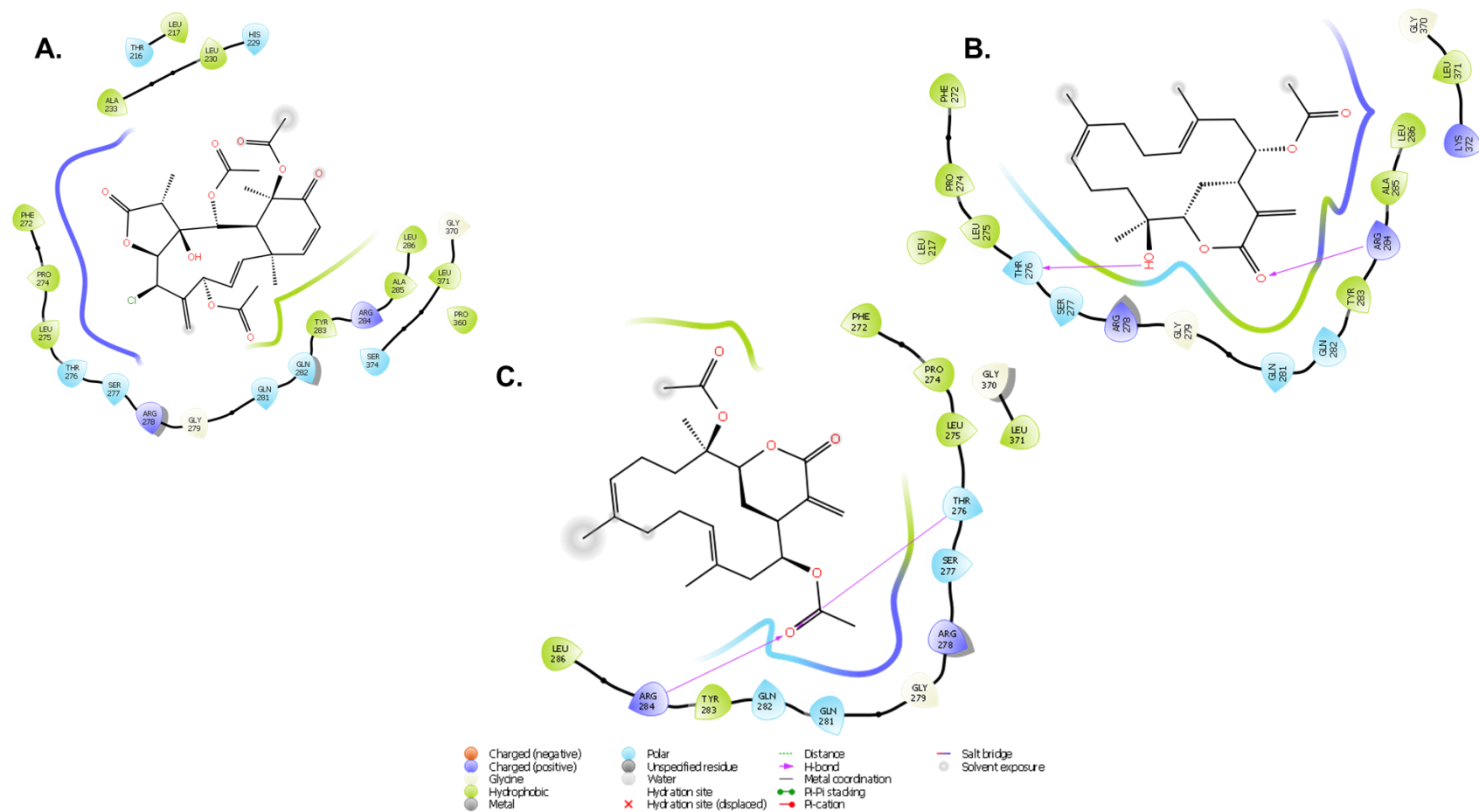


Figura 2.16 Diagramas 2D de interacción para los complejos ligando-proteína **1** (A), **17** (B) y **26** (C) en el sitio de unión del taxol.

Los residuos clave para la interacción se encuentran ubicados principalmente en el M-loop, el cual hace parte de los contactos laterales que se observan en los protofilamentos. Los cuáles son el elemento central de esta interacción. Cuando el M-loop se encuentra en ausencia de un agente se observa una gran flexibilidad en esta zona lo que permite la dinámica de los microtúbulos caracterizada por la polimerización-depolimerización de estas estructuras [210]. Tras la adición de un agente estabilizante en el sitio de unión del taxol se genera una estabilización del M-loop generando una estructura más rígida así como heterogeneidad en la estructura de los protofilamentos que conlleva posteriormente a una estabilización del microtúbulo y al arresto mitótico (Figura 2.17) [211].

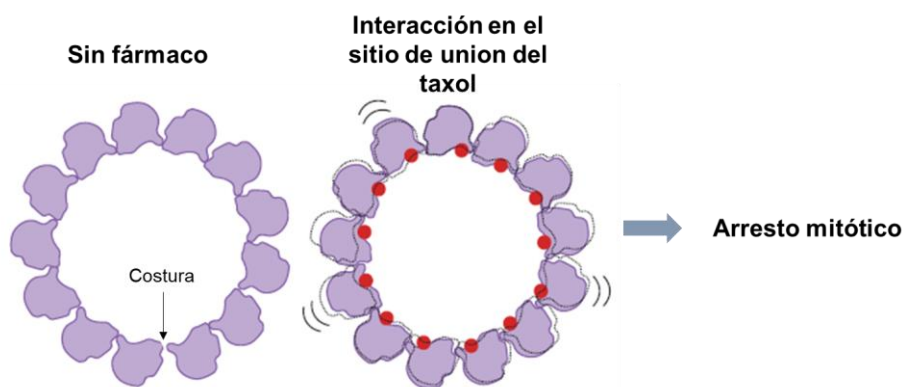


Figura 2.17. Esquematación de la afectación de la estructura de los protofilamentos y consecuentemente de los microtúbulos tras la interacción de un fármaco en el sitio de unión del taxol, lo cual conlleva al arresto mitótico y posterior muerte celular por la inducción de heterogeneidad en la estructura y afectación de los contactos laterales para la generación de la unión o costura entre las dos subunidades de la tubulina. En rojo se identifica la presencia de un estabilizante de tubulina. Tomada y adaptada de [211].

El análisis de similitud del modo de unión de los ligandos respecto a la colchicina, evaluado según el coeficiente de Tanimoto, presentó valores de similitud bajos (Tabla 3). El ligando **26** fue, entre los tres ligandos, el que presentó la mayor similitud en el modo de unión con un 34.8 %. En la Figura 2.18 se presenta la matriz de interacciones en donde se observan los residuos que presentan interacciones para cada uno de los ligandos con la tubulina en comparación con la colchicina. Estos residuos no corresponden a los residuos con los que la colchicina presenta interacciones en su modo de unión, lo cual indica que estos ligandos tienen un modo de unión diferente a la colchicina en el sitio de unión ya que los valores de energía de unión obtenidos son incluso mayores a los obtenidos para la colchicina (Tabla

3). Estas interacciones son principalmente de tipo polar con carga, tanto positiva como negativa.

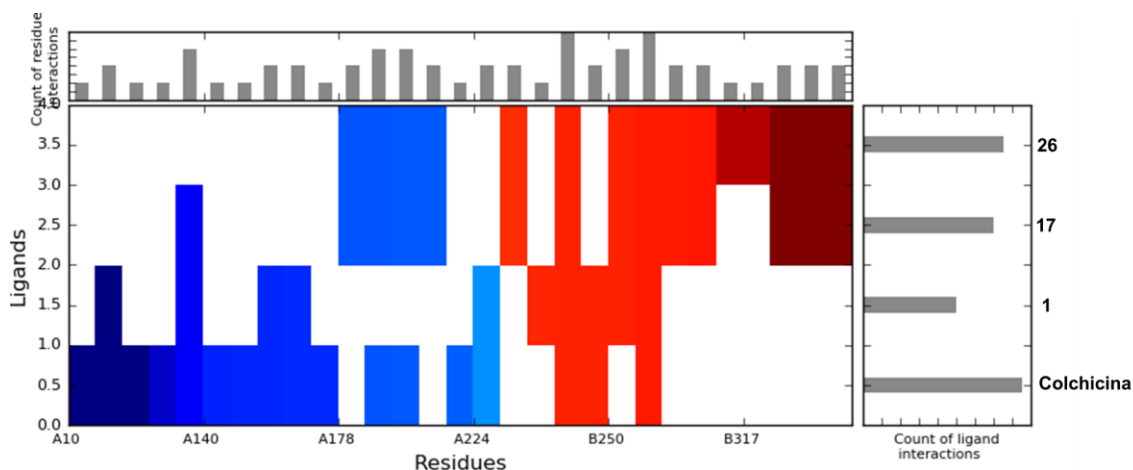


Figura 2.18 Diagrama de interacciones de los ligandos **1, 17 y 26** en comparación con la colchicina.

El sitio de unión de la colchicina se encuentra ubicado en la interfase de las subunidades α y β . Siendo este mucho más grande que el sitio de unión del taxol, consecuentemente tiene una mayor diversidad de aminoácidos involucrados en la interacción, lo cual se ve reflejado en una mayor cantidad de posibles modos de unión.

Para la colchicina se tiene que, la interacción a través de un enlace de hidrógeno con el residuo Cys241, ubicado en la subunidad beta es una de las interacciones más importantes para la formación del complejo ligando-proteína, junto con interacciones de tipo hidrofóbicas, con los residuos Thr239, Val238, Tyr202, Glu200 y Phe169 [212]–[214]. Cuando se da la unión de un ligando al sitio de unión de la colchicina se genera un cambio en la estructura secundaria de la tubulina, generando un cambio en la conformación y consecuentemente en la estructura del heterodímero que evita la formación de los microtúbulos de manera irreversible [201], [215].

En la Figura 2.19 se representan las interacciones para cada uno de los ligandos en el sitio de unión de la colchicina. En esta figura no se observan las interacciones cruciales reportadas para este sitio de unión. Sin embargo, la energía de unión calculada para estos complejos sugiere que si bien no se tienen las interacciones reportadas para este sitio de unión, este complejo es energéticamente favorable y las interacciones generadas pueden ser interacciones no descritas en literatura para este sitio de unión. Adicionalmente, las

interacciones observadas experimentalmente para los ligandos en los protones H-13, H-14 y los metilos de los grupos acetato de las posiciones 4 y 11 del ligando **1** se observan en estos modelos de unión. De manera similar, algunas de las interacciones observadas a través de los experimentos de RMN para los ligandos **17** y **26** son observadas en el modelo computacional, como las interacciones de los grupos acetato principalmente y algunas interacciones hidrofóbicas con los protones H-7 y H-9.

En comparación con la información obtenida a través de los experimentos de RMN, ambos modelos de unión tanto en el sitio de unión de la colchicina como del taxol comparten varias de las interacciones observadas por RMN. Sin embargo, para los complejos generados en el sitio de unión del taxol se observa una mayor correlación con la información obtenida por RMN. Para confirmar de manera inequívoca que la interacción de los ligandos **1**, **17** y **26** se da principalmente sobre el sitio activo del taxol, es necesario de manera experimental determinar el sitio de unión de estos ligandos, por medio de ensayos de competición por RMN entre el taxol y la colchicina frente a los tres ligandos evaluados.

2.6 Simulaciones de dinámica molecular

Para determinar si el modelo de unión ligando-receptor obtenido para cada uno de los ligandos tanto en el sitio de unión del taxol como de la colchicina es estable, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de estos modelos. Para las cuales se tiene establecido según literatura que las variaciones en el valor de RMSD a lo largo de la simulación, deben ser menores a 1.0 Å [216], [217] para que las trayectorias simuladas y los modelos de unión sean consistentes.

Para el modelo de unión del ligando **1** en el sitio de unión del taxol se obtuvo que el ligando presenta una alta estabilidad en el sitio de unión, ya que a lo largo de toda la simulación se observa una variación de 0.6 Å (Figura 2.20 A), lo que indica que el ligando se encuentra estabilizado en este sitio de unión [182]. Adicionalmente, la proteína también presenta una variación de 0.6 Å en el valor de RMSD permitiendo establecer que este modelo de unión ligando-receptor es estable [182].

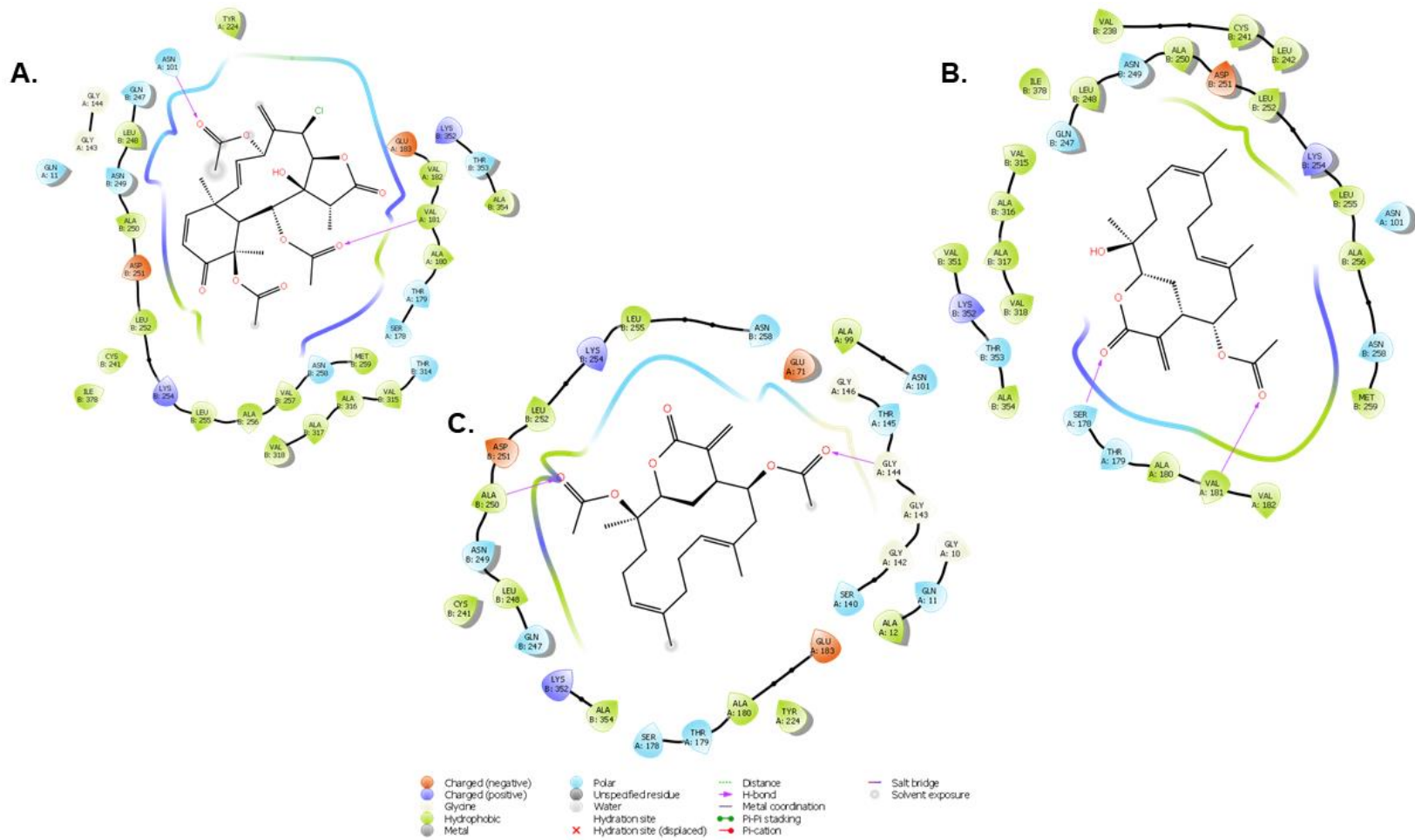


Figura 2.19 Diagramas 2D de interacción para los complejos ligando-proteína **1** (A), **17** (B) y **26** (C) en el sitio de unión de la colchicina.

Por otro lado, el análisis de las interacciones que presenta el ligando con la proteína a lo largo de la simulación permite confirmar las interacciones previamente observadas en el acoplamiento molecular. La interacción con residuos claves para la interacción en el sitio de unión del taxol es observada en una alta proporción (Figura 2.20 B) [218]. El compuesto **1** presenta una interacción de tipo enlace de hidrógeno con el residuo Arg369 en un 71 % del tiempo de la simulación (Figura 2.20 C). Así mismo con los residuos Thr276 y Arg278 se observa la presencia de un enlace de hidrógeno mediado por agua en un 38 % de la simulación. Estas interacciones, junto con otras interacciones de tipo hidrofóbico y polar en menor medida son las que contribuyen a la estabilización del ligando en el sitio de unión.

El modelo de unión de **17** con la tubulina en el sitio de unión del taxol, también presenta una buena estabilidad a lo largo de la simulación. Para el ligando **17** se observa una variación de 2 Å en el valor del RMSD y para la proteína una variación de 0.4 Å (Figura 2.21 A). Si bien se observa en la parte inicial de la simulación una variación alta en el valor de RMSD, esta variación tras 10 ns disminuye, estabilizándose el complejo ligando-receptor en los 40 ns restantes. En el análisis de interacciones se observa, que la estabilización del ligando es generada por la interacción en una alta proporción con los residuos Asp226, His229 y Thr276 (Figura 2.21 B), estos dos últimos siendo residuos clave para la interacción en este sitio de unión [218]. La interacción con los residuos Asp226 y His229 se observan en un 59 % y 42 % del tiempo de la simulación (Figura 2.21 C), respectivamente. Así mismo, se observa una interacción con el residuo Lys218 en un 34 % de la simulación la interacción con los tres residuos, la cual ocurre a través de un enlace de hidrógeno mediado por agua (Figura 2.21 C), lo que contribuye a la estabilización del ligando en este sitio de unión.

Finalmente, tras someter al modelo de unión ligando-receptor obtenido para el ligando **26** a una simulación de dinámica molecular, se obtuvo que tanto el ligando como la proteína presentan variaciones bajas del valor de RMSD a lo largo de la simulación, obteniendo una variación de 1.0 Å para el ligando y 0.2 Å para la proteína (Figura 2.22 A). Es importante resaltar, que se observa una interacción por enlace de hidrógeno durante la mayor parte del tiempo de la simulación con el residuo Thr276 (Figura 2.22 B y C). Esta interacción está presente el 81 % de la simulación, siendo una de las más importantes para la estabilización del ligando en el sitio de unión del taxol [211]. Adicionalmente, se observa una interacción con el residuo Arg369 de tipo enlace de hidrógeno mediado por agua, la cual también hace parte de la triada de interacción para el sitio de unión del taxol [206].

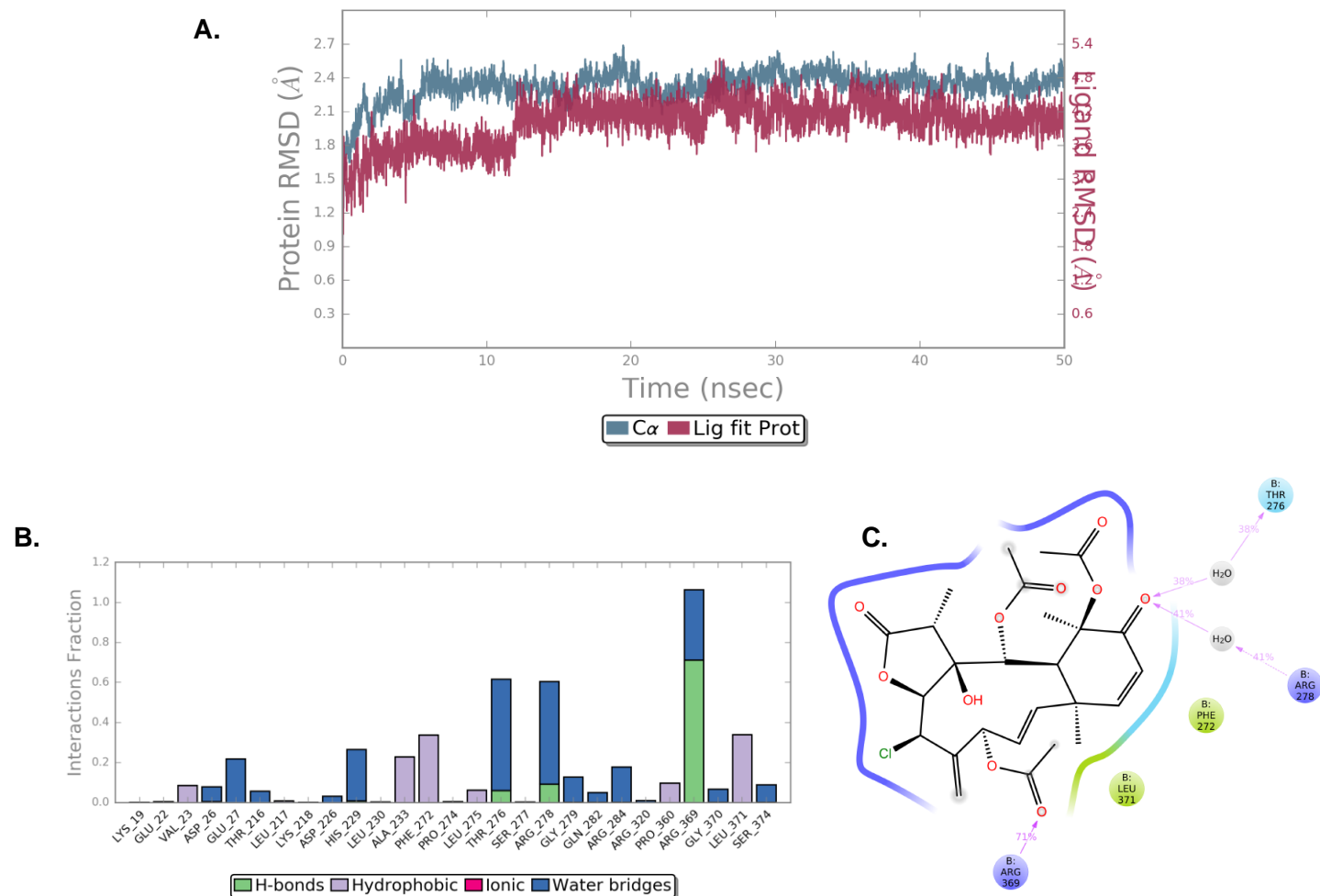


Figura 2.20 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de **1** con la proteína, en azul aguamarina se tienen interacciones de tipo polar y en azul rey interacciones de tipo polar cargadas positivamente(C)

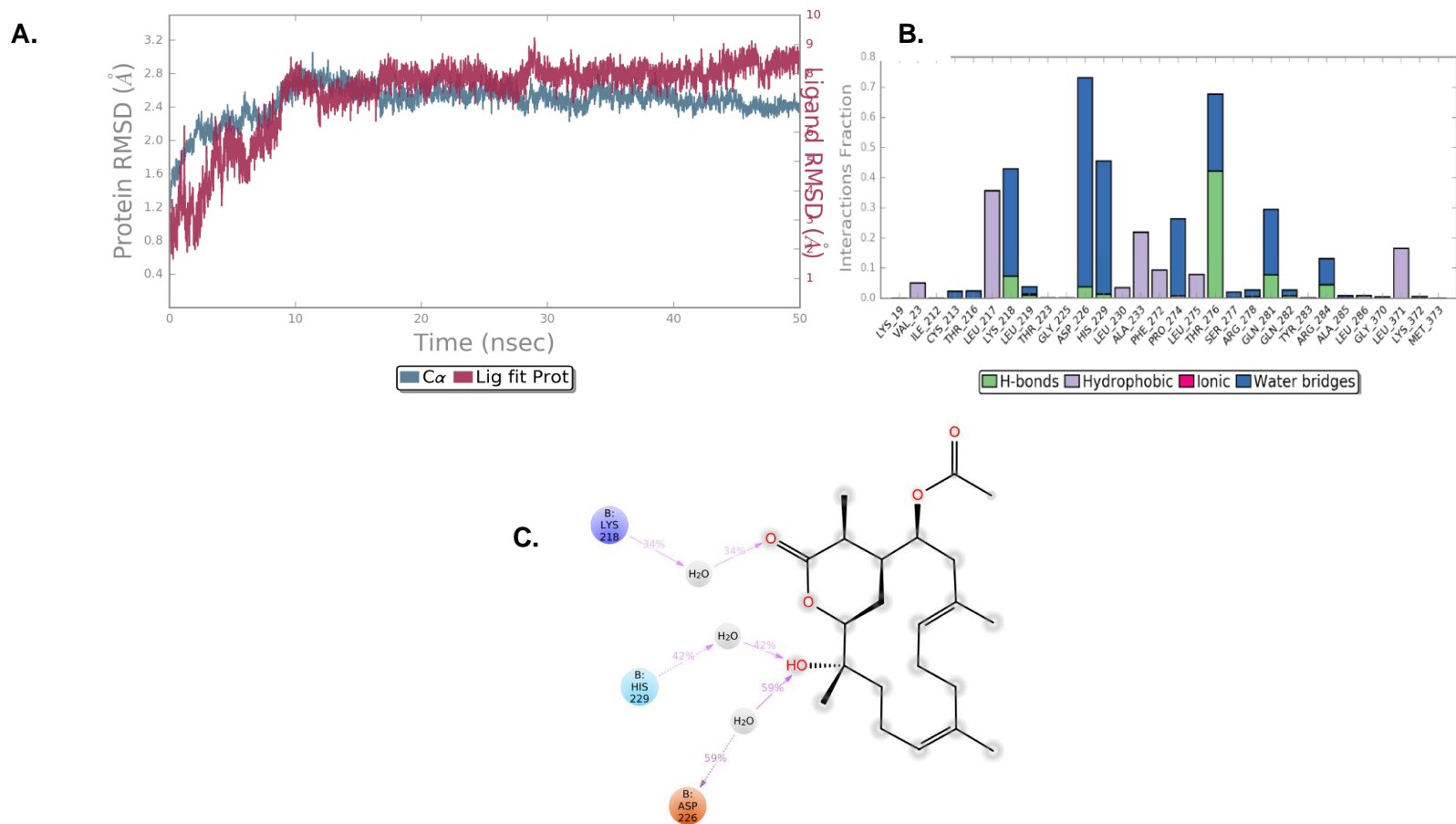


Figura 2.21 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de **17** con la proteína, en azul aguamarina se tienen interacciones de tipo polar y en azul rey interacciones de tipo polar cargadas positivamente(C)

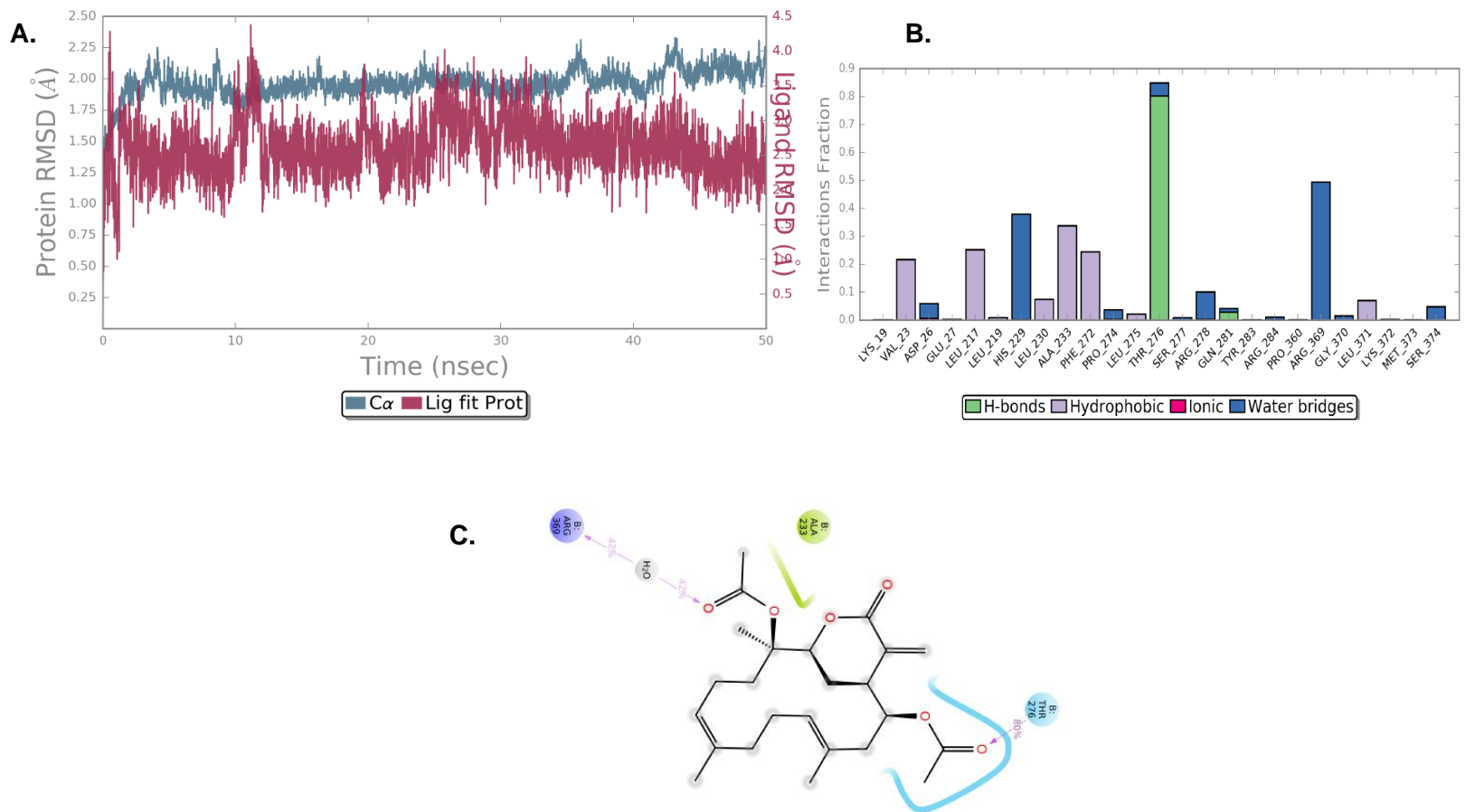


Figura 2.22 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de 1 con la proteína, en azul aguamarina se tienen interacciones de tipo polar y en azul rey interacciones de tipo polar cargadas positivamente(C)

Las porciones del ligando que están interactuando con estos residuos se correlacionan tanto con el epítipo de unión identificados por RMN, como con las interacciones planteadas en el acoplamiento molecular.

Con esta información se refuerza la hipótesis de que estos ligandos inducen la muerte celular en células tumorales a través de la interacción con la tubulina en el sitio de unión del taxol, actuando como agentes estabilizantes de los microtúbulos.

El modelo de unión del ligando **1** en el sitio de unión de la colchicina también fue sometido a una simulación de dinámica molecular usando los mismos parámetros que para los modelos de unión en el sitio de unión del taxol. Al igual que para el sitio de unión del taxol, el ligando presenta una alta estabilidad en el sitio de unión. A lo largo de toda la simulación se observa una variación de 0.4 Å en el valor de RMSD así como la proteína presenta una variación de 1.2 Å en el valor de RMSD lo que permite establecer que el modelo de unión ligando-receptor es estable (Figura 2.23 A). Al analizar las interacciones presentadas entre el ligando y la proteína a lo largo de la simulación, se observa que si bien el ligando presenta interacciones de tipo hidrofóbico con la proteína estas interacciones no son constantes y no están estabilizando el ligando en este sitio de unión, ya que no es posible determinar con cuáles residuos se presenta esta interacción debido a que estas interacciones son variables y no están estabilizando al ligando adecuadamente en el sitio de unión (Figura 2.23 B).

De manera análoga los modelos de unión obtenidos para los ligandos **17 y 26** en el sitio de unión de la colchicina fueron sometidos a una simulación de dinámica molecular. Al igual que para **1** se obtuvo que basados en las variaciones del valor de RMSD a lo largo de la simulación tanto para el ligando (0.4 Å para **17** y 1.5 Å para **26**) como para la proteína (1.2 Å para **17** y 1.5 Å para **26**), los ligandos son estables en este sitio de unión. Al revisar las interacciones que estos presentan con la proteína, **17** presenta una interacción de tipo enlace de hidrógeno con la cadena peptídica del residuo de la subunidad beta Ala317 en una gran parte de la simulación. Por otro lado, el ligando **26** también presenta interacciones de enlace de hidrógeno con el residuo Asn101 de la subunidad alfa y con los residuos Asn249 y Ala250 de la subunidad beta. El sitio de unión de la colchicina se caracteriza porque el tipo de interacciones que más contribuyen a la unión de ligandos en este sitio son hidrofóbicas [219]. La interacción con el residuo Cys241 de la subunidad es uno de los residuos clave para la interacción en el sitio de unión de la colchicina. Sin embargo, esta

interacción no fue observada en las simulaciones de dinámica molecular aquí realizadas [200].

Como se mencionó anteriormente, debido a que este sitio de unión se encuentra ubicado en la interfase de las dos subunidades de la tubulina, este presenta una gran variedad de residuos con los que se pueden generar interacciones dentro de los cuales se pueden encontrar, en la subunidad alfa con los residuos Leu242, Leu248, Ala250, Leu255, Met259, Val315, Ala316, Ile318 e Ile378 y en la subunidad beta con los residuos Ala180 y Val181 [219]. Como se puede ver, estos residuos son en su gran mayoría hidrofóbicos, lo cual contrasta con los resultados obtenidos de los modelos de acoplamiento molecular y las simulaciones de dinámica molecular, en donde ninguno de los ligandos evaluados presenta interacción con estos residuos. Esto permite proponer la hipótesis de que estos ligandos interactúan preferiblemente con la tubulina en el sitio de unión del taxol basados en los resultados de interacción por RMN y los cálculos computacionales.

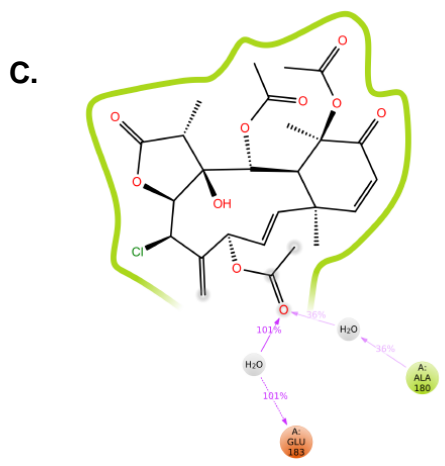
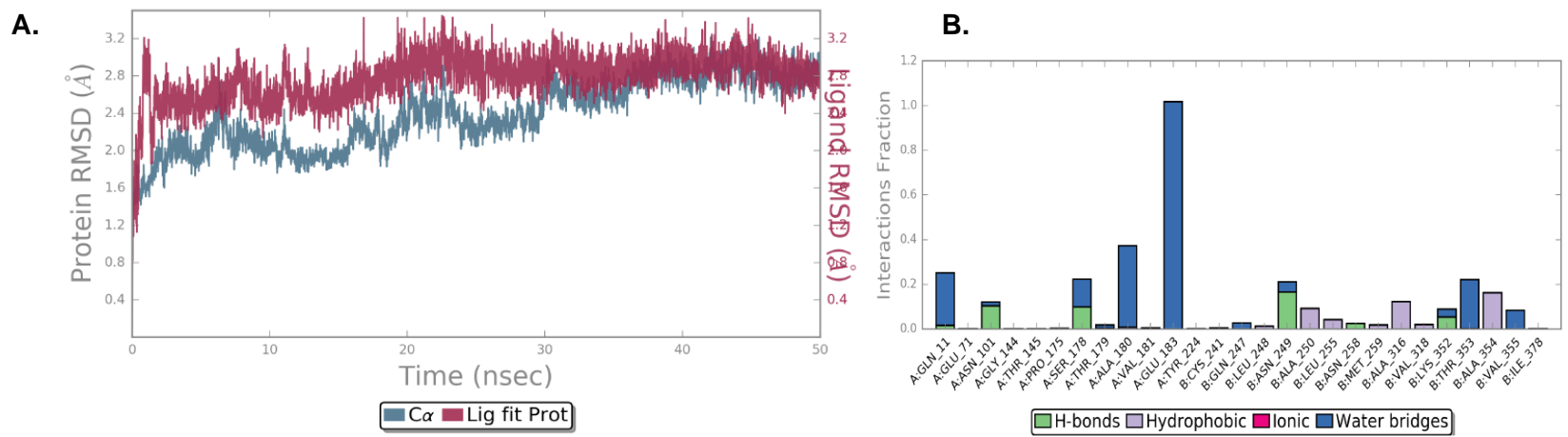


Figura 2.23 Variación del RMSD del ligando (rojo) y la proteína (azul) durante la simulación de dinámica molecular (A); proporción de las interacciones del ligando con la proteína durante la simulación (B); interacciones de **1** con la proteína en el sitio de unión de la colchicina (C).

3. Conclusiones y recomendaciones

La actividad citotóxica de una librería de diterpenos de origen marino fue evaluada a través de la integración de aproximaciones *in vitro* e *in silico*, permitiendo una aproximación racional y veraz a la evaluación del potencial que tienen diterpenos aislados de la diversidad marina colombiana como compuestos con actividad antitumoral.

A partir de la evaluación de una colección de 32 diterpenos se identificaron 3 compuestos con valores promisorios de actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer humano de pulmón, de mama y de próstata. El briarano **1**, junto con los cembranos **17** y **26** fueron seleccionados al presentar valores de IC₅₀ menores a 30 µM contra las tres líneas celulares evaluadas.

Se estableció que los ligandos **1**, **17** y **26** son inductores de la apoptosis en la línea de cáncer de pulmón A549 a través de los análisis por citometría de flujo de las células tratadas con diferentes concentraciones de los ligandos, usando los fluorocromos Anexina V/7AAD. Con estos resultados los ligandos **1**, **17** y **26** pueden ser considerados como promisorios agentes inductores de apoptosis y pueden ser el punto de partida para la optimización de estos a través del desarrollo de estudios adicionales que confirmen la actividad la actividad estabilizante propuesta.

Esta selección permitió llevar a cabo un estudio para la determinación de interacción de estos compuestos con la proteína tubulina utilizando RMN como técnica biofísica para describir la interacción. A través de experimentos STD fue posible establecer que los compuestos **1**, **17** y **26**, interactúan con la tubulina. Así mismo, fueron establecidos los epítomos de unión de cada uno de estos ligandos a través de este experimento. Adicionalmente, la medición de los coeficientes de difusión de estos ligandos en presencia y ausencia de la proteína y los tiempos de relajación T_1 y T_2 permitieron obtener una caracterización completa de las interacciones observadas en el experimento STD y una estimación de la constante de disociación de estos ligandos. Con los resultados obtenidos,

se estableció que los ligandos **1**, **17** y **26** son ligandos de mediana a alta afinidad para la tubulina y que sus epítomos de unión están en los protones en las posiciones H-13 y H-14 para el compuesto **1**, en las posiciones H9, en el metilo alílico CH₃-19 y en el metilo del acetato en C-14 para el compuesto **17**, mientras que para el compuesto **26**, además de los anteriores, se observaron interacciones del metilo del acetato en la posición C-4.

El acoplamiento molecular permitió realizar una exploración de los modos de unión de los ligandos seleccionados en el sitio de unión de la colchicina y el taxol. Así se logró establecer modelos de unión ligando-receptor para cada uno de los tres ligandos en ambos sitios de unión. Las interacciones observadas experimentalmente a través del estudio por RMN fueron confirmadas y se observaron principalmente interacciones con residuos importantes del sitio de unión del taxol. La interacción con el residuo Thr276 fue observada en los tres ligandos y es una de las más importantes para presentar la actividad estabilizante de los microtúbulos, junto con otras interacciones que contribuyen a la estabilización del ligando en el sitio de unión. Las simulaciones de dinámica molecular permitieron confirmar la estabilidad de los ligandos en ambos microambientes proteicos, así como las interacciones con los residuos clave para la unión de los ligandos en estos sitios de unión, complementando la información obtenida experimentalmente en el estudio por RMN.

Así la integración de las herramientas biofísicas, con las predicciones computacionales aquí empleadas permitieron proponer el sitio de unión, el modo de unión y los residuos con los que interactúan los tres ligandos que mostraron inducir apoptosis por interacción con tubulina en células tumorales de pulmón.

Finalmente, se recomienda llevar a cabo ensayos de competición por RMN tanto en el sitio de unión del taxol como de la colchicina, para establecer de manera inequívoca el sitio de unión de estos ligandos y confirmar los modelos computacionales obtenidos. Así mismo, se recomienda la realización de ensayos como microscopia de fluorescencia para estudiar cómo se afecta la estructura y la dinámica de los microtúbulos en presencia de los ligandos aquí evaluados.

4. Materiales y métodos

4.1 General

Los experimentos de RMN fueron adquiridos en un espectrómetro 500 VNMRS Agilent (499.78 MHz para ^1H). Para la lectura de los ensayos de viabilidad celular en placas de 96 pozos se usó un lector de placas de ELISA Tecan Sunrise Eliza-Reader (Hombrechtikon, Switzerland) leyendo a una longitud de onda de 595 nm. Las mediciones de citometría de flujo fueron realizadas en un Citometro de Flujo FACSCanto II - Configuración 4-2-2, equipado con un láser de estado sólido (azul), a 488 nm / 20 mW de potencia y un láser de He-Ne (rojo), a 633 nm / 17 mW de potencia. Todos los solventes usados fueron grado HPLC.

4.2 Ensayos de viabilidad celular

Las líneas celulares tumorales fueron compradas a la ATCC y cultivadas siguiendo las recomendaciones hechas por ellos. Las líneas celulares A549 (cáncer de pulmón humano), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) y PC3 (cáncer de próstata humano) fueron cultivadas en el medio modificado Dulbecco Eagle (DMEM) (Lonza, Rockland, ME) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Gibco, USA) y 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza, Rockland, ME) en atmosfera húmeda de CO_2 al 5 % y a una temperatura de 37 °C.

La actividad citotóxica de la librería de diterpenos fue determinada a través del ensayo de viabilidad celular usando bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) como indicador de viabilidad de celular en placas de 96 pozos [220]. Brevemente, 100.000 células fueron sembradas en cada pozo y se dejaron incubar por 24h para permitir su adhesión a la placa. Una vez adheridas, se procedió a retirar el medio de cultivo y posteriormente las células fueron tratadas con diferentes concentraciones (100, 30, 10, 1 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$) de cada uno de los 32 compuestos, los cuales estaban previamente

disueltos en DMSO ultra puro (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 mg/mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48h. 10 µL de una solución stock 5 mg/mL de MTT (Thermo-Fisher) disuelto en PBS, fueron añadidos a cada pozo e incubados por 4h a 37 °C en atmosfera húmeda de CO₂ al 5 %. Finalmente, el sobrenadante fue removido y 100 µL de buffer de lisis salino fueron añadidos. La viabilidad celular fue medida por su absorbancia a $\lambda=595$ nm.

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) fue determinada como la concentración a la que el 50 % de las células no son viables. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado usando la siguiente ecuación: % inhibición: $100 \times [\text{Abs}/\text{Abs } 100 \% \text{ supervivencia}]$, donde Abs se entiende como la absorción del pozo a $\lambda=595$ nm. Estos datos fueron posteriormente analizados mediante un modelo logarítmico usando el software GraphPad Prism 5.1, para así determinar el valor de IC₅₀ para cada compuesto frente a las 3 líneas celulares tumorales.

4.3 Caracterización del proceso de muerte celular

Para la caracterización del proceso de muerte celular se utilizó el kit de apoptosis APT750 [221] (Merck, Millipore). Inicialmente, se cultivó la línea tumoral A549 como se describió en el numeral 1.4.2. Los ensayos fueron llevados a cabo en cajas de 6 pozos. Brevemente, 300.000 células fueron sembradas en cada pozo y se dejaron incubar por 24h para permitir su adhesión a la placa. Una vez adheridas, se procedió a retirar el medio de cultivo y posteriormente las células fueron tratadas con tres concentraciones que representan el 25 % de muerte celular, 50 % de muerte celular y 75 % de muerte celular para los compuestos **1**, **17** y **26**.

Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48h. Pasado este tiempo se procedió a retirar el medio de cultivo y a la adición de 1 mL de tripsina 1x (Trypsina-EDTA 0.25%, Gibco, USA) para recuperar las células de la placa. Esta se incubo por 3 min a 37°C. 2 mL de PBS se añadieron para neutralizar la tripsina adicionada. La suspensión de células se transfirió a un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó por 3 min a 1500 rpm. El sobrenadante fue removido y las células fueron suspendidas en 300 µL de buffer de unión 1x a una temperatura de 4 °C (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, Merck, Millipore). 200 µL de esta suspensión fueron transferidos al tubo para la medición en el

citómetro de flujo; 4.5 μL del conjugado de anexina V, ApopNexin™ FITC (Merck, Millipore) fueron añadidos a esta suspensión y 2 μL de 7AAD (Gibco, USA) fueron también añadidos. La suspensión fue mezclada e incubada por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad hasta su lectura.

20000 eventos fueron analizados durante la lectura en el citómetro de flujo. Cada tratamiento fue comparado con los respectivos controles negativos, que consisten en células sin tratamiento sin marcar, células sin tratamiento sólo marcadas con ApopNexin™ FITC, células sin tratamiento sólo marcadas con 7AAD y células sin tratamiento marcadas con ambos fluorocromos. Para así establecer la auto compensación de las lecturas para las células con los tratamientos de los compuestos mencionados, asegurando así que las células se encuentran vivas al momento del desprendimiento y la lectura, y que los efectos de muerte celular observados en las lecturas son producto de la adición de los tratamientos de los compuestos.

4.4 Preparación de las muestras para los análisis por RMN

Los ligandos **1**, **17** y **26** fueron disueltos en DMSO deuterado (DMSO- d_6) (Sigma-Aldrich) para obtener una solución stock 120 mM. La tubulina (Cytoskeleton, Inc.) fue disuelta en buffer fosfato salino pH 7.4 10 mM y purificada por ultrafiltración usando el filtro Amicon Ultra-4 10K (Merck Millipore) en 5 ciclos de 20 minutos a 6000 rpm.

Para los experimentos STD, cada compuesto fue preparado a una concentración de 1 mM en buffer fosfato salino pH 7.4 (10 mM) y 10% D_2O , la tubulina purificada (100 μM) fue añadida al medio obteniendo una relación molar de 100:1 (ligando:proteína), para conseguir un volumen final de 600 μL . Para la medición de los tiempos de relajación y coeficiente de difusión la muestra contenía la misma relación ligando:proteína. En este caso se utilizó como medio de disolución buffer fosfato salino pH 7.4 (10 mM) preparado en D_2O .

4.5 Experimentos de STD para la determinación de la interacción de los compuestos activos con la tubulina

Todos los experimentos fueron adquiridos a 25°C en un espectrómetro 500 VNMRS (Agilent) operando a una frecuencia de 499.78 MHz para el núcleo de ^1H y procesados

usando el software MestReNova 6.0.2. Los experimentos fueron adquiridos usando la secuencia de pulsos básica descrita por Mayer y Meyer [143], con la inclusión de la secuencia DPFGE (Double Pulsed Field Gradient Spin Echo) [188] para la supresión de la señal del agua residual. La sustracción de los espectros fue hecha en *scans* alternados para generar el espectro diferencial. Dos segundos fueron usados para la transferencia de la saturación, la irradiación para el espectro *on-resonance* fue hecha a una frecuencia de -2897 Hz (-1.5 ppm) y para el espectro *off-resonance* a 15970.9 Hz (30 ppm) con una potencia de 10 dB, usando un pulso de saturación gaussiano con una duración de 50 milisegundos. Los espectros fueron adquiridos con 1024 *scans*.

4.6 Caracterización de la interacción ligando-tubulina a través de medidas de relajación

La medición del tiempo de relajación T_1 fue hecha usando el experimento de inversión recuperación [222]. Con una ventana espectral (*sw*) de 14 ppm, un tiempo de relajación d_1 de 20 segundos, la duración del pulso de 90° (*pw90*) fue de 10.25 μ s, 10 incrementos del *delay* (d_2) fueron realizados entre 0.0625 y 32 segundos. Los espectros fueron adquiridos con 16 *scans*. Finalmente, se hizo la integración de cada una de las señales que corresponden al ligando y se calculó el diferencial del tiempo de relajación para cada núcleo del ligando en presencia y ausencia de la tubulina.

La medición del tiempo de relajación T_2 fue hecha usando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) [223]. Con una ventana espectral (*sw*) de 14 ppm, un tiempo de relajación d_1 de 10 segundos, un *pw90* de 9.5 μ s. Nueve incrementos del *delay* (d_2) fueron realizados entre 0.025 y 6.4 segundos, los espectros fueron adquiridos con 16 *scans*. Finalmente, se hizo la integración de cada una de las señales que corresponden al ligando y se calculó el diferencial del tiempo de relajación para cada núcleo del ligando en presencia y ausencia de la tubulina.

4.7 Medidas de difusión para la estimación de la constante de disociación (K_D)

El coeficiente de difusión del ligando en presencia y ausencia de la tubulina fue determinado usando la secuencia *Bipolar Pulse Pair Longitudinal Eddy Current Delay*

(BPPLIED) [195]. Se utilizó un *Diffusion delay* (Δ) de 50 ms, la duración de los pulsos de gradiente fue de 2 ms, la fuerza del pulso de gradiente fue aumentada en 15 incrementos desde 1300 hasta 32500 G²/cm². El tiempo de estabilización para los pulsos de gradiente fue de 0.5 ms, un pw90 de 10.25 μ s fue utilizado. Finalmente, los espectros fueron adquiridos con 32 *scans*. La constante de disociación fue estimada usando la ecuación propuesta por Larive [224], [225]:

$$K_d = P_{tot} \left(\frac{D_b - D_o}{D_o - D_f} \right) + L_{tot} \left(\frac{D_b - D_b}{D_b - D_f} \right)$$

Ecuación 1

Donde, P_{tot} corresponde a la concentración total de la tubulina, L_{tot} a la concentración total del ligando, D_o coeficiente de difusión medido para las señales resueltas del ligando en el espectro de la mezcla ligando-proteína, D_f coeficiente de difusión medido para la proteína y el ligando libres, respectivamente; D_b es el coeficiente de difusión para el ligando ligado a la proteína el cual se aproxima al coeficiente de difusión de la proteína libre.

4.8 Acoplamiento molecular

Los 32 compuestos fueron modelados tridimensionalmente usando el software MarvinSketch 17.28.0 (ChemAxon Ltd.) para generar los archivos del ligando con extensión .mol2. La preparación de estos archivos consistió en la adición de las cargas atómicas parciales, los hidrógenos polares y no polares, la asignación de los tipos de átomos, la definición del centro de rotación del ligando y la asignación de los enlaces rotables y no rotables usando la *suite* AutoDockTools 1.5.6 [202], para finalmente generar el archivo con extensión .pdbqt para cada compuesto

Los archivos de coordenadas para la tubulina en presencia de taxol y colchicina (PDB ID. 1JFF y 1SA0, respectivamente), fueron obtenidos del repositorio *Protein Data Bank* (PDB). La remoción de moléculas de agua, ligandos, cofactores, iones y todas aquellas moléculas accesorias que no deben ser incluidas en el receptor fue hecha usando la versión académica del software Free Maestro 11.4 (Schrödinger), con el archivo del receptor preparado este se guardó con extensión .pdbqt en el programa *suite* AutoDockTools 1.5.6, el cual, junto con el archivo .pdbqt del ligando son los archivos de entrada para el acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular (*Docking*) fue llevado a cabo en un *grid map* de 56x56x56 puntos centrados en el ligando ($x=3.00$; $y=-22.00$; $z=-11.00$ para el taxol) y ($x=-1.00$; $y=-3.00$; $z=-4.00$ para la colchicina), con un espaciado en el *grid* de 0.375 Å. 50 corridas con 10 millones de evaluaciones usando el algoritmo híbrido genético Lamarckiano como método de búsqueda, fueron realizadas para cada compuesto tanto en el sitio de unión del taxol como el de la colchicina. Los resultados del acoplamiento molecular fueron analizados y visualizados en la interfaz gráfica del paquete AutoDockTools 1.5.6.

4.9 Simulaciones de dinámica molecular

Los mejores modos de unión obtenidos del acoplamiento molecular para los ligandos **1**, **17** y **26** tanto en el sitio de unión del taxol como la colchicina, fueron sometidos al protocolo de simulación de dinámica molecular usando el software Desmond [226]. Para los seis complejos ligando-proteína fue construido un sistema ortorrómbico de 10 Å³, utilizando el modelo de asociación de agua TIP3P. Para los sistemas en el sitio de unión del taxol, estos fueron neutralizados mediante la adición de 14 átomos de sodio (Na⁺); para los complejos ligando-proteína en el sitio de unión de la colchicina los sistemas fueron neutralizados mediante la adición de 21 átomos de sodio (Na⁺), sal (NaCl) a una concentración de 0.15 M fue añadida al sistema para simular sistema fisiológico.

El tiempo total de la simulación de producción fue de 50 ns, registrando en intervalos de 1.2 ps y una trayectoria de 9.6. La simulación fue llevada a cabo utilizando un *ensemble class* NPT, a una temperatura de 300 K y una presión de 1.01325 bar, el sistema fue relajado antes de la simulación utilizando los protocolos de simulación que proporciona el software por defecto. La visualización y análisis de las trayectorias generadas en la simulación fue hecha en Maestro 11.4 (Schrödinger).

5. Referencias

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Siegel, L. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.," *CA A J. Clin.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–31, 2018.
- [2] IQWiG (Institute for Quality and Efficiency in Health Care), "How does chemotherapy work?," 2016. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072611/>. [Accessed: 06-Nov-2017].
- [3] K. B. Glaser and A. M. S. Mayer, "A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 78, no. 5, pp. 440–448, 2009.
- [4] W. H. Gerwick and B. S. Moore, "Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 85–98, 2012.
- [5] B. Shen, "A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery," *Cell*, vol. 163, no. 6, pp. 1297–1300, 2015.
- [6] E. Patridge, P. Gareiss, M. S. Kinch, and D. Hoyer, "An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 2, pp. 204–207, 2016.
- [7] R. Macarron, "Critical review of the role of HTS in drug discovery," *Drug Discov. Today*, vol. 11, no. 7–8, pp. 277–279, 2006.
- [8] V. Lounnas, T. Ritschel, J. Kelder, R. McGuire, R. P. Bywater, and N. Foloppe, "Current progress in Structure-Based Rational Drug Design marks a new mindset in drug discovery.," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 5, p. e201302011, 2013.
- [9] M. J. Harner, L. Mueller, K. J. Robbins, and M. D. Reily, "NMR in drug design," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 628, pp. 132–147, 2017.
- [10] A. Bhunia, S. Bhattacharjya, and S. Chatterjee, "Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 9–10, pp.

- 505–513, 2012.
- [11] M. Coles, M. Heller, and H. Kessler, “NMR-based screening technologies,” *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 17, pp. 803–810, 2003.
- [12] C. Fernández and W. Jahnke, “New approaches for NMR screening in drug discovery,” *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 1, no. 3, pp. 277–283, 2004.
- [13] M. Pellecchia *et al.*, “Perspectives on NMR in drug discovery: A technique comes of age,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 9, pp. 738–745, Sep. 2008.
- [14] J. A. Huertas Quintero, J. C. Rivillas García, and Et.al, *Guía metodológica para el observatorio Nacional de Cáncer*. 2015.
- [15] A. C. Society, “Cancer facts & figures 2017,” *Atlanta Am. Cancer Soc.*, 2017.
- [16] M. Piñeros, O. Gamboa, and A. Suárez, “Mortalidad por cáncer infantil en Colombia durante 1985 a 2008,” *Rev Panam Salud Pública*, vol. 30, no. 1, pp. 15–21, 2011.
- [17] J. Ospina ML, Huertas JA, Montañó JI, Rivillas, “Observatorio Nacional de Cáncer Colombia,” *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, vol. 33, no. 2, pp. 262–276, 2015.
- [18] National Cancer Institute, “¿Qué es el cáncer? - National Cancer Institute,” 2015. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>. [Accessed: 01-Oct-2017].
- [19] Dangoor N. & Dangoor R., “Types of cancer | Cancer Research UK,” 2014. [Online]. Available: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>. [Accessed: 09-Oct-2017].
- [20] S. Srivastava, S. Ghosh, J. Kagan, and R. Mazurchuk, “The Making of a PreCancer Atlas: Promises, Challenges, and Opportunities,” *Trends in Cancer*, vol. 4, no. 8. pp. 523–536, 2018.
- [21] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer.,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [22] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5. pp. 646–674, 2011.
- [23] W. F. Stenson and M. A. Ciorba, *Cell Death*, Seventh Ed., vol. 1–2. Elsevier Inc., 2018.
- [24] L. Galluzzi *et al.*, “Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.,” *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 3, pp. 486–541, 2018.

-
- [25] J. -U Schweichel and H. -J Merker, "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues," *Teratology*, vol. 7, no. 3, pp. 253–266, 1973.
- [26] L. Galluzzi *et al.*, "Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications," *Cell Death and Differentiation*, vol. 14, no. 7. pp. 1237–1243, 2007.
- [27] M. O. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis," *Nature*, vol. 407, no. 6805. pp. 770–776, 2000.
- [28] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [29] W. F. Stenson and M. A. Ciorba, *Cell Death*, Sixth Edit., vol. 1–2. Elsevier Inc., 2018.
- [30] D. Tang, R. Kang, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, and G. Kroemer, "The molecular machinery of regulated cell death," *Cell Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 347–364, 2019.
- [31] P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, and J. M. Adams, "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 1. pp. 49–63, 2014.
- [32] W. P. Roos, A. D. Thomas, and B. Kaina, "DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology," *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, no. 1. pp. 20–33, 2016.
- [33] I. Vitale, G. Manic, R. De Maria, G. Kroemer, and L. Galluzzi, "DNA Damage in Stem Cells," *Molecular Cell*, vol. 66, no. 3. pp. 306–319, 2017.
- [34] G. Brumatti, M. Salmanidis, and P. G. Ekert, "Crossing paths: Interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 67, no. 10. pp. 1619–1630, 2010.
- [35] S. W. G. Tait and D. R. Green, "Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 11, no. 9. pp. 621–632, 2010.
- [36] L. Galluzzi, O. Kepp, and G. Kroemer, "Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control," *Microb. Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 101–108, 2016.
- [37] T. Moldoveanu, A. V. Follis, R. W. Kriwacki, and D. R. Green, "Many players in BCL-2 family affairs," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 39, no. 3. pp. 101–111, 2014.
- [38] A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber, and D. W. Andrews, "Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 1–21, 2013.
- [39] A. R. D. Delbridge, S. Grabow, A. Strasser, and D. L. Vaux, "Thirty years of BCL-2:

- Translating cell death discoveries into novel cancer therapies,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, no. 2. pp. 99–109, 2016.
- [40] S. Naghdi, P. Várnai, and G. Hajnóczky, “Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 41, pp. E5590–E5599, 2015.
- [41] T. Nunes, C. Bernardazzi, and H. S. De Souza, “Cell death and inflammatory bowel diseases: Apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [42] D. A. Flusberg and P. K. Sorger, “Surviving apoptosis: Life-death signaling in single cells,” *Trends in Cell Biology*, vol. 25, no. 8. pp. 446–458, 2015.
- [43] B. Gibert and P. Mehlen, “Dependence receptors and cancer: Addiction to trophic ligands,” *Cancer Research*, vol. 75, no. 24. pp. 5171–5175, 2015.
- [44] B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, and J. H. Kim, “Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey,” *Blood*, vol. 119, no. 3. pp. 651–665, 2012.
- [45] P. Mehlen and D. E. Bredesen, “Dependence receptors: From basic research to drug development,” in *Science Signaling*, 2011, vol. 4, no. 157.
- [46] S. Von Karstedt, A. Montinaro, and H. Walczak, “Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 17, no. 6. pp. 352–366, 2017.
- [47] K. G. Fleten *et al.*, “hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma,” *Cell Death Discov.*, vol. 2, no. 1, 2016.
- [48] L. S. Dickens, I. R. Powley, M. A. Hughes, and M. MacFarlane, “The ‘complexities’ of life and death: Death receptor signalling platforms,” *Experimental Cell Research*, vol. 318, no. 11. pp. 1269–1277, 2012.
- [49] M. P. Boldin, T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev, and D. Wallach, “Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death,” *Cell*, vol. 85, no. 6, pp. 803–815, 1996.
- [50] U. Yadava, V. K. Yadav, and R. K. Yadav, “Novel anti-tubulin agents from plant and marine origins: insight from a molecular modeling and dynamics study,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 26, pp. 15917–15925, 2017.
- [51] J. H. Hayden, S. S. Bowser, and C. L. Rieder, “Kinetochores capture astral

- microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: Direct visualization in live newt lung cells," *J. Cell Biol.*, vol. 111, no. 3, pp. 1039–1045, 1990.
- [52] F. Bartolini and G. G. Gundersen, "Formins and microtubules," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1803, no. 2, pp. 164–173, 2010.
- [53] A. S. Negi *et al.*, "Natural antitubulin agents: Importance of 3,4,5-trimethoxyphenyl fragment," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 23, no. 3, pp. 373–389, 2015.
- [54] R. Horbay and R. Bilyy, "Mitochondrial dynamics during cell cycling," *Apoptosis*, vol. 21, no. 12, pp. 1327–1335, 2016.
- [55] National cancer institute, "Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute," *national institutes of health*, 2017. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. [Accessed: 16-Oct-2017].
- [56] American Cancer Society, "How Is Chemotherapy Used to Treat Cancer?" [Online]. Available: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer.html>. [Accessed: 18-Oct-2017].
- [57] C. Janke, "The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions," *J. Cell Biol.*, vol. 206, no. 4, pp. 461–472, 2014.
- [58] J. J. Field, J. F. Díaz, and J. H. Miller, "The binding sites of microtubule-stabilizing agents," *Chemistry and Biology*, vol. 20, no. 3, pp. 301–315, 2013.
- [59] P. G. Pei, E. Pasquier, and M. Kavallaris, "Class III β -tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non-small cell lung cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 19, pp. 9356–9363, 2007.
- [60] L. M. Miller *et al.*, "Increased levels of a unique post-translationally modified β IVb-tubulin isotype in liver cancer," *Biochemistry*, vol. 47, no. 28, pp. 7572–7582, 2008.
- [61] P. Verdier-Pinard *et al.*, "Detection of human β V-tubulin expression in epithelial cancer cell lines by tubulin proteomics," *Biochemistry*, vol. 44, no. 48, pp. 15858–15870, 2005.
- [62] M. T. Islam, "Diterpenes and Their Derivatives as Potential Anticancer Agents," *Phyther. Res. PTR*, vol. 31, no. 5, pp. 691–712, 2017.
- [63] V. Lanzotti, "Diterpenes for Therapeutic Use," in *Natural Products*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 3173–3191.
- [64] U. Bathe and A. Tissier, "Cytochrome P450 enzymes: A driving force of plant

- diterpene diversity,” *Phytochemistry*, vol. 161, no. December 2018, pp. 149–162, 2019.
- [65] J. Degenhardt, T. G. Köllner, and J. Gershenzon, “Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants,” *Phytochemistry*, vol. 70, no. 15–16, pp. 1621–1637, 2009.
- [66] C. Sallaud *et al.*, “A Novel Pathway for Sesquiterpene Biosynthesis from Z,Z - Farnesyl Pyrophosphate in the Wild Tomato *Solanum habrochaites*,” *Plant Cell*, vol. 21, no. 1, pp. 301–317, 2009.
- [67] A. L. Schillmiller *et al.*, “Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 26, pp. 10865–10870, 2009.
- [68] P. Zerbe and J. Bohlmann, “Enzymes for synthetic biology of ambroxide-related diterpenoid fragrance compounds,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 148, pp. 427–447, 2015.
- [69] P. Zerbe and J. Bohlmann, “Plant diterpene synthases: Exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering,” *Trends in Biotechnology*, vol. 33, no. 7, pp. 419–428, 2015.
- [70] D. Werck-Reichhart and R. Feyereisen, “Cytochromes P450: a success story,” *Genome Biol.*, vol. 1, no. 6, p. REVIEWS3003, 2000.
- [71] J. Guo *et al.*, “Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones,” *New Phytol.*, vol. 210, no. 2, pp. 525–534, 2016.
- [72] K. Geisler, N. B. Jensen, M. M. S. Yuen, L. Madilao, and J. Bohlmann, “Modularity of Conifer Diterpene Resin Acid Biosynthesis: P450 Enzymes of Different CYP720B Clades Use Alternative Substrates and Converge on the Same Products,” *Plant Physiol.*, vol. 171, no. 1, pp. 152–164, 2016.
- [73] D. Nelson and D. Werck-Reichhart, “A P450-centric view of plant evolution,” *Plant J.*, vol. 66, no. 1, pp. 194–211, 2011.
- [74] B. Hamberger, T. Ohnishi, B. Hamberger, A. Séguin, and J. Bohlmann, “Evolution of Diterpene Metabolism: Sitka Spruce CYP720B4 Catalyzes Multiple Oxidations in Resin Acid Biosynthesis of Conifer Defense against Insects,” *Plant Physiol.*, vol. 157, no. 4, pp. 1677–1695, 2011.
- [75] H. Lei, “Diterpenoids of Gorgonian Corals: Chemistry and Bioactivity,” *Chem.*

- Biodivers.*, vol. 13, no. 4, pp. 345–365, 2016.
- [76] D. W. Christianson, “Unearthing the roots of the terpenome,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 12, no. 2, pp. 141–150, 2008.
- [77] S. Xu *et al.*, “Probing the Anticancer Action of Oridonin with Fluorescent Analogues: Visualizing Subcellular Localization to Mitochondria,” *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 10, pp. 5022–5034, 2016.
- [78] C. Aromdee, “Andrographolide: progression in its modifications and applications – a patent review (2012 – 2014),” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 24, no. 10, pp. 1129–1138, 2014.
- [79] N. Yan *et al.*, “Chemical structures, biosynthesis, bioactivities, biocatalysis and semisynthesis of tobacco cembranoids: An overview,” *Industrial Crops and Products*, vol. 83, Elsevier, pp. 66–80, 01-May-2016.
- [80] S. R. Chen, Y. Dai, J. Zhao, L. Lin, Y. Wang, and Y. Wang, “A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook F,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, no. FEB. 2018.
- [81] National Library of Medicine, “A Phase II, International Open Label Trial of Minnelide™ in Patients With Refractory Pancreatic Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov,” *April 18, 2017, 2017.* [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03117920>. [Accessed: 06-Jun-2019].
- [82] S. Banerjee and A. Saluja, “Minnelide, a novel drug for pancreatic and liver cancer,” *Pancreatology*, vol. 15, no. 4, 2015.
- [83] G. M. Cragg, “Paclitaxel (Taxol®): A success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development,” *Med. Res. Rev.*, vol. 18, no. 5, pp. 315–331, 1998.
- [84] I. Rodrigues, M. Miguel, W. Mnif, I. G. Rodrigues, M. G. Miguel, and W. Mnif, “A Brief Review on New Naturally Occurring Cembranoid Diterpene Derivatives from the Soft Corals of the Genera *Sarcophyton*, *Sinularia*, and *Lobophytum* Since 2016,” *Molecules*, vol. 24, no. 4, p. 781, Feb. 2019.
- [85] Y. Di Su *et al.*, “Briarane diterpenoids isolated from octocorals between 2014 and 2016,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 2, pp. 1–11, 2017.
- [86] T. Lindel *et al.*, “Eleutherobin, a new cytotoxin that mimics paclitaxel (Taxol) by stabilizing microtubules,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 37, pp. 8744–8745, 1997.
- [87] M. Roberge *et al.*, “Cell-based screen for antimitotic agents and identification of

- analogues of rhizoxin, eleutherobin, and paclitaxel in natural extracts," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 18, pp. 5052–5058, 2000.
- [88] E. Hamel, D. L. Sackett, D. Vourloumis, and K. C. Nicolaou, "The coral-derived natural products eleutherobin and sarcodictyins A and B: Effects on the assembly of purified tubulin with and without microtubule-associated proteins and binding at the polymer taxoid site," *Biochemistry*, vol. 38, no. 17, pp. 5490–5498, 1999.
- [89] Y. Hu *et al.*, "Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 1, pp. 202–221, 2015.
- [90] S. Gupta and N. Abu-Ghannam, "Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 22, no. 6. Elsevier, pp. 315–326, 01-Jun-2011.
- [91] C. Urda, R. Fernández, M. Pérez, J. Rodríguez, C. Jiménez, and C. Cuevas, "Protoxenicins A and B, Cytotoxic Long-Chain Acylated Xenicanes from the Soft Coral *Protodendron repens*," *Journal of Natural Products*, vol. 80, no. 3. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy, pp. 713–719, 24-Mar-2017.
- [92] M. M. Mohyeldin, M. R. Akl, A. B. Siddique, H. M. Hassan, and K. A. El Sayed, "The marine-derived pachycladin diterpenoids as novel inhibitors of wild-type and mutant EGFR," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 126, pp. 51–68, Feb. 2017.
- [93] H. I. Januar, E. Chasanah, C. A. Motti, D. M. Tapiolas, C. H. Liptrot, and A. D. Wright, "Cytotoxic cembranes from Indonesian specimens of the soft coral *Nephthea* sp.," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 7, pp. 2142–2152, Jul. 2010.
- [94] M. S. Zubair, S. Anam, K. O. Al-footy, A. Abdel-lateef, and W. M. Alarif, "Cembranoid Diterpenes as Antitumor: Molecular Docking Study to Several Protein Receptor Targets," vol. 2, no. September, pp. 121–125, 2014.
- [95] M. P. La *et al.*, "Briarane diterpenoids from the gorgonian *Dichotella gemmacea*," *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 12, pp. 6178–6189, Dec. 2014.
- [96] A. L. Niles, R. A. Moravec, and T. L. Riss, "In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening," *Curr. Chem. Genomics*, vol. 3, pp. 33–41, 2009.
- [97] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, "Investigation of the Alamar Blue

- (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 17, pp. 5421–5426, Sep. 2000.
- [98] P. Nicotera, M. Leist, and L. Manzo, "Neuronal cell death: A demise with different shapes," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no. 2. Elsevier, pp. 46–51, 01-Feb-1999.
- [99] W. Shi and M. N. Gould, "Induction of cytostasis in mammary carcinoma cells treated with the anticancer agent perillyl alcohol," *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 1, pp. 131–142, Jan. 2002.
- [100] O. Rixe and T. Fojo, "Is Cell Death a Critical End Point for Anticancer Therapies or Is Cytostasis Sufficient?," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 24, pp. 7280–7287, Dec. 2007.
- [101] A. Mullard, "2018 FDA drug approvals," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 18, no. 2, pp. 85–89, Jan. 2019.
- [102] G. A. Petsko, "When failure should be the option.," *BMC Biol.*, vol. 8, no. 1, p. 61, May 2010.
- [103] I. Kola and J. Landis, "Opinion: Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 8, pp. 711–716, Aug. 2004.
- [104] G. R. Murray, "THE LIFE-HISTORY OF THE FIRST CASE OF MYXOEDEMA TREATED BY THYROID EXTRACT.," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 3089, pp. 359–60, Mar. 1920.
- [105] G. Wolf, "The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus.," *J. Nutr.*, vol. 134, no. 6, pp. 1299–1302, Jun. 2004.
- [106] D. J. INGLE, "The biologic properties of cortisone: a review.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 10, no. 10, pp. 1312–1354, Oct. 1950.
- [107] V. Khanna, S. Ranganathan, and N. Petrovsky, *Rational Structure-Based Drug Design*. Elsevier Ltd., 2018.
- [108] S. C. Gupta, J. H. Kim, S. Prasad, and B. B. Aggarwal, "Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 29, no. 3. Springer US, pp. 405–434, 25-Sep-2010.
- [109] H. Ledford, "Drug candidates derailed in case of mistaken identity," *Nature*, vol. 483, no. 7391, pp. 519–519, Mar. 2012.
- [110] S. Prasad, S. C. Gupta, and B. B. Aggarwal, "Serendipity in Cancer Drug Discovery:

- Rational or Coincidence?," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 37, no. 6. Elsevier Current Trends, pp. 435–450, 01-Jun-2016.
- [111] M. Zheng, X. Liu, Y. Xu, H. Li, C. Luo, and H. Jiang, "Computational methods for drug design and discovery: Focus on China," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 34, no. 10. pp. 549–559, Oct-2013.
- [112] S. Mandal, M. Moudgil, and S. K. Mandal, "Rational drug design," *European Journal of Pharmacology*, vol. 625, no. 1–3. Elsevier, pp. 90–100, 25-Dec-2009.
- [113] D. Ramírez, "Computational Methods Applied to Rational Drug Design," *Open Med. Chem. J.*, vol. 10, no. 1, pp. 7–20, 2016.
- [114] A. Hardianto, M. Yusuf, F. Liu, and S. Ranganathan, "Structure-Based Drug Design Workflow," *Encycl. Bioinforma. Comput. Biol.*, pp. 273–282, 2018.
- [115] O. Takahashi, Y. Masuda, A. Muroya, and T. Furuya, "Theory of docking scores and its application to a customizable scoring function," *SAR QSAR Environ. Res.*, vol. 21, no. 5–6, pp. 547–558, Jul. 2010.
- [116] E. Yuriev and P. A. Ramsland, "Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 26, no. 5. pp. 215–239, May-2013.
- [117] M. R. Lee and Y. Sun, "Improving docking accuracy through molecular mechanics generalized born optimization and scoring," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, no. 3, pp. 1106–1119, 2007.
- [118] E. Yuriev, M. Agostino, and P. A. Ramsland, "Challenges and advances in computational docking: 2009 in review," *J. Mol. Recognit.*, vol. 24, no. 2, pp. 149–164, Mar. 2011.
- [119] Y. Pak and S. Wang, "Application of a Molecular Dynamics Simulation Method with a Generalized Effective Potential to the Flexible Molecular Docking Problems," *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 2, pp. 354–359, 1999.
- [120] D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, and J. Bajorath, "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 11, pp. 935–949, Nov. 2004.
- [121] V. Mohan, A. C. Gibbs, M. D. Cummings, E. P. Jaeger, and R. L. DesJarlais, "Docking: successes and challenges.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 11, no. c, pp. 323–333, 2005.

-
- [122] E. Krovat, T. Steindl, and T. Langer, "Recent Advances in Docking and Scoring," *Curr. Comput. Aided-Drug Des.*, vol. 1, no. 1, pp. 93–102, Jan. 2005.
- [123] N. R. Penthala *et al.*, "Synthesis, anticancer activity and molecular docking studies on a series of heterocyclic trans-cyanocombretastatin analogues as antitubulin agents," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 92, pp. 212–220, Mar. 2015.
- [124] S. R. Subramanian and D. M. Zuckerman, "Docking to the Highly Flexible Estrogen Receptor Ligand Binding Domain via Mixed-Resolution Monte Carlo," *Biophys. J.*, vol. 108, no. 2, p. 319a, Jan. 2015.
- [125] J. Gao and C. Lv, "Molecular docking to predict hypopharyngeal cancer treatment drugs: Tiliroside-noscapine interaction," *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 33, no. 8, pp. 1397–1399, 2014.
- [126] A. Sabogal-Arango *et al.*, "Computational insights of the interaction among sea anemones neurotoxins and Kv1.3 channel," *Bioinform. Biol. Insights*, vol. 8, pp. 73–81, Jan. 2014.
- [127] Z.-Q. Yi and M.-H. Lu, "Deep Understanding of Metabolic Behaviour of Alisol A Using Molecular Docking," *Lat. Am. J. Pharm. Am. J. Pharm*, vol. 33, no. 3, pp. 522–4, 2014.
- [128] P. S. Kutchukian and E. I. Shakhnovich, "De Novo Design: Balancing Novelty and Confined Chemical Space," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 8, pp. 789–812, Aug. 2010.
- [129] G. Schneider and U. Fechner, "Computer-based *de novo* design of drug-like molecules," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 8, pp. 649–663, Aug. 2005.
- [130] A. S. Reddy, S. P. Pati, P. P. Kumar, H. N. Pradeep, and G. N. Sastry, "Virtual screening in drug discovery -- a computational perspective.," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 8, no. 4, pp. 329–51, Aug. 2007.
- [131] P. D. Lyne, "Structure-based virtual screening: An overview," *Drug Discovery Today*, vol. 7, no. 20, pp. 1047–1055, 15-Oct-2002.
- [132] J. García and P. Bernadó, "GRUPO ESPECIALIZADO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Real Sociedad Española de Química," in *Breve resumen histórico de la Resonancia Magnética Nuclear*, 2006, pp. 1–15.
- [133] A. D. Gossert and W. Jahnke, "NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 97, pp. 82–125, 2016.

-
- [134] A. L. Hopkins, C. R. Groom, and A. Alex, "Ligand efficiency: a useful metric for lead selection," *Drug Discov. Today*, vol. 9, no. 10, pp. 430–431, May 2004.
- [135] I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, and P. A. Kollman, "The maximal affinity of ligands.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 18, pp. 9997–10002, Aug. 1999.
- [136] S. W. Homans, "NMR Spectroscopy Tools for Structure-Aided Drug Design," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 43, no. 3, pp. 290–300, 2004.
- [137] L. W. Tinoco, "Ressonância Magnética Nuclear aplicada ao desenvolvimento de fármacos," in *Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos*, Laboratorio Silanes-CYTED, Ed. 2012, pp. 253–265.
- [138] G. Holdgate *et al.*, "Biophysical methods in drug discovery from small molecule to pharmaceutical," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1008, pp. 327–355, 2013.
- [139] H. L. Silvestre, T. L. Blundell, C. Abell, and A. Ciulli, "Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 32, pp. 12984–9, Aug. 2013.
- [140] D. Joseph-McCarthy, A. J. Campbell, G. Kern, and D. Moustakas, "Fragment-Based Lead Discovery and Design," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 3, pp. 693–704, Mar. 2014.
- [141] M. Mayer and B. Meyer, "Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 38, no. 12, pp. 1784–1788, Jun. 1999.
- [142] G. Wagner and K. Wuthrich, "Truncated driven nuclear overhauser effect (TOE). A new technique for studies of selective ^1H overhauser effects in the presence of spin diffusion," *J. Magn. Reson.*, vol. 33, no. 3, pp. 675–680, Mar. 1979.
- [143] M. Mayer and B. Meyer, "Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 25, pp. 6108–6117, 2001.
- [144] F. L. Nobrega and E. J. Cabrita, "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR : A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding," no. July 2016, pp. 990–994, 2011.
- [145] C. Dalvit *et al.*, "High-throughput NMR-based screening with competition binding experiments," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 26, pp. 7702–7709, 2002.

- [146] M. Shapiro, "Applications of NMR screening in the pharmaceutical industry," in *Farmaco*, 2001, vol. 56, no. 1–2, pp. 141–143.
- [147] H. Reich, "Structure Determination Using NMR," *Chem* 605, 2019. [Online]. Available: <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/>. [Accessed: 22-Apr-2019].
- [148] C. Dalvit, G. P. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, and B. Stockman, "WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability," *J. Biomol. NMR*, vol. 21, no. 4, pp. 349–359, 2001.
- [149] C. Dalvit, A. D. Gossert, J. Coutant, and M. Piotto, "Rapid acquisition of ^1H and ^{19}F NMR experiments for direct and competition ligand-based screening," in *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2011, vol. 49, no. 4, pp. 199–202.
- [150] A. P. Campbell and B. D. Sykes, "The Two-Dimensional Transferred Nuclear Overhauser Effect: Theory and Practice," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 22, no. 1, pp. 99–122, Jun. 1993.
- [151] C. Schalk-Hihi, Y.-Z. Zhang, and G. D. Markham, "The Conformation of NADH Bound to Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Determined by Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy † ," *Biochemistry*, vol. 37, no. 20, pp. 7608–7616, May 1998.
- [152] C. B. Post, "Exchange-transferred NOE spectroscopy and bound ligand structure determination," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 581–588, Oct. 2003.
- [153] B. Becattini and M. Pellecchia, "SAR by ILOEs: An NMR-Based Approach to Reverse Chemical Genetics," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 12, no. 10, pp. 2658–2662, Mar. 2006.
- [154] V. M. Sánchez-Pedregal, M. Reese, J. Meiler, M. J. J. Blommers, C. Griesinger, and T. Carlomagno, "The INPHARMA method: Protein-mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 27, pp. 4172–4175, 2005.
- [155] I. Krimm, "INPHARMA-based identification of ligand binding site in fragment-based drug design," *Medchemcomm*, vol. 3, no. 5, p. 605, 2012.
- [156] J. Orts, C. Griesinger, and T. Carlomagno, "The INPHARMA technique for pharmacophore mapping: A theoretical guide to the method," *J. Magn. Reson.*, vol. 200, no. 1, pp. 64–73, 2009.
- [157] B. Stauch, J. Orts, and T. Carlomagno, "The description of protein internal motions aids selection of ligand binding poses by the INPHARMA method," *J. Biomol. NMR*,

- vol. 54, no. 3, pp. 245–256, 2012.
- [158] A. Hirayama, O. Shirota, M. Nomura, A. Nagadoi, and Y. Nishimura, “A protein recycling system for nuclear magnetic resonance-based screening of drug candidates,” *Anal. Biochem.*, vol. 353, no. 1, pp. 99–107, Jun. 2006.
- [159] C. C. Genick and S. K. Wright, “Biophysics: for HTS hit validation, chemical lead optimization, and beyond,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 12, no. 9, pp. 897–907, Sep. 2017.
- [160] S. A. K. Tanoli *et al.*, “Crude to leads: a triple-pronged direct NMR approach in coordination with docking simulation,” *Analyst*, vol. 138, no. 17, p. 5137, 2013.
- [161] F. Marcelo *et al.*, “Molecular recognition of rosmarinic acid from *Salvia sclareoides* extracts by acetylcholinesterase: A new binding site detected by NMR spectroscopy,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 19, no. 21, pp. 6641–6649, 2013.
- [162] M. T. Gutierrez-Lugo and C. A. Bewley, “Susceptibility and mode of binding of the *Mycobacterium tuberculosis* cysteinyl transferase mycothiol ligase to tRNA synthetase inhibitors,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 8, pp. 2480–2483, 2011.
- [163] D. J. Newman and G. M. Cragg, “Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 4, 2017.
- [164] F. Castellanos *et al.*, “Screening of acetylcholinesterase inhibitors in marine organisms from the Caribbean Sea,” *Natural Product Research*, vol. 6419, Taylor & Francis, pp. 1–8, Jun-2018.
- [165] F. Amaya García *et al.*, “Dolabellane diterpenes from the Caribbean soft corals *Eunicea laciniata* and *Eunicea asperula* and determination of their anti HSV-1 activity,” *Rev. Colomb. Química*, vol. 46, no. 1, p. 5, 2017.
- [166] E. Tello, L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro, and C. Duque, “Cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knighti*,” *J. Nat. Prod.*, vol. 72, no. 9, pp. 1595–1602, 2009.
- [167] E. Tello, L. Castellanos, and C. Duque, “Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 21, no. 1, pp. 242–256, 2013.
- [168] E. Tello, L. Castellanos, C. Arévalo-Ferro, and C. Duque, “Disruption in quorum-sensing systems and bacterial biofilm inhibition by cembranoid diterpenes isolated

- from the octocoral *Eunicea knighti*," *J. Nat. Prod.*, vol. 75, no. 9, pp. 1637–1642, 2012.
- [169] S. A. Look, W. Fenical, D. Van Engen, and J. Clardy, "Erythrolides: Unique Marine Diterpenoids Interrelated by a Naturally Occurring Di- π -methane Rearrangement," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, no. 17, pp. 5026–5027, Aug. 1984.
- [170] J. R. RICE, C. PAPASTEPHANOU, and D. G. ANDERSON, "ISOLATION, LOCALIZATION AND BIOSYNTHESIS OF CRASSIN ACETATE IN *PSEUDOPLEXAURA POROSA* (HOULTUYN)," *Biol. Bull.*, vol. 138, no. 3, pp. 334–343, Jun. 1970.
- [171] A. D. Rodríguez and N. Martínez, "Marine antitumor agents: 14-deoxycrassin and pseudoplexaurool, new cembranoid diterpenes from the Caribbean gorgonian *Pseudoplexaura porosa*," *Experientia*, vol. 49, no. 2, pp. 179–181, 1993.
- [172] H. Matsushima, H. Tanaka, N. Mizumoto, and A. Takashima, "Identification of crassin acetate as a new immunosuppressant triggering heme oxygenase-1 expression in dendritic cells," *Blood*, vol. 114, no. 1, pp. 64–73, 2009.
- [173] A. J. Weinheimer and J. A. Matson, "Crassin acetate, the principal antineoplastic agent 13 in four gorgonians of the *Pseudoplexaura* genus," *Lloydia*, vol. 38, no. 5, pp. 378–382, 1975.
- [174] F. Castellanos, "Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano," Universidad Nacional de Colombia, 2014.
- [175] G. Van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, "Membrane lipids: Where they are and how they behave," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 112–124, 2008.
- [176] P. A. Leventis and S. Grinstein, "The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 39, no. 1, pp. 407–427, 2010.
- [177] K. Balasubramanian and A. J. Schroit, "Aminophospholipid Asymmetry: A Matter of Life and Death," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 701–734, 2003.
- [178] S. Nagata, J. Suzuki, K. Segawa, and T. Fujii, "Exposure of phosphatidylserine on the cell surface," *Cell Death Differ.*, vol. 23, no. 6, pp. 952–961, 2016.
- [179] E. M. Bevers, P. Comfurius, and R. F. A. Zwaal, "Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure," *Blood Rev.*, vol. 5, no. 3, pp. 146–154, 1991.

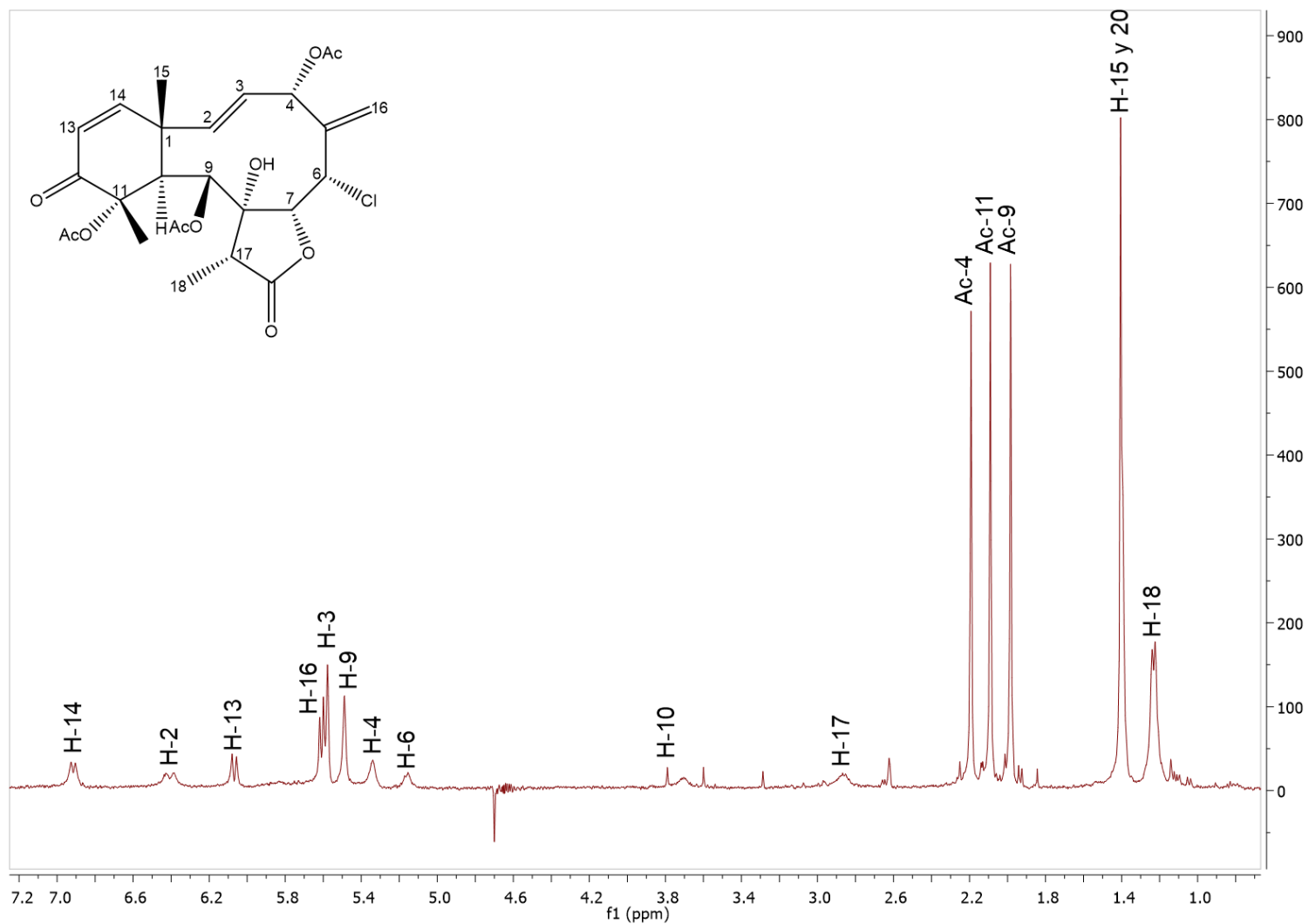
- [180] M. Van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers, B. Schutte, and C. P. M. Reutelingsperger, "Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure," *Cytometry*, vol. 31, no. 1, pp. 1–9, 1998.
- [181] N. C. L. Zembruski, V. Stache, W. E. Haefeli, and J. Weiss, "7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry," *Anal. Biochem.*, vol. 429, no. 1, pp. 79–81, 2012.
- [182] A. Bundscherer *et al.*, "Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin v staining," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 8, pp. 3201–3204, 2013.
- [183] M. A. Estève, M. Carré, and D. Braguer, "Microtubules in apoptosis induction: Are they necessary?," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 7, no. 8, pp. 713–729, 2007.
- [184] K. N. Bhalla, "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis," *Oncogene*, vol. 22, no. 56 REV. ISS. 8, pp. 9075–9086, 2003.
- [185] D. Bates and A. Eastman, "Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 83, no. 2, pp. 255–268, 2017.
- [186] C. Dumontet and M. A. Jordan, "Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 10, pp. 790–803, 2010.
- [187] S. R. LaPlante *et al.*, "Compound Aggregation in Drug Discovery: Implementing a Practical NMR Assay for Medicinal Chemists," *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 12, pp. 5142–5150, Jun. 2013.
- [188] C. Dalvit, "Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules," *J. Biomol. NMR*, vol. 11, no. 4, pp. 437–444, 1998.
- [189] A. Furukawa, T. Konuma, S. Yanaka, and K. Sugase, "Quantitative analysis of protein-ligand interactions by NMR," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 96, pp. 47–57, 2016.
- [190] J. Cavanagh, *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. Academic Press, 2007.
- [191] J. Figueroa-Villar and L. Tinoco, "Spin-Lattice Relaxation Time in Drug Discovery and Design," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 9, no. 9, pp. 811–823, 2009.
- [192] G. Veglia, M. Delfini, M. R. Del Giudice, E. Gaggelli, and G. Valensin, "¹H NMR

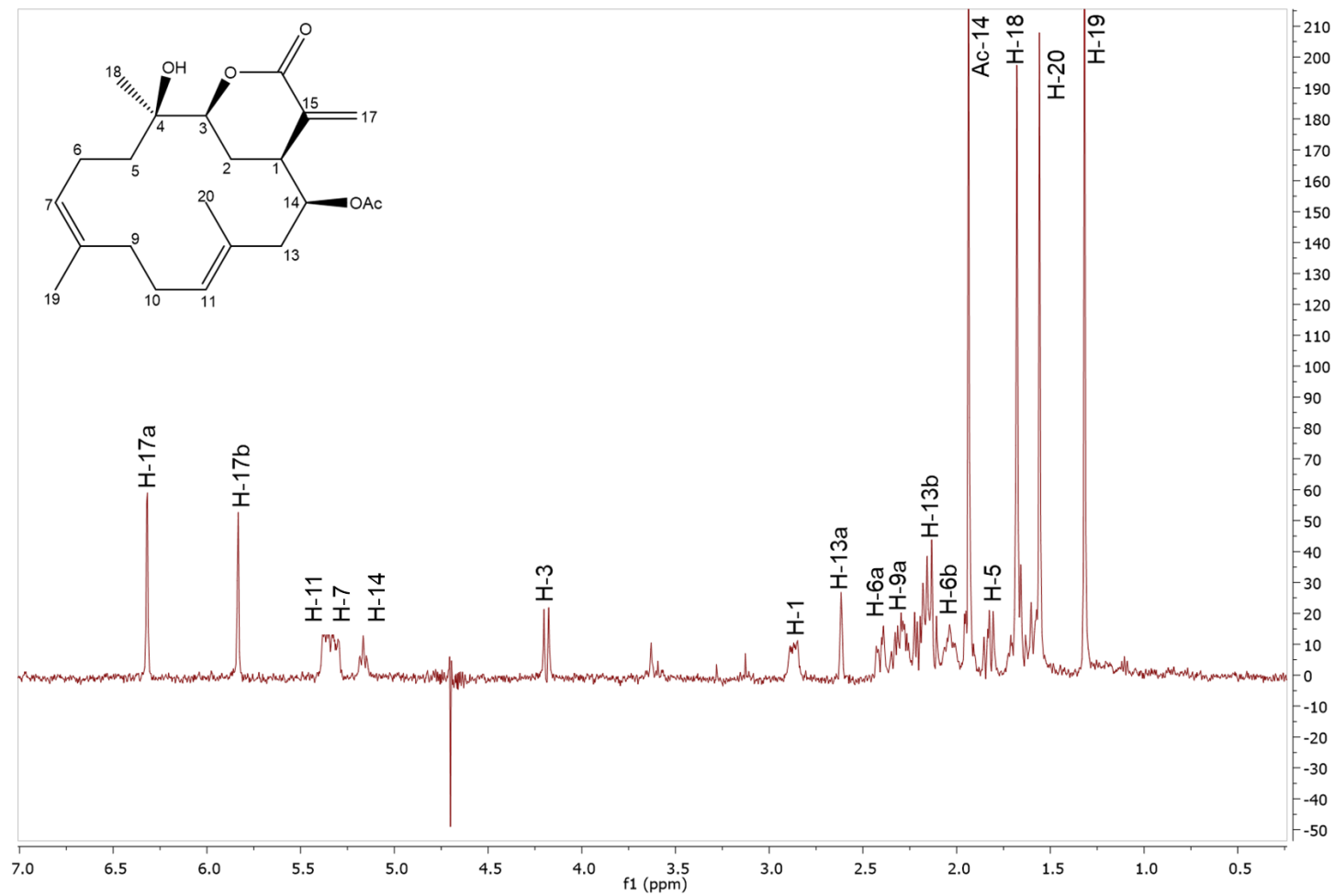
- Studies on the Interaction of β -Carboline Derivatives with Human Serum Albumin," *J. Magn. Reson.*, vol. 130, no. 2, pp. 281–286, 1998.
- [193] Y. F. Cui, G. Y. Bai, C. G. Li, C. H. Ye, and M. L. Liu, "Analysis of competitive binding of ligands to human serum albumin using NMR relaxation measurements," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 34, no. 2, pp. 247–254, 2004.
- [194] B. Antalek, "Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results," *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.*, 2002.
- [195] D. H. Wu, A. Chen, and C. S. Johnson, "An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses," *J. Magn. Reson. Ser. A*, vol. 115, no. 2, pp. 260–264, Aug. 1995.
- [196] R. F. Karlicek and I. J. Lowe, "A modified pulsed gradient technique for measuring diffusion in the presence of large background gradients," *J. Magn. Reson.*, vol. 37, no. 1, pp. 75–91, 1980.
- [197] S. V. Dvinskikh and I. Furó, "Cross-Relaxation Effects in Stimulated-Echo-Type PGSE NMR Experiments by Bipolar and Monopolar Gradient Pulses," *J. Magn. Reson.*, vol. 146, no. 2, pp. 283–289, 2000.
- [198] W. H. Otto and C. K. Larive, "Improved spin-echo-edited NMR diffusion measurements," *J. Magn. Reson.*, vol. 153, no. 2, pp. 273–276, 2001.
- [199] T. Krouglova, J. Vercammen, and Y. Engelborghs, "Correct diffusion coefficients of proteins in fluorescence correlation spectroscopy. Application to tubulin oligomers induced by Mg²⁺ and Paclitaxel.," *Biophys. J.*, vol. 87, no. 4, pp. 2635–2646, 2004.
- [200] F. Naaz, M. R. Haider, S. Shafi, and M. S. Yar, "Anti-tubulin agents of natural origin: Targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 171, pp. 310–331, 2019.
- [201] Y. Lu, J. Chen, M. Xiao, W. Li, and D. D. Miller, "An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 11, pp. 2943–2971, 2012.
- [202] G. M. Morris *et al.*, "Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, Dec. 2009.
- [203] G. M. Morris and M. Lim-Wilby, "Molecular docking," *Methods Mol. Biol.*, vol. 443, pp. 365–382, 2008.

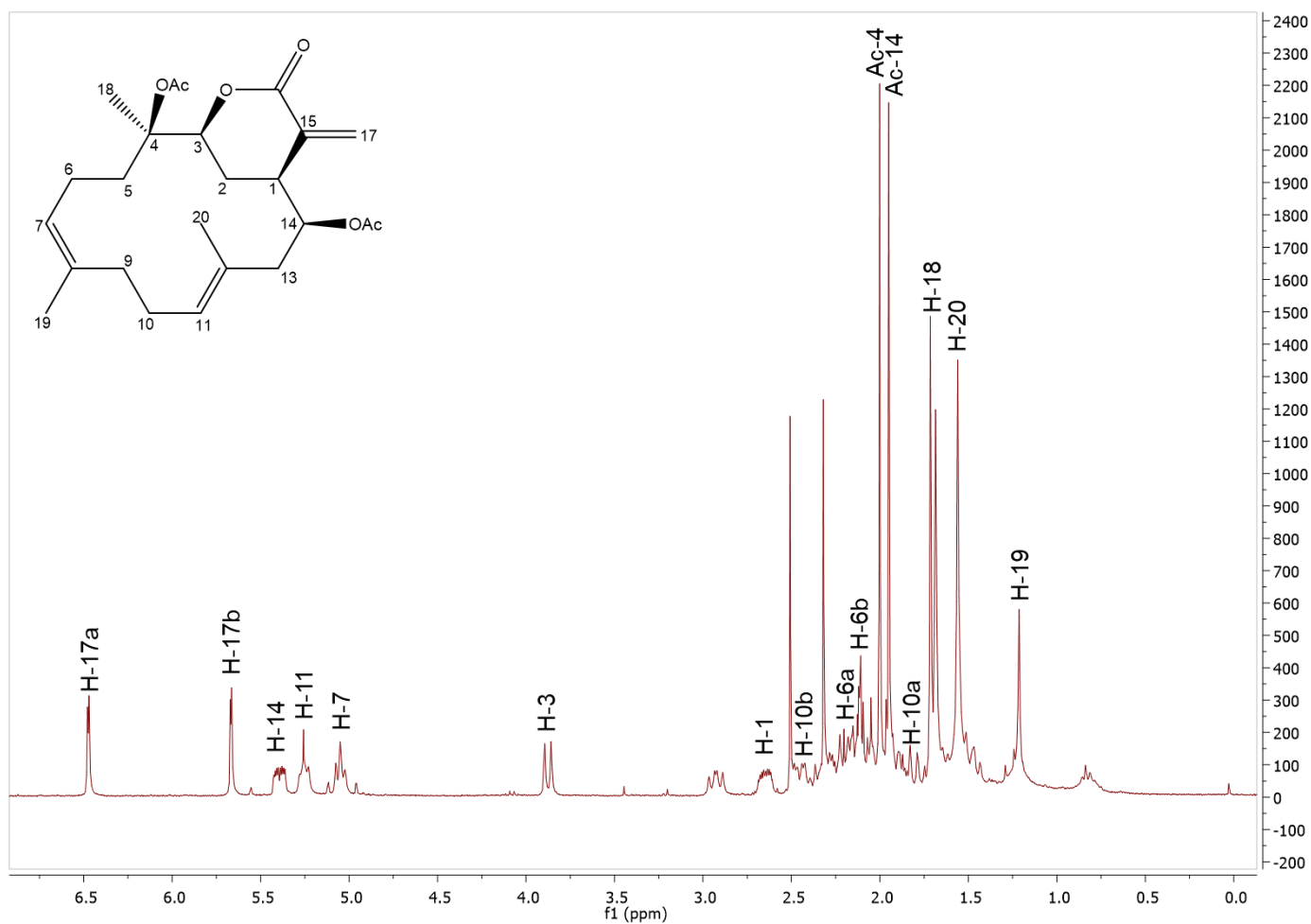
- [204] Q. Wang, R. Edupuganti, C. D. J. Tavares, K. N. Dalby, and P. Ren, "Using docking and alchemical free energy approach to determine the binding mechanism of eEF2K inhibitors and prioritizing the compound synthesis," *Front. Mol. Biosci.*, 2015.
- [205] M. Shaaban, M. Y. Issa, M. A. Ghani, A. Hamed, and A. B. Abdelwahab, "New pyranosyl cembranoid diterpenes from *Sarcophyton trocheliophorum*," *Nat. Prod. Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 24–33, 2019.
- [206] A. E. Prota *et al.*, "Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents," *Science (80-.)*, vol. 339, no. 6119, pp. 587–590, 2013.
- [207] E. Nogales, S. G. Wolf, and K. H. Downing, "Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography," *Nature*, vol. 391, no. 6663, pp. 199–203, Jan. 1998.
- [208] S. Sharma, C. Lagisetti, B. Poliks, R. M. Coates, D. G. I. Kingston, and S. Bane, "Dissecting paclitaxel-microtubule association: Quantitative assessment of the 2'-OH group," *Biochemistry*, vol. 52, no. 13, pp. 2328–2336, 2013.
- [209] R. Matesanz *et al.*, "Modulation of microtubule interprotofilament interactions by modified taxanes," *Biophys. J.*, vol. 101, no. 12, pp. 2970–2980, 2011.
- [210] E. Nogales, M. Whittaker, R. A. Milligan, and K. H. Downing, "High-resolution model of the microtubule," *Cell*, vol. 96, no. 1, pp. 79–88, 1999.
- [211] E. H. Kellogg *et al.*, "Insights into the Distinct Mechanisms of Action of Taxane and Non-Taxane Microtubule Stabilizers from Cryo-EM Structures," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 5, pp. 633–646, 2017.
- [212] A. Dorleans, B. Gigant, R. B. G. Ravelli, P. Mailliet, V. Mikol, and M. Knossow, "Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 33, pp. 13775–13779, 2009.
- [213] P. Barbier *et al.*, "Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 41, pp. 31672–31681, 2010.
- [214] T. L. Nguyen *et al.*, "A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach," *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 19, pp. 6107–6116, 2005.
- [215] M. Dong, F. Liu, H. Zhou, S. Zhai, and B. Yan, "Novel natural product-and privileged scaffold-based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site," *Molecules*, vol. 21, no. 10, 2016.

-
- [216] R. A. Friesner, "Modeling Polarization in Proteins and Protein-ligand Complexes: Methods and Preliminary Results," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 72. pp. 79–104, 2005.
- [217] Y. Zhao, C. Zeng, and M. A. Massiah, "Molecular dynamics simulation reveals insights into the mechanism of unfolding by the A130T/V mutations within the MID1 zinc-binding Bbox1 domain," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, pp. 1–11, 2015.
- [218] E. H. Kellogg *et al.*, "Insights into the Distinct Mechanisms of Action of Taxane and Non-Taxane Microtubule Stabilizers from Cryo-EM Structures," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 5, pp. 633–646, 2017.
- [219] H. Guo, X. Li, Y. Guo, and L. Zhen, "An overview of tubulin modulators deposited in protein data bank," *Med. Chem. Res.*, pp. 927–937, 2019.
- [220] T. L. Riss *et al.*, *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- [221] M. Merck, "ApopNexin™ FITC Apoptosis Detection Kit," vol. 1, no. 800, 2000.
- [222] R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein, and D. E. Phelps, "Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems," *J. Chem. Phys.*, vol. 48, no. 8, pp. 3831–3832, Apr. 1968.
- [223] S. Meiboom and D. Gill, "Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 29, no. 8, pp. 688–691, Aug. 1958.
- [224] L. H. Lucas and C. K. Larive, "Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments," *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 24–41, 2004.
- [225] T. S. Derrick, E. F. McCord, and C. K. Larive, "Analysis of protein/ligand interactions with NMR diffusion measurements: The importance of eliminating the protein background," *J. Magn. Reson.*, vol. 155, no. 2, pp. 217–225, 2002.
- [226] D. E. Shaw Research, "Desmond Molecular Dynamics System." New York, 2018.

Anexo 1: Espectro de RMN-¹H (500 MHz) del compuesto 1. 10% D₂O pH 7.4



Anexo 2: Espectro de RMN-¹H (500 MHz) del compuesto 17. 10% D₂O pH 7.4

Anexo 3: Espectro de RMN-¹H (500 MHz) del compuesto 26. 10% D₂O pH 7.4

Anexo 4: Tabla de determinación del tiempo de relajación T_1 en presencia (int) y ausencia de la tubulina para 1

Freq (ppm)	Intensidad	T_1 (s)	Intensidad (int)	T_1 (s) (int)	Δ	Asignación
6.87	33.8546	1.312	38.4754	0.6006	0.7114	H14
6.37	22.651	0.8446	29.1793	0.5257	0.3189	H2
6.03	47.1693	2.2965	47.8367	0.758	1.5385	H13
2.16	232.527	1.018	80.9114	0.8634	0.1546	Ac4
2.05	255.555	1.097	87.3974	0.9788	0.1182	Ac11
1.95	246.434	1.003	87.2285	0.878	0.125	Ac9
1.37	289.702	0.6261	96.9202	0.6674	-0.0413	H20
1.21	76.5993	0.6215	33.2002	0.6263	-0.0048	H18

Anexo 5: Tabla de determinación del tiempo de relajación T_1 en presencia (int) y ausencia de la tubulina para 17

Freq (ppm)	Intensidad	T_1 (s)	Intensidad (int)	T_1 (s) (int)	Δ	Asignación
2.85296	56.2832	1.116	14.9507	1.901	-0.785	H1
2.58874	18.9003	0.6832	26.2232	24.52		H13a
2.38128	9.7232	5.235	12.7887	1.316	3.919	H10
2.27266	61.0319	13.42	18.5816	1.12	12.3	H9
2.12588	9.6717	3.72	22.1359	0.8854	2.8346	H13b
1.99377	11.6356	2.75	18.7085	1.419	1.331	H6
1.91059	19.8716	0.7078	82.7269	0.7258	-0.018	H22
1.80882	9.273	4.531	24.0946	2.393	2.138	H10
1.65616	100.153	1.217	71.5403	0.6955	0.5215	H18
1.53579	10.6495	3.805	66.3033	0.6761	3.1289	H21
1.2931	163.97	0.8417	61.2212	0.6259	0.2158	H19
6.29169	167.906	0.887	17.9165	0.3014	0.5856	H17a

Anexo 6: Tabla de determinación del tiempo de relajación T_1 en presencia (int) y ausencia de la tubulina para 26

Freq (ppm)	Intensidad	T_1 (s)	Intensidad (int)	T_1 (s) (int)	Δ	Asignación
2.58	72.9928	15.29	28.4079	16.26	-0.97	H13
2.26	31.5957	0.3818	20.237	1.911	-1.5292	H9
2.17	25.7617	1.111	22.8858	0.912	0.199	H2a
1.99	259.086	0.9348	27.1709	1.3	-0.3652	AC-4
1.83	24.4693	0.5561	19.8099	0.8667	-0.3106	H2b
1.61	218.866	0.7669	17.9473	1.445	-0.6781	H22
1.57	24.7236	0.4059	19.0968	1.089	-0.6831	H18
1.53	222.983	0.8101	19.3456	1.004	-0.1939	H21
1.29	214.595	0.5129	20.2776	0.9275	-0.4146	H19

Anexo 7: Tabla de determinación del tiempo de relajación T_2 en presencia (int) y ausencia de la tubulina para 1

Freq (ppm)	Intensidad	T_2 (s)	Intensidad (int)	T_2 (s) (int)	Δ	Asignación
2.16	213.435	2.046	114.586	0.3908	1.6552	Ac4
2.05	233.397	1.406	127.762	0.4359	0.9701	Ac11
1.95	235.479	1.302	127.614	0.3277	0.9743	Ac9
1.37	300.599	0.3406	146.149	0.272	0.0686	H20

Anexo 8: Tabla de determinación del tiempo de relajación T_2 en presencia (int) y ausencia de la tubulina para 17

Freq (ppm)	Intensidad	T_2 (s)	Intensidad (int)	T_2 (s) (int)	Δ	Asignación
1.91059	92.8622	1.307	173.937	0.5919	0.7151	H22
1.65616	76.6352	0.9123	126.476	0.8	0.1123	H18
1.53579	75.1331	0.8368	125.818	0.689	0.1478	H21
1.2931	79.706	0.6402	138.98	0.4355	0.2047	H19

Anexo 9: Tabla de determinación del coeficiente de difusión del ligando 1 en ausencia de la tubulina

Freq (ppm)	D ($\times 10^{-10}$ m ² /s)
6.9003	2.678
6.8984	2.5263
6.8964	2.5093
6.8768	3.2599
6.8768	2.7754
6.872	2.7623
6.048	2.6423
6.046	2.6938
6.0284	2.7596
6.0206	3.2832
5.591	2.7054
5.5734	2.7917
5.5616	2.6901
5.5401	2.7099
5.4638	2.9322
5.451	2.7893
5.4471	3.9581
5.3248	2.951
5.3189	2.8722
5.317	3.0258
5.3072	3.2426
5.1232	2.8097
Difusión	2.8803
Std	0.3221
Difusión	2.8803 \pm 0.3222

Anexo 10: Tabla de determinación del coeficiente de difusión del ligando 1 en presencia de la tubulina

Freq (ppm)	D ($\times 10^{-10}$ m²/s)
2.1621	2.591
2.0701	1.8673
2.0593	2.6259
1.9536	2.6824
1.9409	2.2228
1.3919	1.8884
1.3782	2.5909
1.2011	2.9709
1.1972	2.591
Difusión	2.447
Std	0.374568762
Difusión	2.447 \pm 0.374

Anexo 11: Tabla de determinación del coeficiente de difusión del ligando 17 en ausencia de la tubulina

Freq (ppm)	D ($\times 10^{-10}$ m²/s)
1.9106	3.1295
1.6552	2.8149
1.5358	2.8642
1.2941	2.8884
Difusión	2.9242
Std	0.1402
Difusión	2.9242 \pm 0.1402

Anexo 12: Tabla de determinación del coeficiente de difusión del ligando 17 en presencia de la tubulina

Freq (ppm)	D ($\times 10^{-10}$ m²/s)
1.9155	2.2817
1.9106	2.6201
1.6601	2.3736
1.6562	2.7169
1.6532	2.6831
1.6503	2.6914
1.5407	2.5892
1.5358	2.5606
1.5328	2.743
1.5299	2.5998
1.297	2.2547
1.2941	2.5081
1.2921	2.5936
Difusión	2.5550
Std	0.1595
Difusión	2.5550 \pm 0.1595

Anexo 13: Tabla de determinación del coeficiente de difusión del ligando 26 en ausencia de la tubulina

Freq (ppm)	D ($\times 10^{-10}$ m²/s)
1.91	2.9516
1.83	3.1389
1.8	3.6575
1.78	2.797
1.65	2.952
1.63	3.3675
1.57	3.0734
1.53	2.9154
1.29	3.0358
Difusión	3.098
Std	0.264
Difusión	3.098 \pm 0.264

Anexo 14: Tabla de determinación del coeficiente de difusión del ligando 26 en presencia de la tubulina

Freq (ppm)	D ($\times 10^{-10}$ m²/s)
2.1993	0.6711
2.1895	0.7734
2.1807	0.6631
2.1758	0.713
2.1689	0.7435
2.163	0.7976
2.1552	0.8707
2.1513	0.8313
2.1445	0.8377
2.1386	0.8687
2.1347	0.8379
2.1308	0.8703
2.121	0.9743
2.117	0.9895
2.1092	0.9445
2.0994	1.375
2.0946	1.3682
2.0906	1.3347
2.0515	1.6098
2.0348	1.5249
2.0319	1.3362
2.0251	1.112
2.0192	1.2465
2.0153	1.2585
2.0065	1.2069
1.9938	1.0727
1.9869	1.0623
1.9703	1.178
1.9605	1.1128
1.9546	1.1083

1.9438	1.0845
1.9389	1.2245
1.9262	1.1277
1.9184	1.1239
1.9135	1.2264
1.9067	1.5144
1.8969	1.283
1.8832	1.0482
1.8773	1.0289
1.8714	0.9883
1.8626	1.1106
1.8558	0.9742
1.8479	0.9514
1.844	0.9687
1.8352	0.9719
1.8313	1.1003
1.8254	1.0383
1.8166	1.1867
1.8098	1.9324
1.8	0.9841
1.7951	1.1879
1.7912	1.4843
1.7863	1.3277
1.7657	1.3438
1.5994	1.7887
1.5935	1.8193
1.5916	2.0055
1.5867	1.6665
1.5808	1.7316
1.5739	1.6448
1.5632	1.6543
1.5612	1.7329
1.5485	1.8067
1.5456	1.8438
Difusión	1.2081
std	0.1564
Difusión	1.2087± 0.1564

