



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Farmacología

**Influencia de derivados del 3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol
sobre el equilibrio dinámico de los microtúbulos**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Eric Daniel Salinas Arellano

Para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Farmacología

Director de Tesis: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

México. D.F.

Diciembre 2014

Esta tesis se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas dentro del Programa de Posgrado en Farmacología con una beca de inversión en el conocimiento otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 289212.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

*Mi esposa **Liliana Alcázar** por ser alguien muy especial en mi vida, mi fuente de inspiración y que demuestra su amor en todo momento.*

*Mi madre, **María de la Paz** por todo su amor, apoyo, comprensión, sacrificios y ser mi mejor ejemplo de superación.*

*Mis hermanas, **Brizeida, Diana y Lucero** porque son parte importante en mi vida.*

*Mi asesor de tesis el **Dr. Carlos Cerda**, por darme la oportunidad de trabajar con él, por regalarme de su valioso tiempo y sobre todo por la paciencia que tuvo conmigo para la realización de este proyecto. Gracias por depositarme su confianza y por su amabilidad que siempre lo identifica.*

“Si no conozco una cosa, la investigaré”. Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pedro Joseph-Nathan del departamento de Química del CINVESTAV, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A mis sinodales la Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres y el Dr. Pablo Muriel de la Torre, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y por sus provechosas correcciones hechas a la misma.

A la Q.F.B. Celina Alvarez y la Q.F.B. Yolanda Mora por la obtención de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

A la Q.F.B. Angelina Hernández, la Q.F.B. Verónica Reyes y la MC. Alvina Bucio por brindarme su apoyo en el laboratorio y por compartir sus conocimientos conmigo, muchas gracias.

Al D.C. Ángel Ernesto Bañuelos por su valiosa ayuda y consejos en la realización de esta tesis, muchas gracias por dedicarme tiempo.

A la Q.F.B. Azucena Pérez en la obtención de los espectros de masa.

Al MC. Emmanuel Ríos Castro de Unidad Genómica, Proteómica y Metabólica de LaNSE, CINVESTAV-IPN, por su apoyo en el análisis de las muestras por Espectrometría de Masas.

A mis compañeros de laboratorio, Eugenio, Edna, María Trinidad, Esmeralda, Benjamín Silva, Humberto, Gelacio y Benjamín García. Personas muy especiales que siempre estuvieron dispuestas a brindarme su apoyo.

A mis compañeros de la generación de maestría Isaac, Luis Francisco, Daniel, Erick, Silvia, Carmen y los que me faltan; gracias por compartir muchas historias juntos y por brindarme su amistad.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN DE ESTRUCTURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Uso de productos naturales en la medicina	1
1.2 Cáncer	2
1.3 Cáncer y estrés oxidativo	3
1.4 Blancos terapéuticos para el cáncer	5
1.5 Tubulina y microtúbulos como blancos anticancerígenos	6
1.6 Productos naturales antimitóticos	9
1.6.1 Agentes que se unen al sitio de la vinca	9
1.6.2 Agentes que se unen al sitio de la colchicina	10
1.6.3 Agentes que se unen al sitio del taxol	10
1.7 Eremofilanos con actividad biológica	13
1.7.1 El (5 <i>S</i>)-5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto[2,3- <i>b</i>]furan-9-ol (cacalol)	14
1.8 Metilenciclohexadienonas (MCs)	14
1.8.1 Interacción entre MCs y proteínas	15
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
4.1 General	19
4.2 Específicos	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1 Caracterización del cacalol (16)	20
5.2 Reacción entre el cacalol (16) y el DPPH	22
5.3 Caracterización del acetato de cacalol (20)	24
5.4 Reacción entre el acetato de cacalol (20) y cloranilo	26

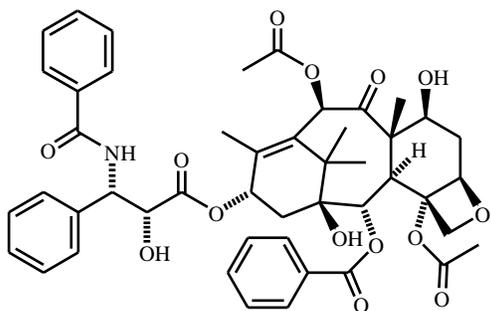
5.4.1 Caracterización del acetato de naftofuranol (23)	26
5.4.2 Caracterización de la metilenciclohexadienona aromática (22)	28
5.5 Reacción del acetato de naftofuranol (23) con K ₂ CO ₃	30
5.6 Evaluación <i>in vitro</i> de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos en presencia de derivados del furanoeremofilano	32
5.7 Determinación de los residuos de tubulina modificados por la metilenciclohexadienona (17) en los microtúbulos	39
6. CONCLUSIONES	42
7. PERSPECTIVAS	43
8. PARTE EXPERIMENTAL (MATERIALES Y MÉTODOS)	44
8.1 Procedimientos generales de purificación de los compuestos	44
8.1.1 Cromatografía en capa fina	44
8.1.2 Cromatografía en columna abierta	44
8.1.3 Determinación de los puntos de fusión	44
8.2 Datos generales de la espectroscopía y espectrometría utilizadas en la determinación estructural de los furanoeremofilanos	44
8.2.1 Rotación específica	44
8.2.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR)	44
8.2.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)	44
8.2.4 Espectrometría de masas (EM)	45
8.3 Datos generales sobre la polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos	45
8.3.1 Mediciones de absorbancia para el ensayo de polimerización-despolimerización de la α,β -tubulina	45
8.4 Datos generales sobre la digestión con tripsina de la tubulina sin modificar y modificada con metilenciclohexadienona (17)	45
8.4.1 Digestión proteica	45
8.4.2 Sedimentación de microtúbulos	45
8.4.3 Purificación de péptidos con ZipTips C18	45
8.4.4 Concentrados de vacío para DNA	45

8.4.5 Espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF	46
8.5 Colecta de <i>Senecio cervarifolium</i>	46
8.6 Espectroscopía y espectrometría del producto natural 16 y sus derivados 17 , 20 , 21-23	46
8.6.1 Obtención del cacalol (16)	46
8.6.2 Obtención de la metilenciclohexadienona (17)	46
8.6.3 Obtención del acetato de cacalol (20)	47
8.6.4 Obtención del acetato de naftofuranol (23)	48
8.6.5 Obtención de la metilenciclohexadienona aromática (22)	48
8.6.6 Obtención del naftofuranol (21)	48
8.7 Evaluación <i>in vitro</i> sobre la polimerización de los heterodímeros α -tubulina- β -tubulina y despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura	49
8.8 Ensayo de la digestión con tripsina a la tubulina sin modificar y modificada con metilenciclohexadienona (17)	50
9. BIBLIOGRAFÍA	52
10. APÉNDICE. Espectros de ^{13}C del producto natural 16 y los derivados 17 , 20 , 21-23 , espectros de masas de la metilenciclohexadienona (17), metilenciclohexadienona aromática (22) y acetato de cacalol aromático (23) y tablas de masas de los residuos de aminoácidos presentes en los péptidos	57

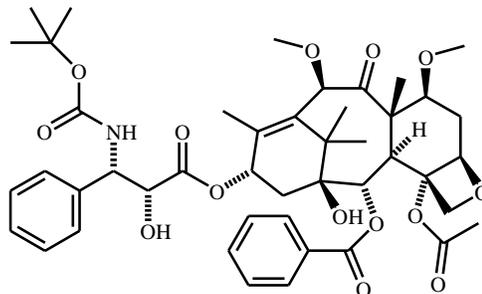
ABREVIATURAS

ERO	Especies reactivas de oxígeno
SOD2	Superóxido dismutasa 2
PI3K/Akt	Fosfoinositol 3-cinasa/proteína cinasa B
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa
FOXOs	Forkhead box O
Akt-SREBP	Proteína cinasa B-regulador de la proteína de unión a elementos de esteroides
MCF-7	Línea celular de adenocarcinoma de mama
FAS	Sintetasa de ácidos grasos
MDA-MB231	Línea celular de cáncer de mama hormono-independiente
A-549	Línea celular de adenocarcinoma alveolar
SMMC-7721	Línea celular de hepatocarcinoma
HeLa	Línea celular de cáncer de cuello uterino
P388D1	Línea celular de macrófagos de ratón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
MCs	Metiléniciclohexadienonas
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz- Time-of-Flight

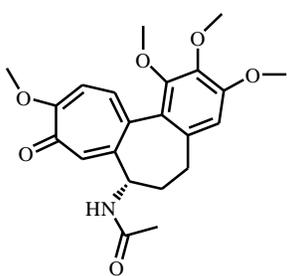
RESUMEN DE ESTRUCTURAS



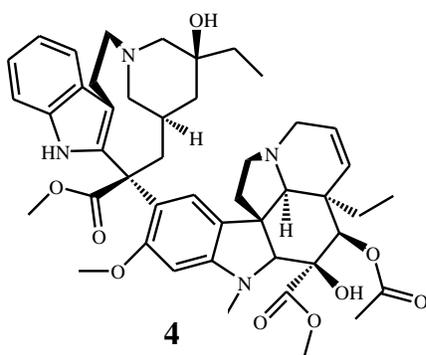
1



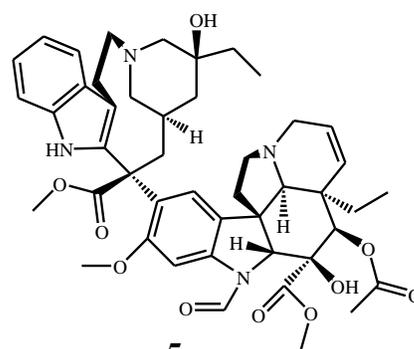
2



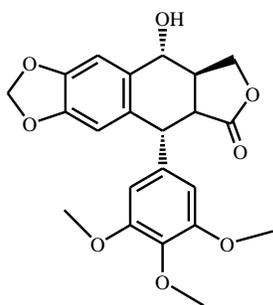
3



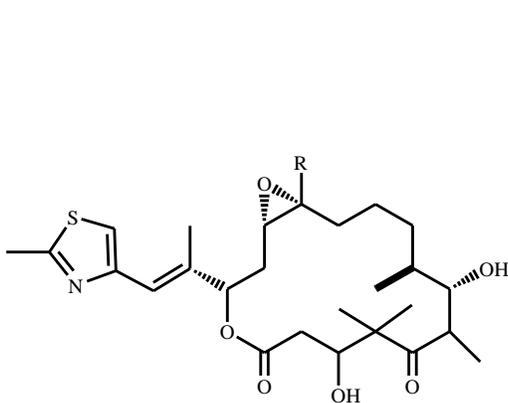
4



5



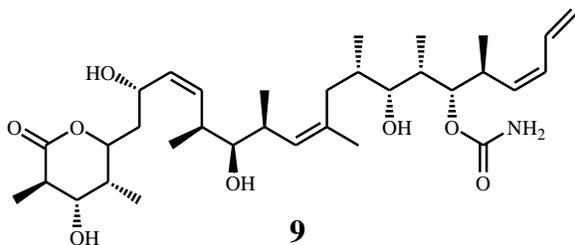
6



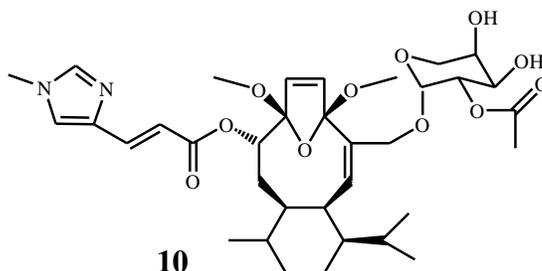
7

8a: R = H

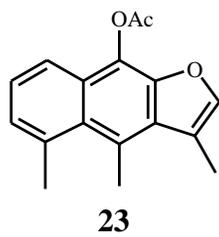
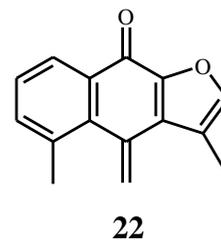
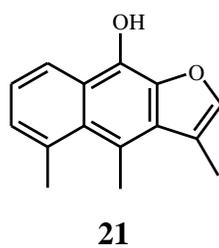
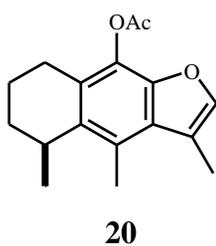
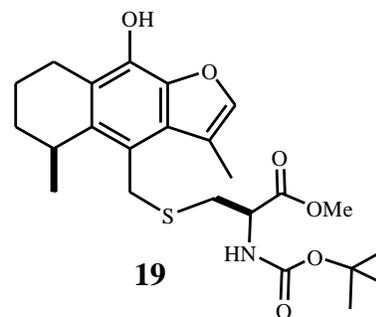
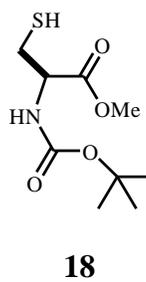
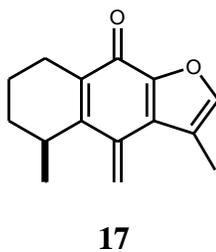
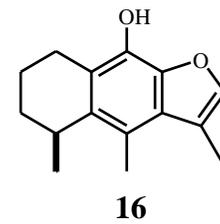
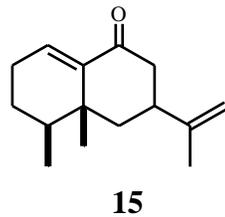
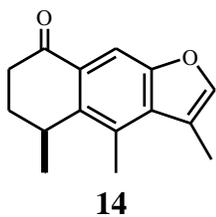
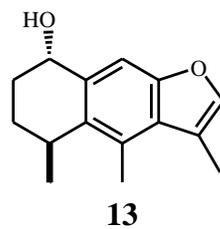
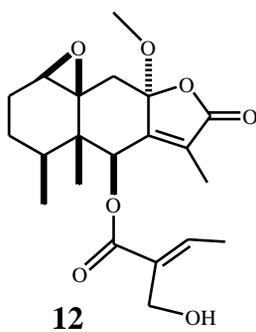
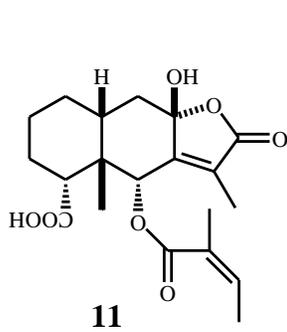
8b: R = Me



9



10



RESUMEN

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer. Los productos naturales que tienen como blanco terapéutico a los microtúbulos se dividen en dos categorías: (1) agentes que inhiben la polimerización de microtúbulos, que incluyen colchicina (**3**) aislada de la planta *Colchicum autumnale*, la vinblastina (**4**) y vincristina (**5**) aisladas de la planta *Catharanthus roseus*, la podofilotoxina (**6**), aislada de la hierba mandrágora *Podophyllum peltatum* y la combretastatina (**7**) aislada del árbol *Combretum caffrum* y (2) agentes estabilizadores de microtúbulos como, el cabazitaxel (**2**) y el paclitaxel (**1**), éste último aislado de la corteza de árbol *Taxus brevifolia*. Las epotilonas A y B (**8a** y **8b**) aisladas de la mixobacteria *Sorangium cellulosum*, la discodermolida (**9**) aislada de la esponja marina *Discodermia dissoluta* y la eleutherobina (**10**) aislada de un coral blando marino *Eleutherobia sp.* Todos estos agentes bloquean la mitosis e inducen la muerte celular por apoptosis.

Los eremofilanos (**11-15**) poseen una actividad citotóxica importante en líneas celulares de tumores humanos (MCF-7, HL-60, SMMC-7721, HeLa, A-549) y en células de linfoblastos P388D1 de ratón. El (5*S*)-5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol (**16**) conocido como cacalol, es un furanoeremofilano que se aísla de plantas de los géneros *Cacalia*, *Psacallium* y *Senecio*, el cual posee un fuerte efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama. En un trabajo reciente se encontró que el cacalol (**16**) se transforma en la metilenciclohexadienona (**17**) mediante un tratamiento con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Debido a que el derivado **17** es una especie altamente electrofílica, resultó ser muy reactiva frente al derivado de la L-cisteína **18** generando el compuesto **19**, lo cual sugiere que el compuesto **17** puede comportarse como un agente alquilante de proteínas.

Debido a la importancia biológica del cacalol (**16**) como agente antioxidante y su efecto antiproliferativo en células de cáncer, en este trabajo se realizó un estudio de la influencia de este compuesto en el equilibrio dinámico de los microtúbulos, así como la de varios derivados con diferentes estados de oxidación y con el grupo hidroxilo libre o protegido. Esta serie incluye el cacalol (**16**), la metilenciclohexadienona (**17**), el acetato (**20**), el naftofuranol (**21**) y la metilenciclohexadienona aromática (**22**) y el acetato del naftofuranol (**23**).

Con base en lo anterior, resultó interesante además determinar si la metilenciclohexadienona **17**, que se genera bajo condiciones oxidantes a partir del cacalol (**16**), se une de manera covalente a la tubulina. Los estudios preliminares de digestión de tubulina indicaron que la metilenciclohexadienona (**17**) se une covalentemente al grupo OH libre de un residuo de serina o al grupo NH₂ de un residuo de lisina del fragmento 230-243 de la α -tubulina.

Por lo anterior, se puede proponer un posible mecanismo de acción del compuesto **16** en el que el estrés oxidativo presente en las células de cáncer genera la metilenciclohexadienona (**17**), la cual se une covalentemente a un residuo de serina o lisina del fragmento 230-243 de la α -tubulina modificando la inestabilidad dinámica de los microtúbulos e induciendo la apoptosis de este tipo de células.

ABSTRACT

Drug discovery from medicinal plants has played an important role in cancer treatment. Natural products that have microtubules as therapeutic targets are divided into two categories: (a) agents which inhibit microtubule polymerization, these include colchicine (**3**) isolated from *Colchicum autumnale*, vinblastine (**4**) and vincristine (**5**) isolated from *Catharanthus roseus*, podophyllotoxin (**6**) isolated from *Podophyllum peltatum*, and combretastatin (**7**) isolated from the tree *Combretum caffrum*; and (b) microtubule stabilizing agents such as cabazitaxel (**2**) and paclitaxel (**1**), the latter isolated from the bark of *Taxus brevifolia*, epothilones A and B (**8a** and **8b**) isolated from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*, discodermolide (**9**) isolated from the marine sponge *Discodermia dissoluta* and eleutherobina (**10**) isolated from the marine soft coral *Eleutherobia sp.* These agents block mitosis and induce cell death by apoptosis.

Eremophilanes (**11-15**) possess significant cytotoxic activity in human tumor cell lines (MCF-7, HL-60, SMMC-7721, HeLa, A-549) and in mouse lymphoblast cells (P388D1). (5*S*)-5,6,7,8-tetrahydro-3,4,5-trimethylnafto[2,3-*b*]furan-9-ol (**16**), known as cacalol, is a furanoeremophylane derivative isolated from plants of the genera *Cacalia*, *Psacallium* and *Senecio*. This compound has shown a strong antiproliferative effect on breast cancer cells. In a recent study, it was found that cacalol (**16**) is converted into methylenecyclohexadienone

(**17**) by treatment with the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Because derivative **17** is a highly electrophilic species, it was found to be very reactive towards the L-cysteine derivative **18**, generating compound **19** and suggesting that **17** could act as a protein alkylating agent.

Because of the biological importance of cacalol (**16**) as an antioxidant and its antiproliferative effect on cancer cells, in this paper a study of the influence of this compound in the dynamic equilibrium of microtubules was performed. Also, several derivatives with different oxidation states and free or protected hydroxyl groups were explored. The series included cacalol (**16**), methylenecyclohexadienone (**17**), acetate (**20**), naphofuranol (**21**), aromatic methylenecyclohexadienone (**22**) and naphofuranol acetate (**23**).

Based on the above, it was interesting to further determine whether the methylenecyclohexadienone **17**, which is generated under oxidative conditions from cacalol (**16**), covalently binds to tubulin. Preliminary studies including tubulin digestion indicated that methylenecyclohexadienone (**17**) covalently links to the free hydroxyl group of a serine or to the amino group of a lysine within the 230-243 fragment of α -tubulin.

Therefore, the possible mechanism of action of **16** involves generation of methylenecyclohexadienone (**17**) under the increased oxidative stress present in cancer cells and subsequent covalent binding of **17** to α -tubulin at fragment 230-243, thus altering the dynamic instability of microtubules and inducing apoptosis of these cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Uso de productos naturales en la medicina

A través de la historia, la naturaleza, especialmente las plantas, han proporcionado una fuente de medicamentos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. A partir de principios de 1800, los avances en los conocimientos científicos llevaron al descubrimiento de compuestos bioactivos puros, conocidos comúnmente como productos naturales. Este fue el comienzo de una nueva era en la medicina, donde estos compuestos podrían ser purificados a partir de plantas y administrarse en dosis precisas, independientemente de la fuente o la edad del material vegetal¹.

Los productos naturales generalmente corresponden a metabolitos secundarios que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, cumpliendo algunas funciones como defensa, reproducción o comunicación, asegurando así su supervivencia².

Actualmente cientos de compuestos aislados de plantas son utilizados en la medicina; por lo cual se sigue explorando el aislamiento y caracterización de compuestos farmacológicamente activos de plantas medicinales. Recientemente, las técnicas de descubrimiento de estos compuestos se han aplicado para la estandarización de las hierbas medicinales³.

El éxito de los productos naturales radica en que son compuestos que ya han sido validados por la evolución, han sido biosintetizados, degradados y transformados por sistemas enzimáticos. Por lo tanto, a la hora de interactuar con las moléculas dianas se comportan de una manera privilegiada. De esta forma los productos sintéticos sólo tendrán éxito cuando imiten a los productos naturales⁴.

Por otro lado, el aislamiento y conocimiento estructural de los compuestos de plantas, podría dar lugar a diseñar reacciones para producir derivados semisintéticos; por ejemplo, el uso de la diosgenina como material inicial para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroidales usadas comúnmente en la medicina, o dar pautas para la síntesis de compuestos similares como en el caso de la cocaína, que sirvió como compuesto modelo para la producción de procaína y otros anestésicos locales³.

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer, tales como la vinblastina (4) y vincristina (5), el etopósido, el paclitaxel (1), el docetaxel, el topotecán y el irinotecán que actualmente se encuentran entre los quimioterapéuticos más efectivos. Sin embargo, estos compuestos sufren de baja solubilidad en medios acuosos y de efectos secundarios tóxicos significativos. Por lo tanto, sigue existiendo una investigación considerable para disminuir éstos dos factores, por lo que numerosos análogos y profármacos de estos agentes han sido sintetizados para aumentar la solubilidad acuosa y la orientación a tumores específicos. Por ejemplo el paclitaxel (1), un diterpeno tetracíclo obtenido de la corteza de árbol *Taxus brevifolia*, demostró ser un eficaz antitumoral contra el cáncer de pulmón, ovario, mama y formas avanzadas de Sarcoma Kaposi. Se han realizado modificaciones químicas al paclitaxel y se han obtenido derivados potentes como es el caso del cabazitaxel (2), el cual tiene mayor solubilidad y posee una actividad biológica relevante contra el cáncer de próstata^{1,5}.

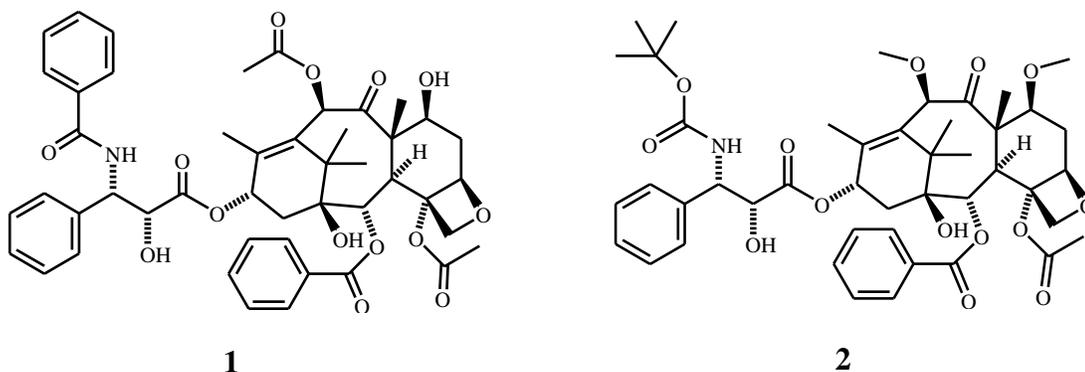


Figura 1. Estructuras del paclitaxel (1) y cabazitaxel (2).

1.2 Cáncer

El cáncer es actualmente una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad humana. Se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012⁶. Es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales y que invaden partes adyacentes del cuerpo u otros órganos, proceso conocido como metástasis⁷. El avance de la enfermedad, está determinado por la acumulación de una

serie de errores genéticos como son: protooncogenes, supresores de tumores y reparadores de ADN.

El cáncer comprende seis capacidades biológicas, las cuales constituyen un principio de organización de las complejidades de esta enfermedad neoplásica. Las células tumorales presentan una señalización proliferativa, evitan los supresores del crecimiento, presentan una resistencia a la muerte celular lo que permite la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de invasión y metástasis (Figura 2)⁸.

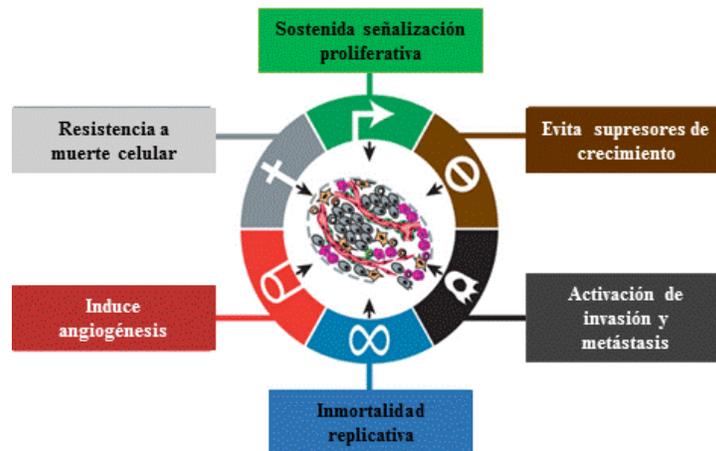


Figura 2. Características de células tumorales durante el desarrollo cancerígeno. Modificado de (Hanahan y Weinberg, 2011).

El enorme interés en el conocimiento de esta enfermedad, desde enfoques muy diferentes, se ha traducido en un extenso y exhaustivo estudio biológico y farmacológico destinado a desarrollar nuevos fármacos que, de forma selectiva, eliminen las células enfermas.

1.3 Cáncer y estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y sus mecanismos de protección (antioxidantes). La perturbación en el equilibrio redox puede conducir a daños importantes en los componentes de la célula, como en los lípidos, las proteínas y el ADN. Se cree que los efectos de ERO contribuyen en el proceso de envejecimiento, pero también podrían desempeñar un papel en la génesis del cáncer⁹.

Las especies reactivas de oxígeno incluyen al anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^\bullet), entre otros; los cuales se producen en la mayoría de las células como subproductos del metabolismo aeróbico; de igual manera, son generados por fuentes exógenas como el humo, el tabaco, los xenobióticos o la radiación, que pueden afectar el estado oxidativo de la célula. En condiciones normales, los sistemas de eliminación de ERO-enzimática y no enzimática; que incluyen, catalasa, SOD2, glutatión peroxidasa, peroxirredoxinas, glutarredoxina, y tiorredoxina, regulan los niveles celulares de ERO y muchas de las vías de transducción de señales que son esenciales para diversos procesos biológicos, como la proliferación y la diferenciación celular¹⁰.

Bajo un estrés sostenido, hay una gran producción de ERO que conduce a un daño significativo en la estructura y funciones de las células e induce mutaciones somáticas y transformaciones neoplásicas. A través de la aceleración de las vías de señalización protumorigénicas, por ejemplo, con el aumento de ERO, se inactiva a un supresor de tumores como PTEN oxidando sus enlaces disulfuro y aumentando la vía de señalización PI3K/Akt. Por último también se inhiben los factores de transcripción FOXOs, los cuales regulan la expresión de antioxidantes, tales como SOD2, catalasa y sestrin3 (Figura 3).

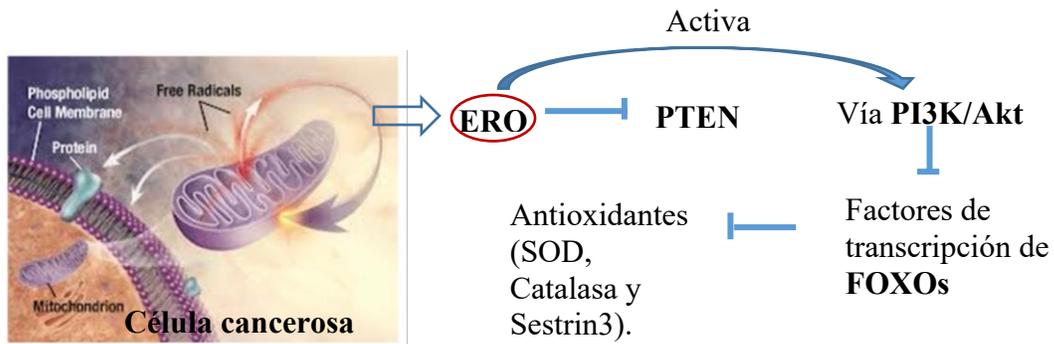


Figura 3. Las células cancerosas poseen un alto nivel de ERO, debido a su metabolismo acelerado e inhiben la expresión de antioxidantes. Modificado de (Nogueira y Nissim, 2013).

Una característica significativa de las células cancerosas en comparación con las células normales es su alto nivel de ERO debido a su metabolismo acelerado que inactiva los mecanismos antioxidantes⁹.

El alto contenido de ERO en las células de cáncer, podría ser explotado para una terapia más selectiva contra este padecimiento.

1.4 Blancos terapéuticos para el cáncer

Durante décadas, la característica principal de los tratamientos médicos para el cáncer ha sido la quimioterapia citotóxica. La vía común para que los agentes quimioterapéuticos puedan ejercer su efecto citotóxico en la célula es la inducción de apoptosis como respuesta a la aparición de daños irreparables. Este efecto se puede lograr actuando a diferentes niveles, modificando el DNA o el RNA como es el caso de los agentes alquilantes; los antimetabolitos que bloquean la formación y uso de ácidos nucleicos esenciales para replicación de DNA, los inhibidores de la topoisomerasa que previene el desenrollamiento del DNA y, por último, los taxanos y alcaloides de la vinca que interfieren en la función de los microtúbulos bloqueando la mitosis celular. Estos medicamentos se dirigen a las células que se dividen rápidamente, incluyendo las células de cáncer y algunas células normales. Como resultado, muchos pacientes experimentan efectos secundarios como alopecia, algunos síntomas gastrointestinales y mielosupresión (Figura 4a).

Actualmente existen terapias dirigidas como son anticuerpos monoclonales y uso de inhibidores como moléculas pequeñas. Los anticuerpos monoclonales ejercen sus efectos contra el cáncer a través de una variedad de mecanismos: mediante el reclutamiento de funciones inmunes del huésped para atacar a la célula cancerosa; mediante la unión a ligandos receptores, interrumpiendo así los procesos esenciales de células del cáncer; o llevando una carga letal, como una toxina, a la célula diana. En el caso de las moléculas pequeñas éstas inhiben los procesos celulares al interferir con la señalización intracelular de tirosinas cinasas (Figura 4b)¹¹.

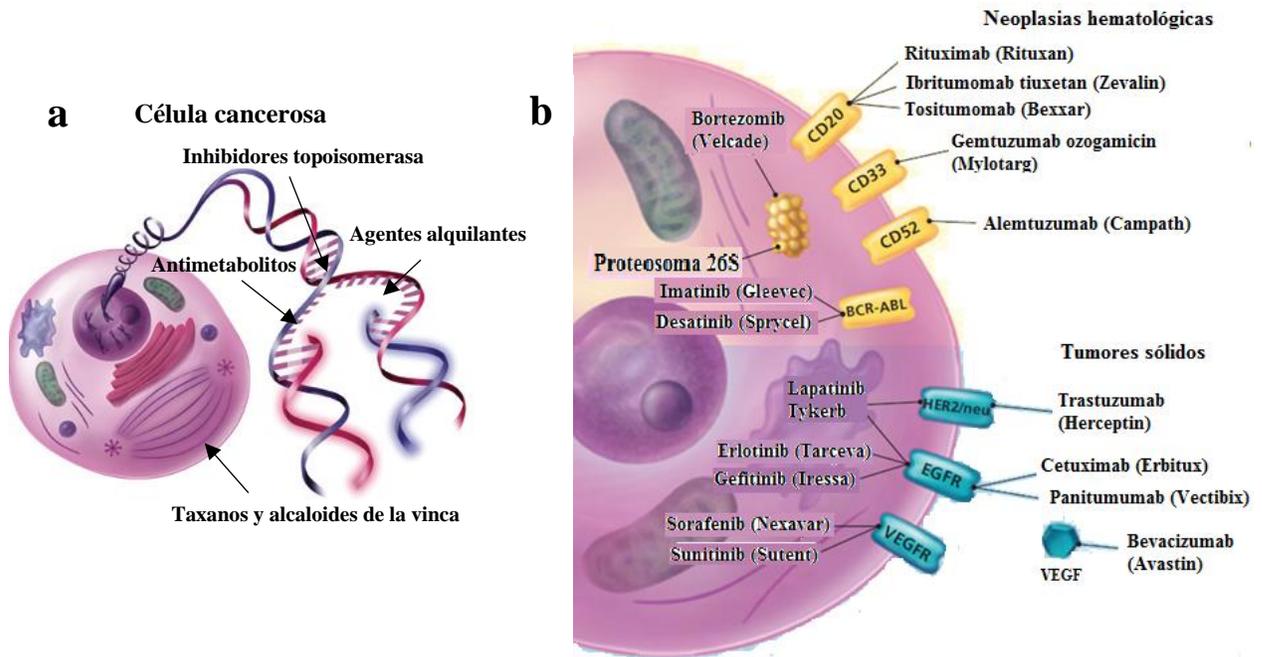


Figura 4. (a) Mecanismo tradicional de la quimioterapia. Estos fármacos actúan en células que se dividen rápidamente incluyendo células normales y células cancerosas. (b) En el mecanismo de terapias dirigidas, los anticuerpos monoclonales se unen a antígenos específicos expresados por células cancerosas. Modificado de (Gerber, 2008).

El uso de terapias dirigidas presenta sus limitaciones ya que las células cancerosas pueden hacerse resistentes a dichas terapias. Sólo algunos tipos de cáncer pueden eliminarse con el uso de estos tratamientos y por último los grandes costos que ocasionan mantienen firme el uso de la quimioterapia tradicional.

1.5 Tubulina y microtúbulos como blancos anticancerígenos

Los microtúbulos desempeñan varios procesos esenciales en todas las células eucariotas, tales como, el crecimiento y la división celular, el tráfico intracelular, soporte, secreción y la capacidad de adaptarse para interactuar con el medio ambiente¹².

Los microtúbulos están compuestos por los heterodímeros α -tubulina- β -tubulina, cada monómero se compone aproximadamente de 450 aminoácidos y comparten el 40% de su secuencia. Las estructuras α -tubulina- β -tubulina son básicamente idénticos, cada monómero está formado por un núcleo de dos láminas β de 6 y 4 cadenas, respectivamente rodeadas por 12 α -hélices. La estructura de cada monómero es muy compacta, pero puede dividirse en tres dominios funcionales: el dominio N-terminal que incluye los primeros 205 aminoácidos y

que contiene la región de unión de nucleótidos, un dominio intermedio, que comprende los residuos 206-381, compuesto de una lámina β rodeada por 5 α -hélices y el dominio C-terminal formado por dos largas hélices α , que se superponen sobre los dominios amino-terminal e intermedio. El dominio C-terminal parece estar implicado en la unión a proteínas motoras (Figura 5a)¹³.

Los dímeros de tubulina interaccionan para formar protofilamentos rectos que posteriormente se asocian de forma paralela, estableciendo contactos laterales entre ellos, para formar la pared cilíndrica del microtúbulo. El número de protofilamentos que constituyen el microtúbulo puede variar *in vitro* desde 9 hasta 16. En cada microtúbulo, existe un “extremo +” (compuesto por β -tubulina) y un “extremo -” (compuesto por α -tubulina). Las propiedades de ambos extremos son diferentes entre sí, siendo ésta una característica de vital importancia para la función de estos polímeros (Figura 5b).

Algunas funciones de los microtúbulos se logran a través de la unión de varias proteínas reguladoras como las MAPs a la tubulina soluble, en los extremos y superficies de los microtúbulos¹⁴. Por ejemplo, la movilidad de los organelos en la célula se lleva a cabo por las proteínas motoras cinesina y dineína, ésta última auxiliada por la dinactina (complejo activador de la dineína), que se mueven hacia el extremo positivo o negativo del microtúbulo, respectivamente (Figura 5c)¹⁵.

Las funciones biológicas de los microtúbulos en todas las células están reguladas en gran parte por su inestabilidad dinámica. La polimerización de los microtúbulos ocurre por el mecanismo reversible de nucleación-elongación y la adición no covalente de los heterodímeros α -tubulina- β -tubulina en ambos extremos de los microtúbulos. La inestabilidad dinámica de los microtúbulos necesita un aporte de energía para equilibrar el balance químico entre la polimerización y la despolimerización. Dicha energía proviene de la hidrólisis de GTP, el cual se une a la subunidad β -tubulina de la molécula de tubulina heterodimérica y, cuando la molécula de tubulina se incorpora al extremo de un microtúbulo, el GTP es hidrolizado a GDP. La subunidad α -tubulina también transporta GTP, pero no puede ser intercambiado por GTP libre y no se hidroliza, por lo cual puede considerarse como una parte fija de la estructura proteica de la tubulina. La inestabilidad dinámica se puede caracterizar por cuatro variables principales: la tasa de crecimiento de los microtúbulos

(elongación), tasa de acortamiento, estado pausado de acortamiento (catástrofe) y frecuencia de transición desde acortamiento a crecimiento (rescate)¹² (Figura 5d)¹⁶. El segundo comportamiento dinámico es llamado “treadmilling”, el cual es el crecimiento neto en uno de los extremos de los microtúbulos y balanceado con el acortamiento neto en el extremo opuesto, que es de gran importancia en la mitosis¹².

Por otra parte, durante la división celular, los microtúbulos forman el huso mitótico, que es un mecanismo clave que impulsa la alineación de los cromosomas replicados al plano ecuatorial y media la segregación de cromosomas a las dos células hijas¹⁷. El papel fundamental que juegan los microtúbulos en la división celular los hace un objetivo muy adecuado para el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos contra las células cancerosas que se dividen rápidamente.

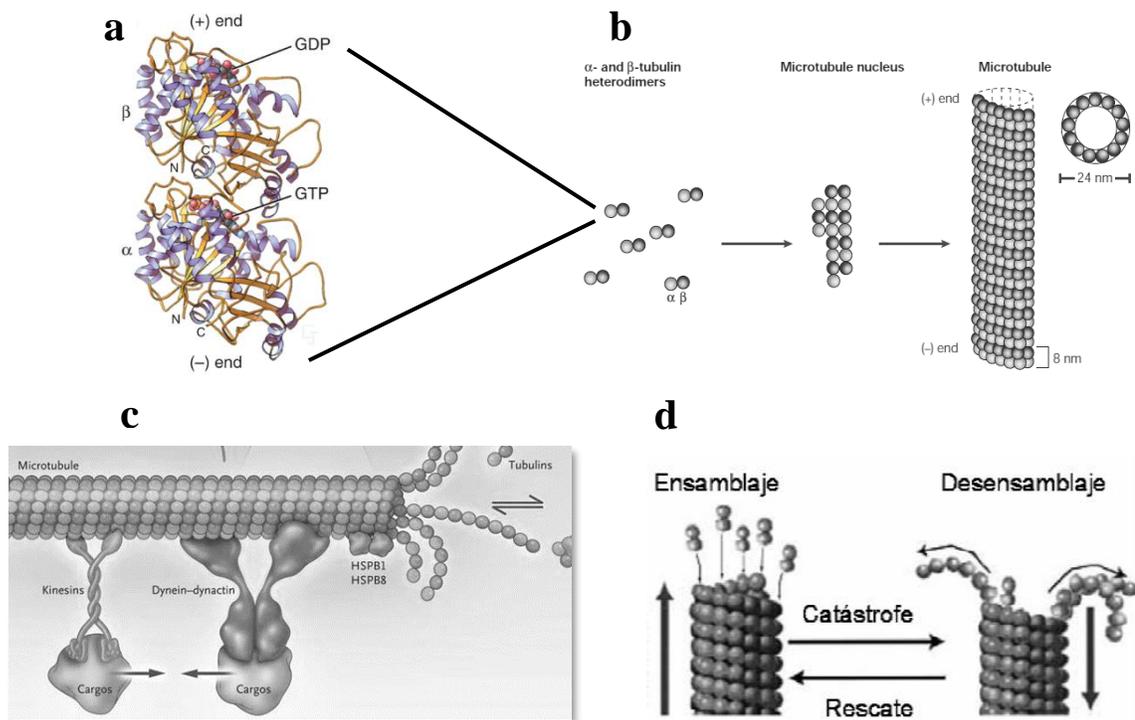


Figura 5. (a) Estructura del heterodímero α -tubulina- β -tubulina obtenida de datos cristalográficos. Modificado de (Nogales y col., 1998). (b) Esquema de la estructura de microtúbulos formados por heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina. Tomado de (Jordan y Wilson, 2004). (c) Las proteínas motoras (cinesina y dineína) utilizan como pistas a los microtúbulos para el tráfico intracelular. Modificado de (Holzbaur y Scherer, 2011). (d) Esquema de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Modificado de (Valiron y col., 2001).

1.6 Productos naturales antimitóticos

Los agentes antimitóticos ejercen sus efectos inhibidores sobre la proliferación celular principalmente mediante el bloqueo de la mitosis desencadenando la muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, los parámetros sobre la estabilidad de los microtúbulos y la inhibición de polimerización del heterodímero α -tubulina- β -tubulina difieren entre sí¹².

Los productos naturales que tienen como blanco terapéutico a los microtúbulos se dividen en dos categorías: agentes que inhiben la polimerización de microtúbulos, éstos incluyen a la colchicina (**3**) aislada de la planta *Colchicum autumnale*, la vinblastina (**4**)-y la vincristina (**5**) aisladas de la planta *Catharanthus roseus*, así como agentes estabilizadores de microtúbulos como paclitaxel (**1**) aislado de la corteza de árbol *Taxus brevifolia*^{17, 18}.

1.6.1 Agentes que se unen al sitio de la vinca

Los alcaloides de la vinca, vinblastina (**4**) y vincristina (**5**) se unen a la tubulina y a los microtúbulos, sus acciones son altamente dependientes de la concentración, provocan la despolimerización de microtúbulos, inhiben la formación del huso mitótico y detienen a las células en la mitosis (Figura 6). En contraste, en bajas concentraciones, los alcaloides de la vinca inhiben la dinámica sin despolimerización de los microtúbulos, pero siguen siendo capaces de detener la mitosis e inducir apoptosis. El dominio de la vinca se encuentra adyacente al sitio de unión de GTP-intercambiable en β -tubulina en el extremo positivo de los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca han sido utilizados clínicamente para el tratamiento de leucemias, linfomas y algunos tumores sólidos malignos (Figura 9)^{12, 17}.

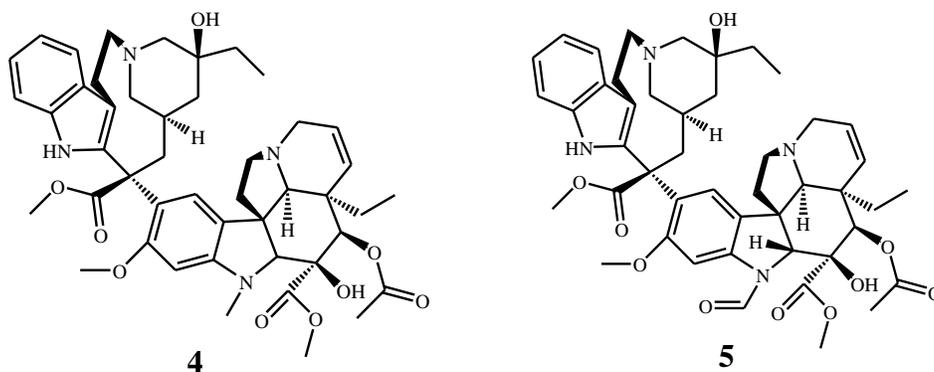


Figura 6. Alcaloides de la vinca. Vinblastina (**4**) y vincristina (**5**) aislados de la planta *Catharanthus roseus*.

1.6.2 Agentes que se unen al sitio de la colchicina

Los fármacos que normalmente se unen al sitio de la colchicina inducen la despolimerización de los microtúbulos a concentraciones elevadas y estabilizan la dinámica de los microtúbulos a bajas concentraciones. La colchicina (**3**) interacciona en el dominio intermedio de la subunidad β -tubulina y la subunidad α del mismo dímero, lo que produce una estabilización del dímero de tubulina en una conformación que no permite el establecimiento de los contactos laterales necesarios para formar el microtúbulo (Figura 9).

Varios productos naturales se unen al sitio de la colchicina e interrumpen el ensamblaje de los microtúbulos; tales como la podofilotoxina (**6**), aislada de la hierba mandrágora *Podophyllum peltatum* y la combretastatina (**7**) aislado del árbol *Combretum caffrum* (Figura 7).

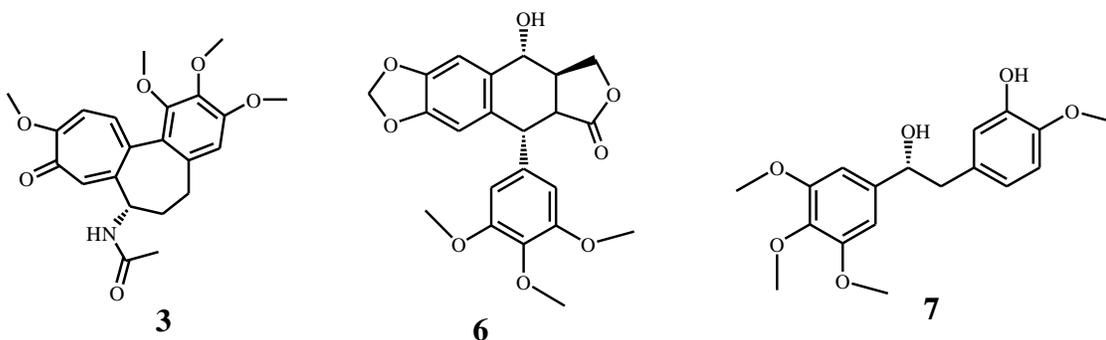


Figura 7. Estructuras de la colchicina (**3**), podofilotoxina (**6**) y combretastatina (**7**), que interrumpen el ensamblaje de los microtúbulos.

El desarrollo clínico de la colchicina para el tratamiento del cáncer no ha tenido éxito hasta la fecha, debido a la alta toxicidad para las células normales. Sin embargo, la combretastatina (**7**) exhibe una potente actividad en combinación con carboplatino para cáncer de tiroides^{12, 17}.

1.6.3 Agentes que se unen al sitio del taxol

En altas concentraciones, los taxanos promueven la polimerización de los microtúbulos y los estabilizan. En concentraciones bajas, los taxanos inhiben la dinámica de los microtúbulos, provocando muerte celular por apoptosis. El paclitaxel (**1**) se une a la subunidad β -tubulina y promueve la estabilización de los microtúbulos al inducir cambios conformacionales en el

lazo-M de la β -tubulina, que dan como resultado interacciones laterales adyacentes más estables entre protofilamentos (Figura 9). El paclitaxel (**1**) es uno de los medicamentos más importantes para el tratamiento del cáncer de mama, de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas y el sarcoma de Kaposi.

Algunos productos naturales compiten con el paclitaxel (**1**) y se unen cerca o en el sitio del taxol tales como las epotilonas A y B (**8a** y **8b**) aisladas de la mixobacteria *Sorangium cellulosum*, la discodermolida (**9**) aislada de la esponja marina *Discodermia dissoluta* y la eleutherobina (**10**) aislada de un coral blando marino *Eleutherobia sp.* Estos agentes bloquean la mitosis e inducen la muerte celular por apoptosis (Figura 8)^{12, 17}.

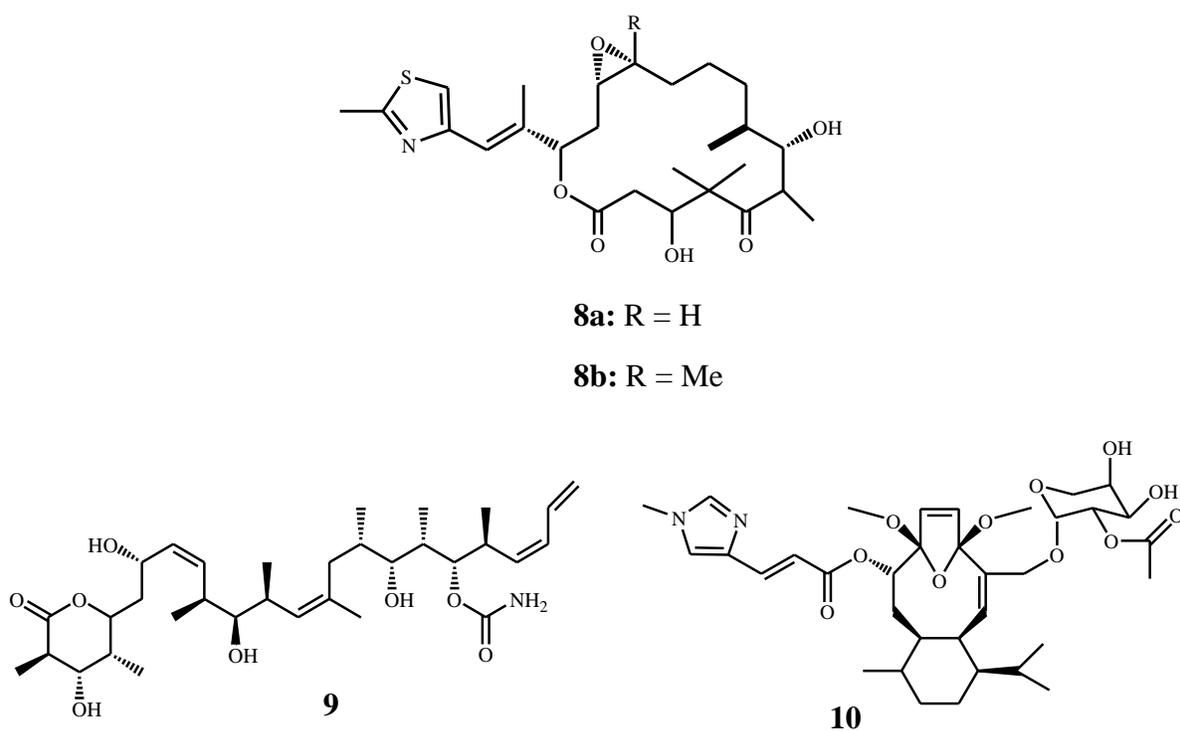


Figura 8. Estructuras de las epotilonas A y B (**8**), discodermolida (**9**) y eleutherobina (**10**), productos naturales que se unen cerca o en el sitio del taxol.

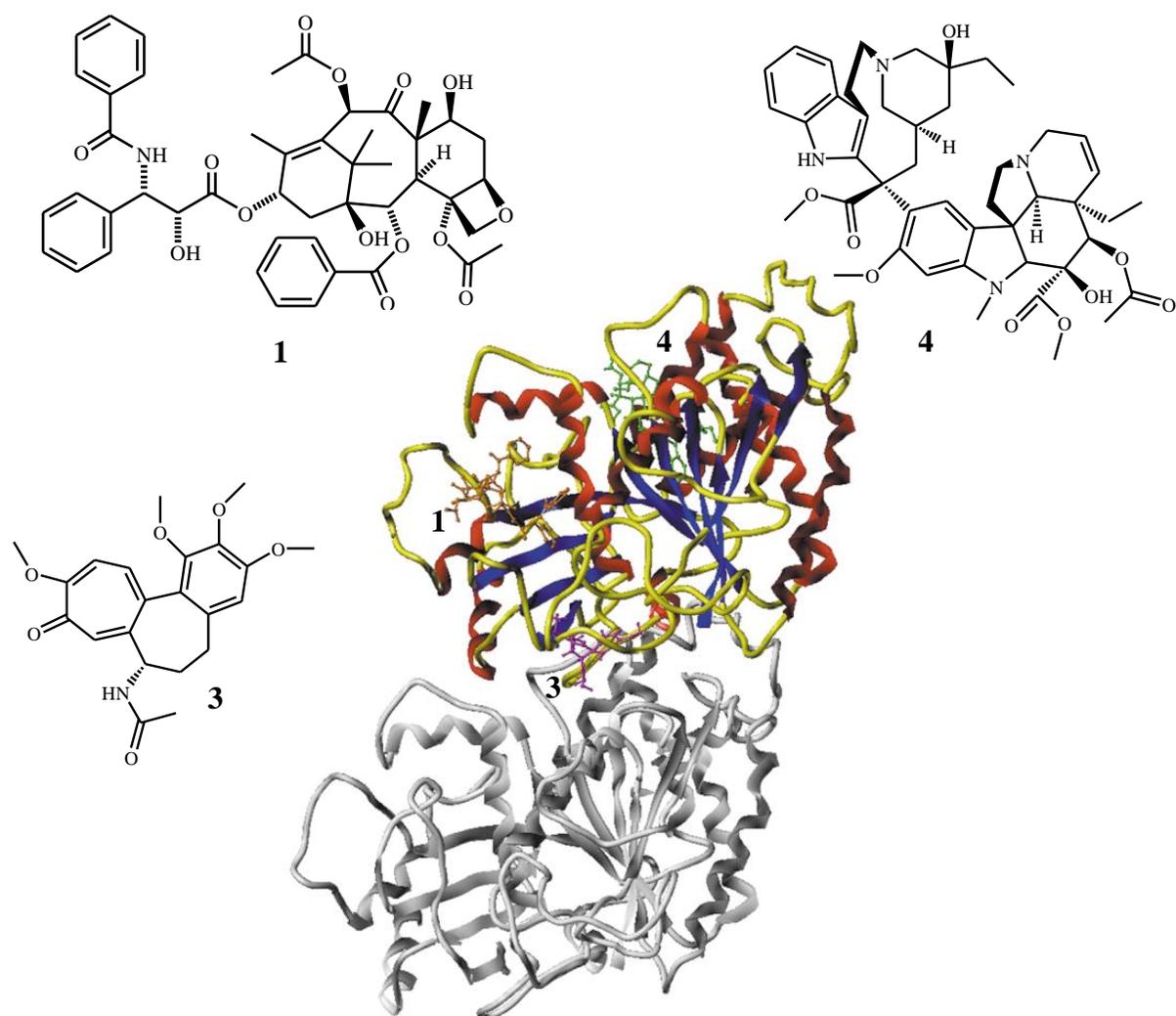


Figura 9. Esquema que indica que el paclitaxel (1), colchicina (3) y vinblastina (4) se unen a la β -tubulina pero en diferentes ubicaciones. Modificado de (Checchil y col., 2003)¹⁹.

1.7 Eremofilanos con actividad biológica

Una búsqueda bibliográfica acerca de la actividad biológica de los eremofilanos indicó que varios de estos compuestos poseen actividad citotóxica importante. Así se encontró al eremofilano **11** el cual se obtiene del extracto etanólico *Ligularia przewalskii* y posee una IC_{50} de 25.9 μM en la línea celular de tumor humano MCF-7²⁰.

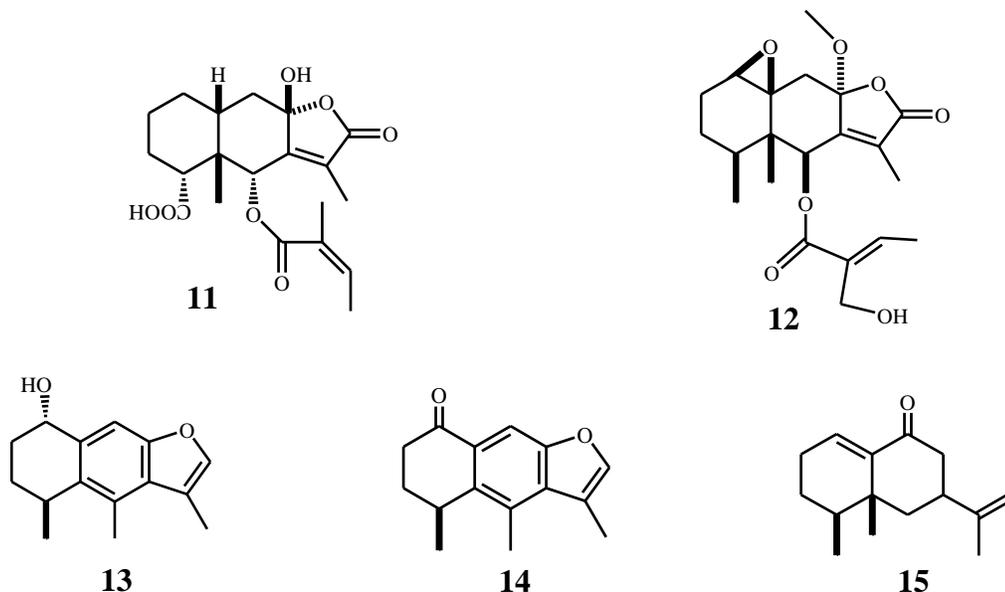


Figura 10. Comparación de las estructuras de los eremofilanos de *Ligularia przewalskii* (**11**), *Ligularia sagitta* (**12**), *Ligularia macrophylla* (**13-14**) y *Eremophila mitchelli* (**15**).

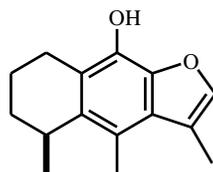
También del género *Ligularia* pero de la planta *Ligularia sagitta*, se obtuvo al eremofilano **12** que mostró actividad contra líneas celulares tumorales humanas, HL-60 (leucemia aguda), SMMC-7721 (cáncer hepático) y HeLa (cáncer cervical) con una $IC_{50} \approx 13 \mu M$ ²¹.

Del extracto etanólico de raíz de *Ligularia macrophylla*, se aislaron los compuestos **13** y **14** y se evaluó su actividad citotóxica *in vitro* contra líneas celulares del cáncer de pulmón humano (A-549) y adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), los cuales mostraron una citotoxicidad con $EC_{50} \approx 14.5 \mu g/ml$ para el eremofilano **13** y $EC_{50} \approx 13.5 \mu g/ml$ para **14**²².

Del arbusto *Eremophila mitchelli* se aisló al eremofilano **15**, el cual mostró una actividad citotóxica *in vitro* con una IC_{50} de 42 $\mu g/ml$, en células de linfoblastos P388D1 de ratón²² (Figura 10).

1.7.1 El (5S)-5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto[2,3-b]furan-9-ol (cacalol)

El (5S)-5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto[2,3-b]furan-9-ol (**16**), también conocido como cacalol, es un furanoeremofilano que se aísla de plantas de los géneros *Cacalia*, *Psacallium* y *Senecio*^{24, 25} (Figura 11). Este compuesto ha mostrado ser un excelente antioxidante en la prueba de peroxidación lipídica llevada a cabo en cerebro de rata con una IC₅₀ de 40 nM²⁶ y en el ensayo con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) presentó una CE₅₀ de 12 μM²⁷. Otras propiedades que se le atribuyen al cacalol (**16**) son la actividad antiinflamatoria, al inhibir el edema producido por carragenina y 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol²⁸. Recientemente se estudió su fuerte efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama (MDA-MB231), en las que induce apoptosis activando una vía proapoptótica que ocasiona el deterioro del crecimiento del tumor *in vivo*, bloqueando la expresión del gen FAS y modulando la vía Akt-SREBP. De igual manera, se descubrió que una dosis baja de cacalol en combinación con taxol, produjo una potente actividad supresora de tumores *in vivo* derivados de una línea celular resistente a taxol²⁹.



16

Figura 11. Estructura del cacalol

1.8 Metilenciclohexadienonas (MCs)

Las metilenciclohexadienona (MCs) (Figura 12b), son intermediarios reactivos que se producen en la química de los fenoles y compuestos relacionados³⁰; están relacionadas estructuralmente con las benzoquinonas (Figura 12a), pero tienen uno de los oxígenos del carbonilo reemplazado por un grupo metileno³¹. Este cambio las hace enonas altamente conjugadas y moléculas electrofílicas muy reactivas³¹. Están implicados como los responsables para los efectos biológicos de drogas anticancerígenas, antioxidantes y varios compuestos naturales aromáticos hidroxilados³¹.

Las metilenciclohexadienonas, al ser compuestos muy electrofílicos, se convierten en especies muy reactivas hacia la adición nucleofílica. La reacción de nucleófilos en el metileno exocíclico electrofílico de la metilenciclohexadienona genera el aducto respectivo con posterior regeneración del sistema fenólico (Figura 12b y 12c)³².

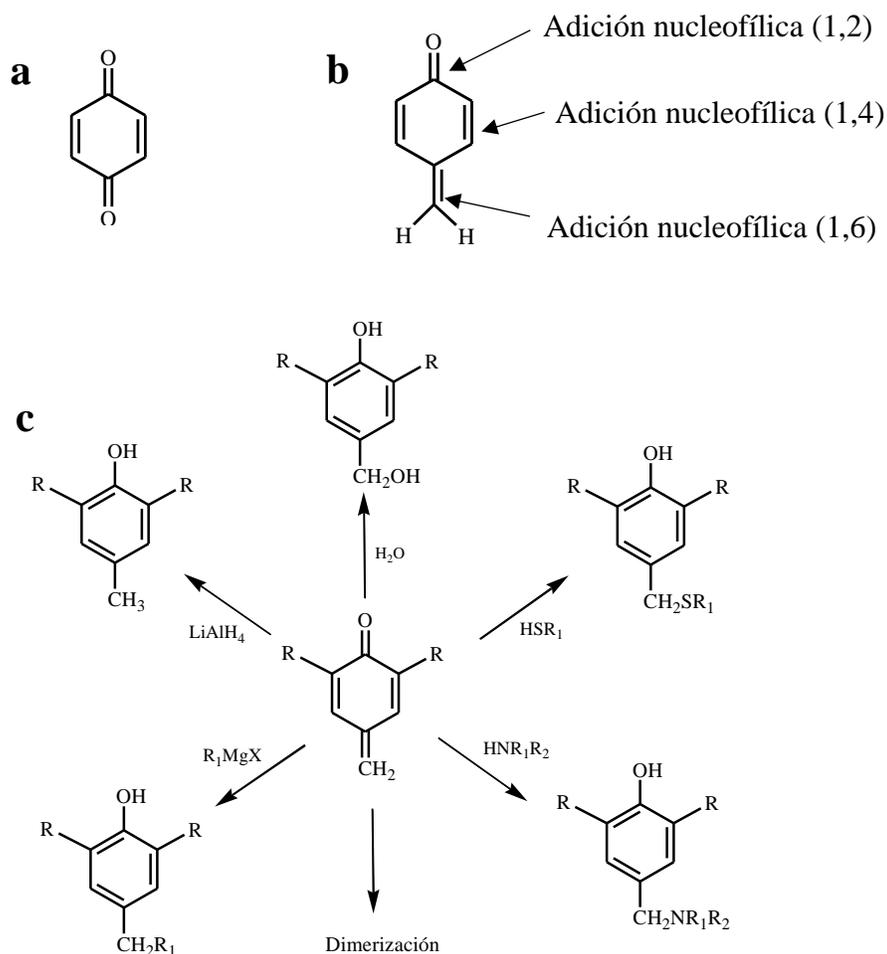


Figura 12. (a) Estructura de una benzoquinona. (b) Sitios reactivos de las metilenciclohexadienonas. (c) Reacciones de las MCs con nucleófilos. Modificado de (Taljaard, 2007) y (McCracken y col., 1997).

1.8.1 Interacción entre MCs y proteínas

En un trabajo reciente²⁷ se encontró que el cacalol (**16**) se transformó en una metilenciclohexadienona (**17**) mediante un tratamiento con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) como se muestra en el Esquema 13. Debido a que la

metilenciclohexadienona (**17**) es una especie altamente electrofílica, resultó ser muy reactiva frente al derivado de la L-cisteína **18** generando el compuesto **19**, lo cual sugiere que el compuesto **17** puede comportarse como un agente alquilante de proteínas que posean residuos de cisteínas (Figura 13).

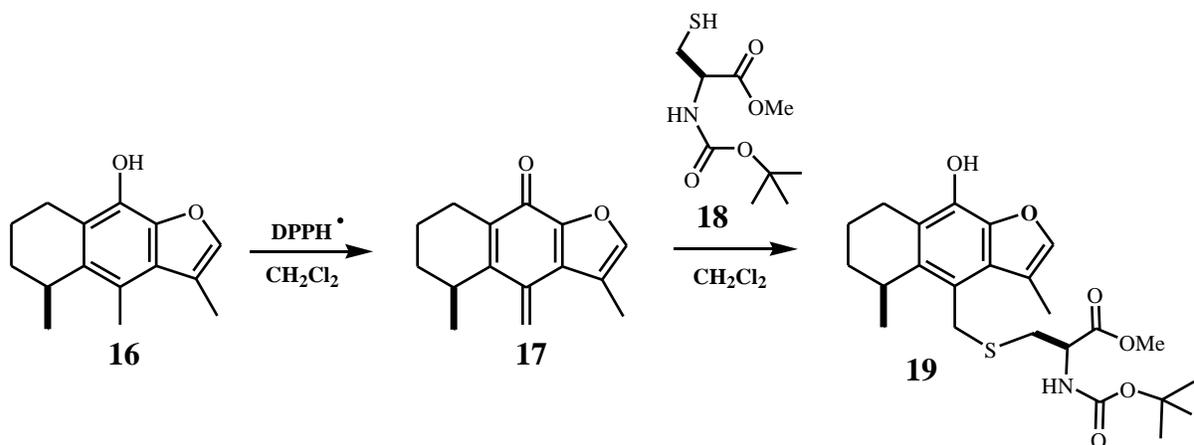


Figura 13. Oxidación del cacalol (**16**) con el radical libre DPPH para dar la metilenciclohexadienona (**17**) que a su vez reacciona con el derivado de la L-cisteína (**18**) para dar el producto de adición **19**. Modificado de (Ardila Fierro, 2011).

Los principales blancos para el ataque de las MCs y las especies quinoides son en general compuestos que contienen residuos de cisteína y proteínas con residuos de tiol disponibles. Lo anterior se debe a que electrófilos suaves rápidamente reaccionan con nucleófilos suaves como los tioles, aunque también pero más lentamente reaccionan con nucleófilos duros tales como aminas y grupos hidroxilo³³.

Algunos estudios desarrollados para analizar las reacciones de las especies MCs con otros aminoácidos tales como lisina, histidina y serina demuestran la formación de aductos con dichos aminoácidos en donde la adición ocurre principalmente en el grupo α -amino. Por lo que la alquilación de péptidos según su reactividad química, ocurre en el siguiente orden. Primero reaccionan los tioles de las cisteínas, seguidos por los grupos amino terminales, los grupos aminos de las cadenas laterales y por último los grupos hidroxilo de los aminoácidos, solo si las MCs son muy reactivas (Figura 14)³³.

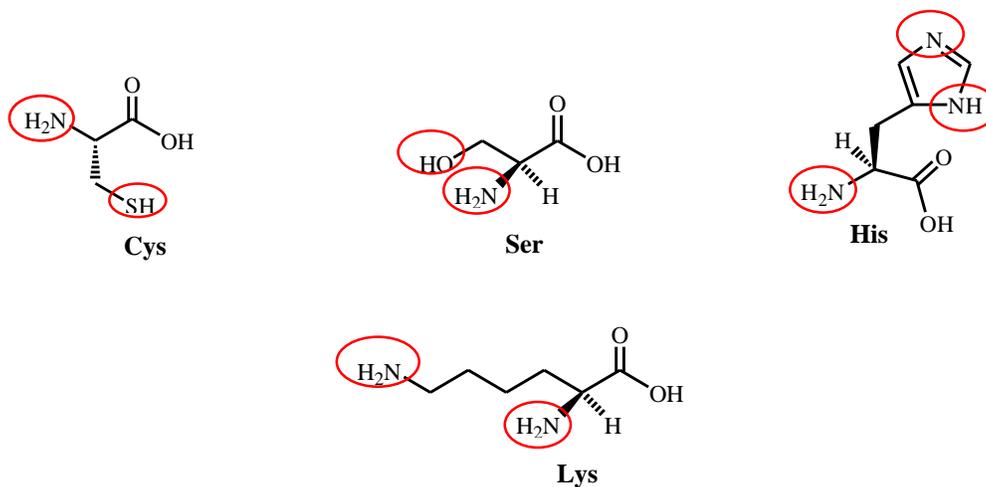


Figura 14. Estructuras de aminoácidos que forman aductos con las MCs.

Debido a la importancia biológica del cacalol (**16**) como agente antioxidante, antiinflamatorio y su efecto antiproliferativo en células de cáncer, en este trabajo se realizó un estudio de la influencia de este compuesto, sobre el equilibrio dinámico de los microtúbulos, así como la de varios derivados con diferentes estados de oxidación y con el grupo hidroxilo libre o protegido. Esta serie incluye al cacalol (**16**), la metilenciclohexadienona (**17**), acetato (**20**), el naftofuranol (**21**), la metilenciclohexadienona aromática (**22**) y el acetato del naftofuranol (**23**) (Figura 15).

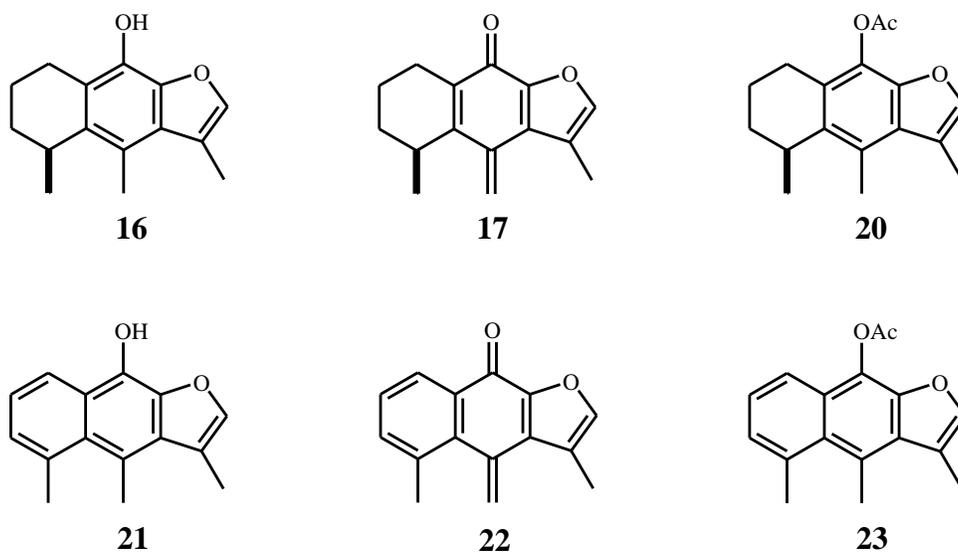


Figura 15. Compuestos que se estudiaron en el ensayo de polimerización-despolimerización de la α,β -tubulina *in vitro*.

Con base en lo anterior, resultó interesante además determinar si la metilenciclohexadienona (**17**), que se genera bajo condiciones oxidantes a partir del cacalol (**16**), se une de manera covalente a la tubulina (Figura 16). Este hallazgo podría explicar el mecanismo de acción del compuesto **16** al correlacionar al estrés oxidativo presente en las células de cáncer y la generación de especies electrofílicas, provenientes de la transformación del cacalol (**16**).

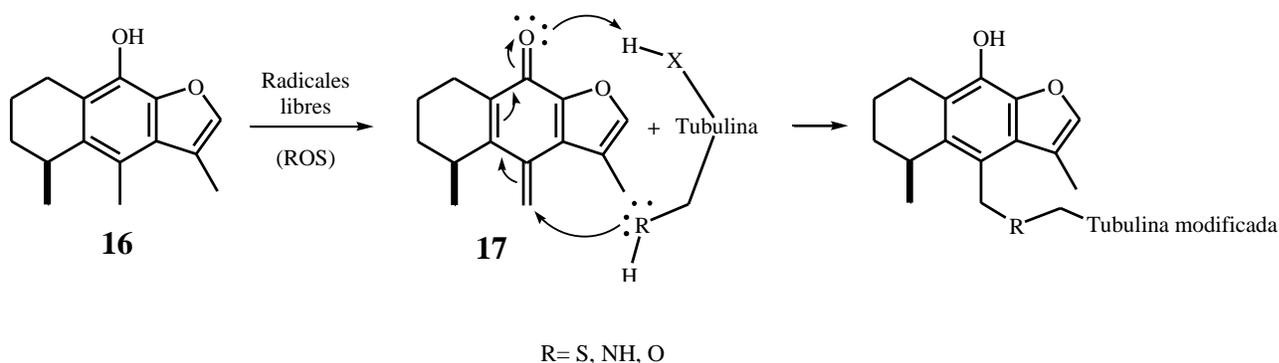


Figura 16. Posible mecanismo de acción del compuesto **16** en presencia de radicales libres para estabilizar los microtúbulos o impedir su formación.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, en 2012 causó 8.2 millones de muertes en todo el mundo según lo publicado por la OMS en 2014. Por lo tanto, es necesario el descubrimiento y el estudio de nuevos compuestos con actividad antineoplásica que puedan generar una opción para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de dicha patología. El cacalol (**16**), producto natural con actividad antineoplásica demostrada y de abundancia notable en México, merece un estudio detallado de su mecanismo de acción.

3. HIPÓTESIS

El cacalol (**16**) y el naftofuranol (**21**) en presencia de radicales libres se transformarán en las metilenciclohexadienonas **17** y **22**, respectivamente, y se unirán a ciertos residuos de aminoácidos de la tubulina alterando el mecanismo de formación de los microtúbulos en ensayos *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar si el compuesto 3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol (**16**) y sus derivados **17**, **20** y **21-23**, pueden alterar el mecanismo de polimerización-despolimerización de la tubulina.

4.2 Específicos

1. Obtener el producto natural 3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol (**16**) de los extractos de *Senecio cervarifolium*.
2. A partir del compuesto **16**, obtener los derivados **17**, **20** y **21-23** mediante reacciones de acetilación, hidrólisis y aromatización.
3. Determinar por métodos espectroscópicos y espectrométricos la estructura de los compuestos semi-sintéticos.
4. Llevar a cabo la evaluación de la actividad estabilizante de microtúbulos en ensayos *in vitro* del 3,4,5-trimetilnafto [2,3-*b*] furan-9-ol (**16**), así como la de sus derivados **17**, **20** y **21-23**.
5. Determinar en qué aminoácido o aminoácidos de la tubulina se une la metilenciclohexadienona (**17**).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del cacalol (16)

Para obtener al cacalol (**16**), una fracción acetilada del extracto hexánico de la raíz de *Senecio cervarifolium* se purificó por cromatografía en columna. El acetato de cacalol (**20**) que se obtuvo se sometió a una hidrólisis con KOH/MeOH para generar al cacalol (Figura 17). El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando una fase normal de gel de sílice de 230-400 mallas y una mezcla de 98:2 hexano-acetato de etilo como fase móvil y se lograron obtener cristales blancos, con un punto de fusión de 89-91 °C y un rendimiento del 85%.

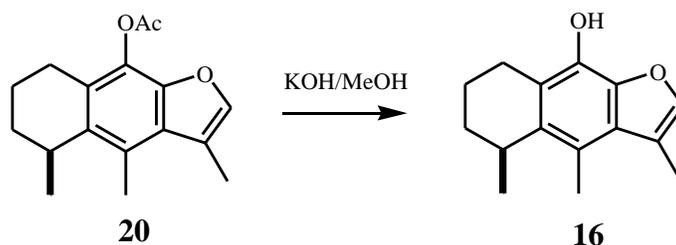


Figura 17. Reacción de hidrólisis del acetato de cacalol (**20**)

En el espectro de RMN-¹H del cacalol (**16**) se observó una señal simple ancha en 7.28 ppm correspondiente al H-12, además de una señal simple en 5.02 ppm asignada para el hidroxilo fenólico. Las señales simples encontradas en 2.52 ppm y 2.40 ppm correspondieron a los grupos metilo aromáticos H-14 y H-13 respectivamente, mientras que en 1.22 ppm se observó una señal doble correspondiente al metilo secundario H-15 (Figura 18).

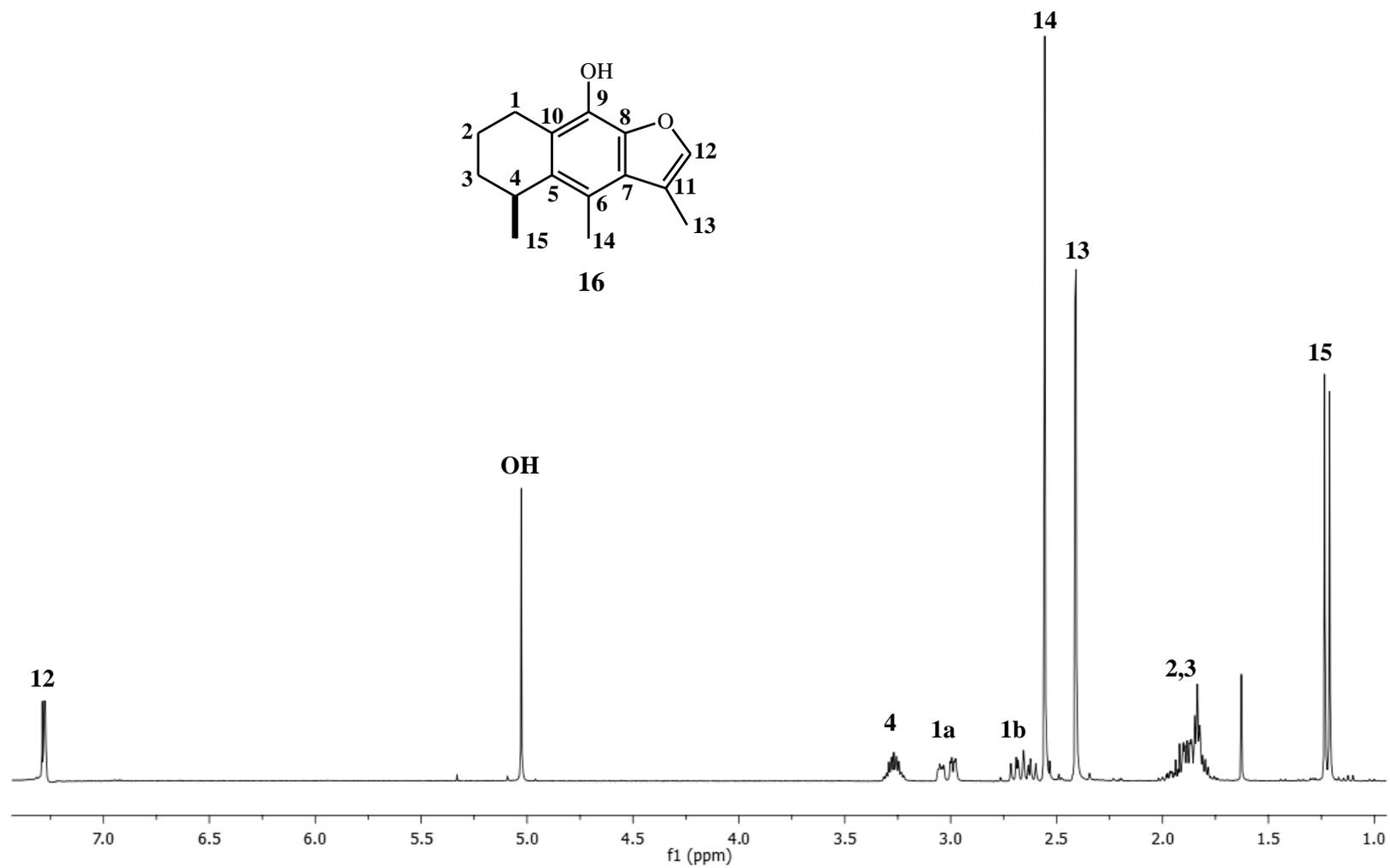


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del cacalol (20).

5.2 Reacción entre el cacalol (**16**) y el DPPH

Para obtener la metilenciclohexadienona (**17**) se procedió a realizar un tratamiento del compuesto **16** (1 mmol) con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (3 mmol) en CH_2Cl_2 (Figura 19)²⁷. La mezcla se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente y se purificó usando placas de fase reversa empleando como fase móvil una mezcla de 8:2 acetonitrilo-agua se logró obtener **17** puro, libre del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo con un rendimiento del 20%.

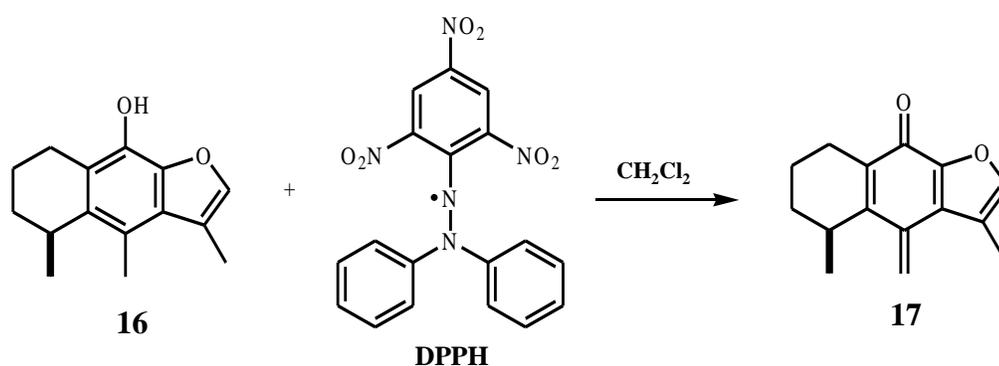


Figura 19. Reacción del cacalol (**16**) con DPPH

El espectro de RMN-¹H mostró una señal simple ancha en 7.40 ppm correspondiente al H-12, un par de señales simples en 6.28 ppm y 6.19 ppm asignadas a los hidrógenos olefínicos H-14a y H-14b, respectivamente. De igual manera se observaron las señales correspondientes al anillo de ciclohexano en 2.80, 2.40 y 1.80 ppm (H-1a, H-1b, H-2a, H-2b, H-3a, H-3b y H-4). También se encontraron las señales para los metilos H-13 y H-15 en 2.28 ppm y en 1.26 ppm, respectivamente. Por último, desapareció la señal simple del metilo H-14, unido originalmente al anillo fenólico presente en el cacalol, comprobándose así la formación de la metilenciclohexadienona (**17**) (Figura 20).

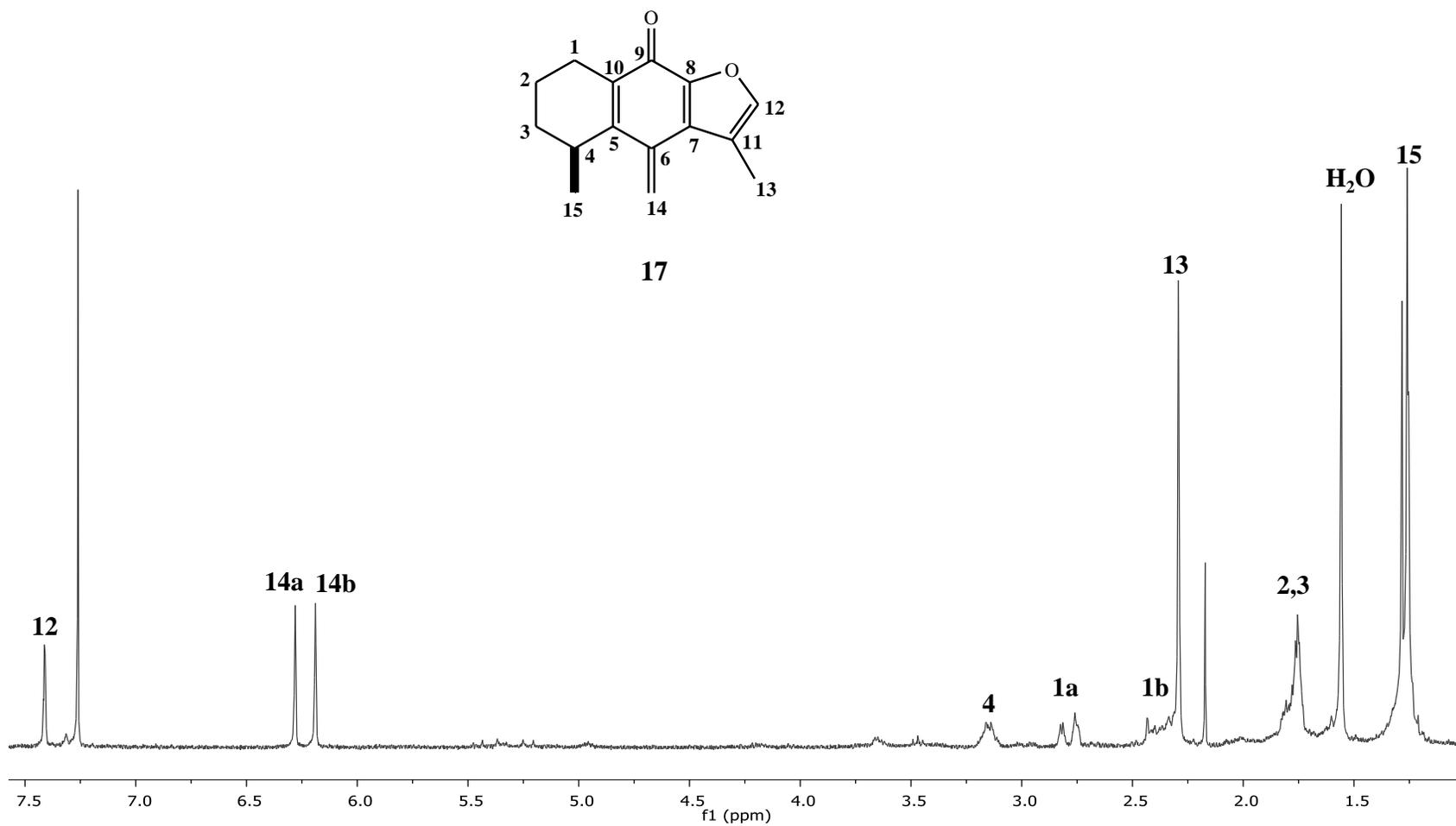


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz de la metilciclohexadienona (17).

5.3 Caracterización del acetato de cacalol (20)

El acetato de cacalol (**20**) se aisló de una fracción del extracto hexánico acetilado de la raíz de *Senecio cervarifolium*. Se purificó por cromatografía en columna, utilizando una fase normal de gel de sílice 230-400 mallas y una mezcla de 97:3 hexano-acetato de etilo como fase móvil (Figura 21). Se obtuvieron cristales blancos con un punto de fusión de 103-104 °C, con un rendimiento superior al 80%.

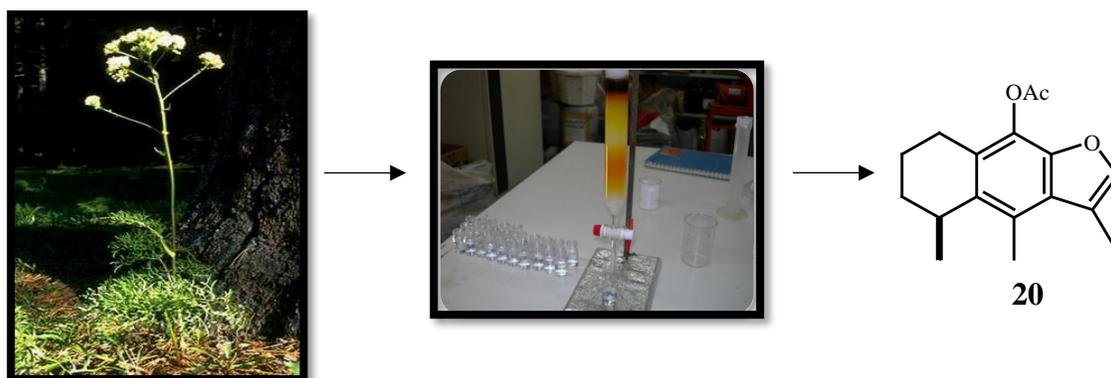


Figura 21. Purificación del acetato de cacalol (**20**) a partir de *Senecio cervarifolium*.

En el espectro de RMN-¹H se observó una señal simple en 7.24 ppm correspondiente al H-12 y señales para los metilos H-14, H-13 y H-15 en 2.56 ppm, 2.36 ppm y 1.18 ppm respectivamente. También se encontró una señal simple en 2.38 ppm correspondiente al grupo acetilo, lo que confirma la estructura de acetato de cacalol (**20**) (Figura 22).

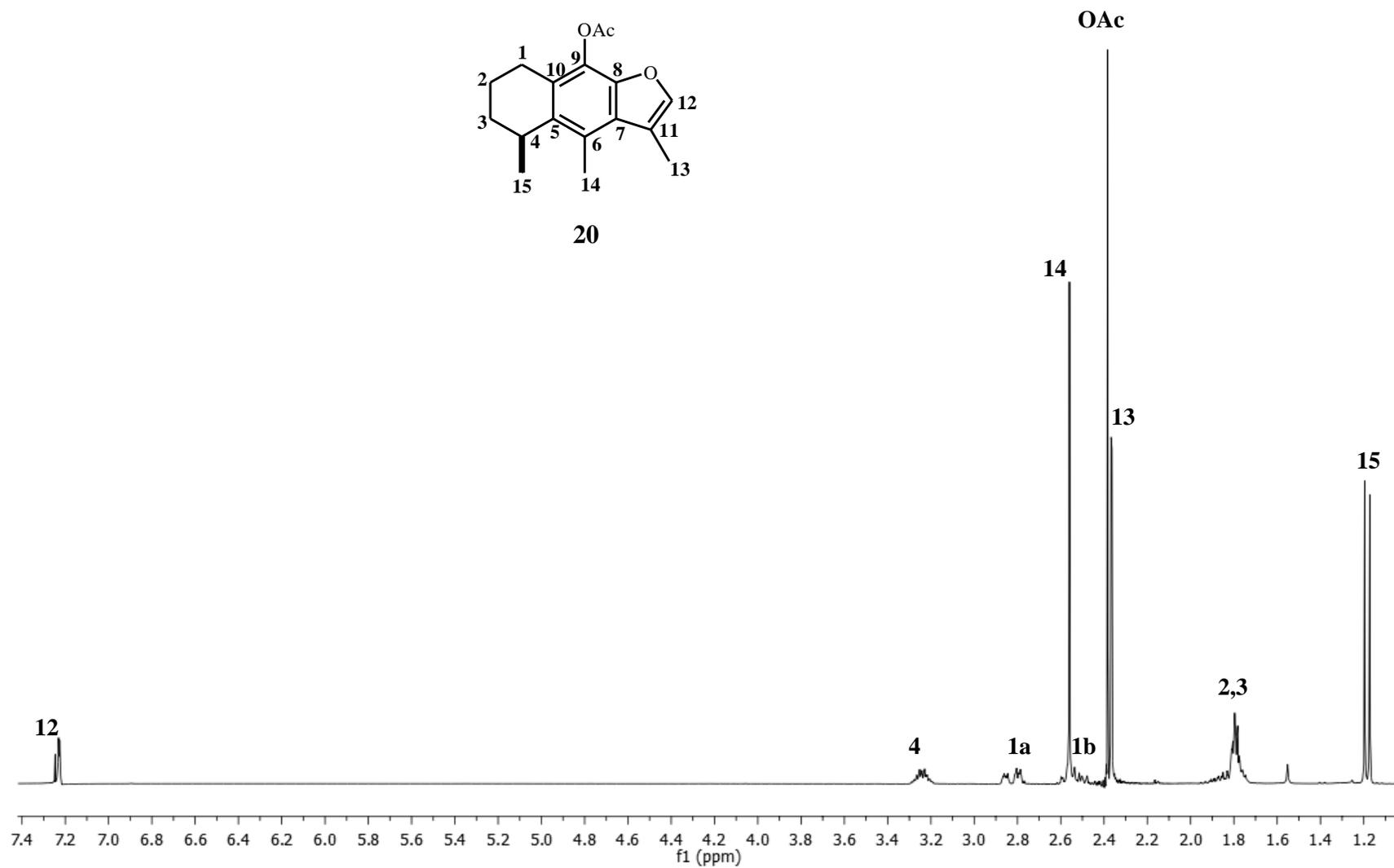


Figura 22. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del acetato de cacalol (20).

5.4 Reacción entre el acetato de cacalol (**20**) y cloranilo

5.4.1 Caracterización del acetato de naftofuranol (**23**)

El compuesto **20** (1 mmol) se trató con cloranilo (4 mmol) en xileno, calentando a reflujo por un periodo de 20 h²⁴. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó usando vacío. Se agregó hexano y nuevamente se calentó en reflujo por 2 h. Se filtró y el filtrado que se obtuvo se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alúmina y como fase móvil una combinación 98:2 de hexano-acetato de etilo para dar el acetato de naftofuranol (**23**) como un sólido ligeramente amarillo con punto de fusión de 154-156 °C con un rendimiento del 23% (Figura 23).

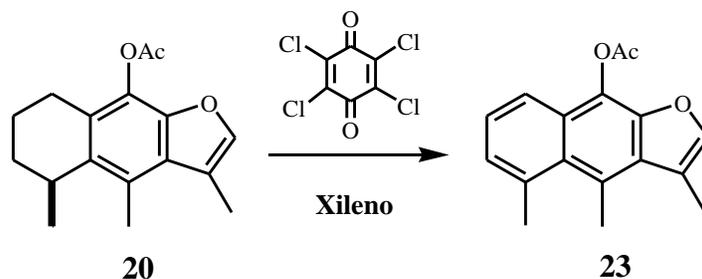


Figura 23. Obtención del acetato de naftofuranol (**23**).

El espectro de RMN-¹H mostró las señales para los tres hidrógenos aromáticos H-1, H-2 y H-3, además del H-12, en la región de 7.81 ppm a 7.21 ppm. Se observaron también señales para los metilos H-14, H-15 y H-13 en 3.16 ppm, 2.96 ppm y 2.48 ppm, respectivamente, además de una señal simple en 2.52 ppm correspondiente al grupo acetilo de la molécula. Por otra parte, las señales del anillo de ciclohexano desaparecieron indicando así la aromatización de la molécula para generar el acetato del naftofuranol (**23**) (Figura 24).

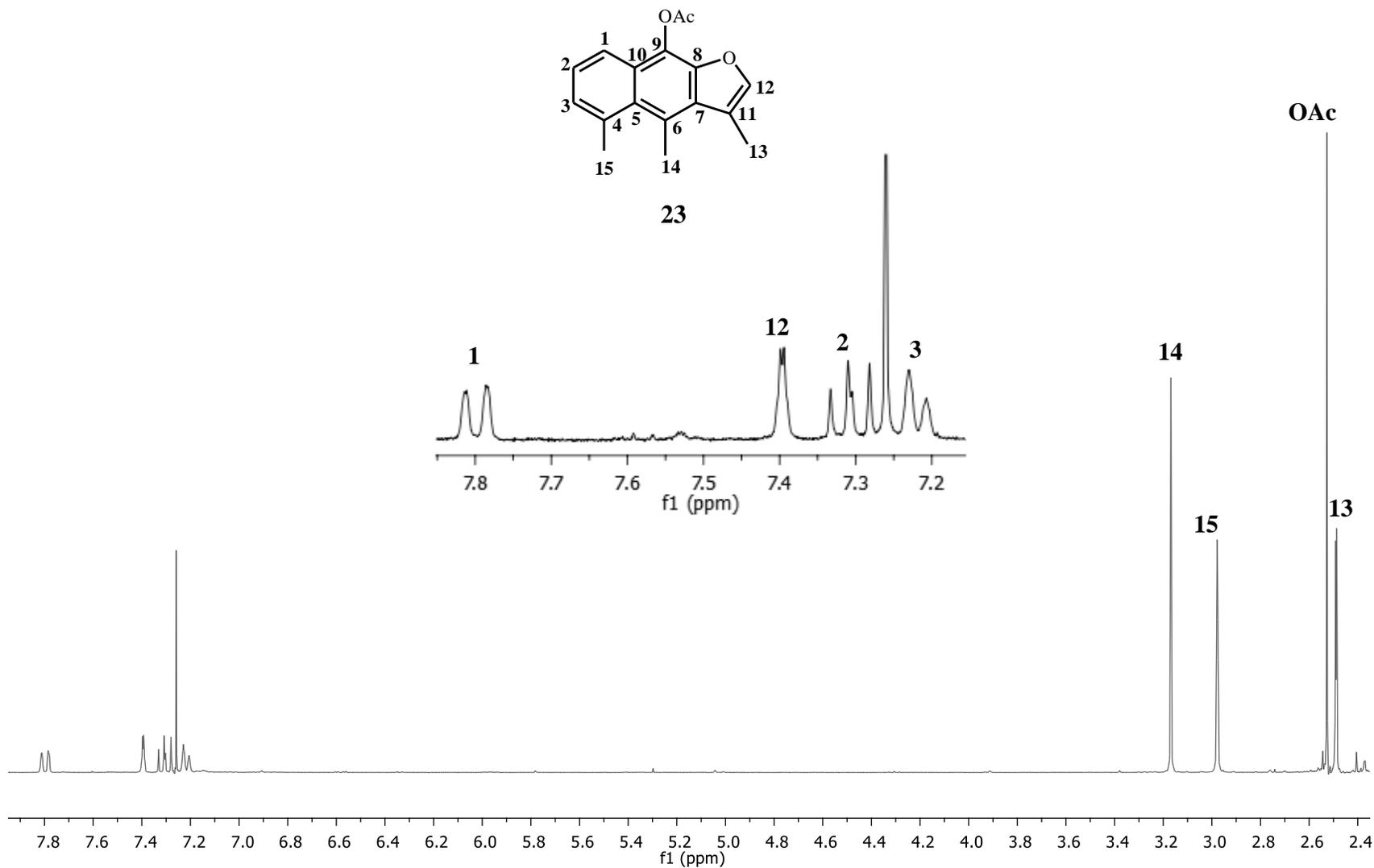


Figura 24. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del acetato de naftofuranol (**23**).

5.4.2 Caracterización de la metilenciclohexadienona aromática (22)

Del filtrado y del residuo sólido obtenido en la reacción anterior, se purificaron por cromatografía en columna usando como fase normal alúmina y una mezcla de 95:5 hexano-acetato de etilo como fase móvil, para obtener la metilenciclohexadienona aromática (22) como un sólido ligeramente amarillo con un punto de fusión de 160-161 °C y con un rendimiento del 20% (Figura 25).

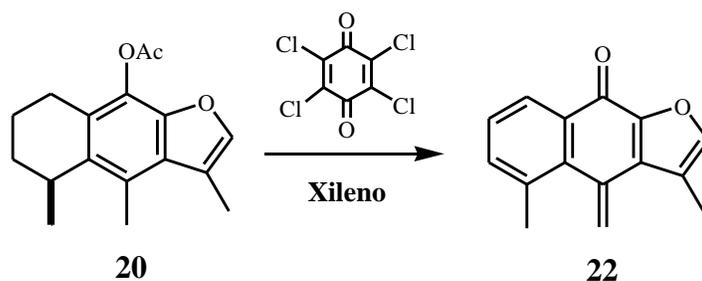


Figura 25. Obtención de la Metilenciclohexadienona aromática (22).

En el espectro de RMN-¹H se pueden observar claramente las señales de los hidrógenos aromáticos H-1, H-2 y H-3, además del H-12, que van desde 8.32 ppm a 7.33 ppm, un par de señales simples en 6.35 ppm y 6.33 ppm asignadas a los hidrógenos olefínicos del metileno exocíclico H-14a y H-14b, respectivamente. También se observaron señales para los metilos H-15 y H-13 en 2.76 ppm y 2.36 ppm respectivamente. Además, se observó la desaparición de las señales correspondientes al anillo de ciclohexano. De igual manera, desaparecieron las señales del metilo H-14 y la señal simple correspondiente al grupo acetilo, comprobando así la formación de la metilenciclohexadienona aromática (22) (Figura 26).

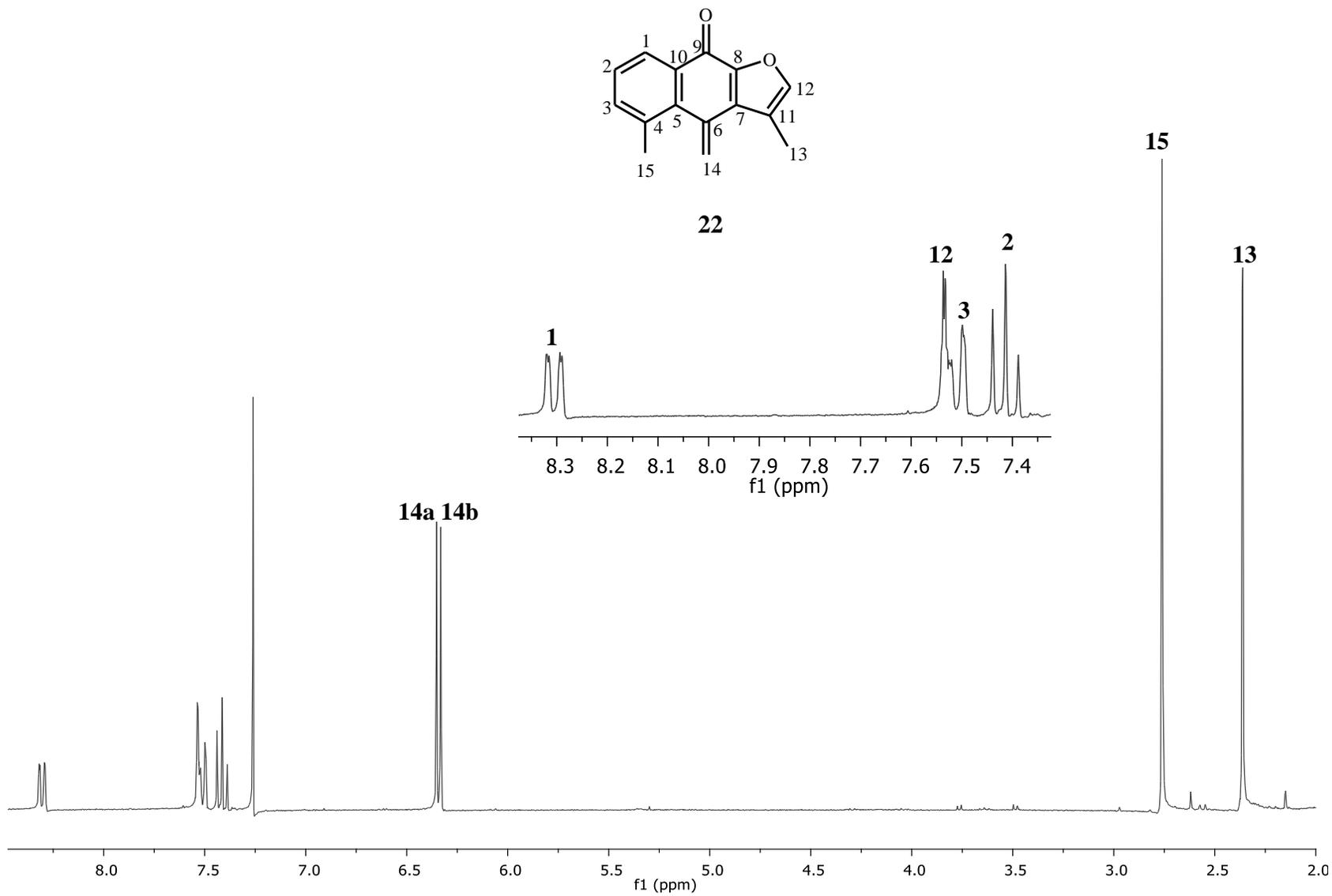


Figura 26. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz de la metilenciclohexadienona aromática (22).

5.5 Reacción del acetato de naftofuranol (**23**) con K_2CO_3

El naftofuranol (**21**) se obtuvo a partir de un tratamiento del compuesto **23** (1 mmol) con K_2CO_3 (1 mmol) disuelto en 1 ml de agua. Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó MeOH (5 ml) y se dejó en agitación por 1 h a temperatura ambiente con atmósfera de argón. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando una fase normal de gel de sílice de 230-400 mallas y una mezcla de 8:2 hexano-acetato de etilo como fase móvil, para dar un sólido blanco con un rendimiento del 20%.

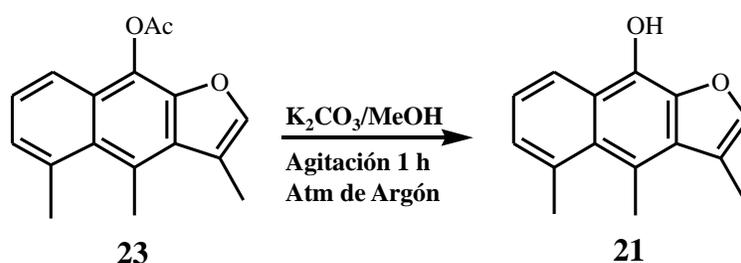
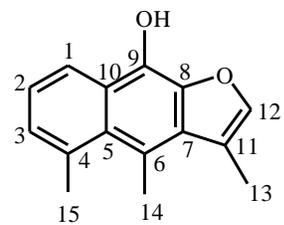


Figura 27. Obtención del naftofuranol (**21**).

En el espectro de RMN- 1H se observaron las señales de los hidrógenos aromáticos H-1, H-2, H-3 y el H-12, además del OH fenólico, en la región de 8.25 ppm a 7.42 ppm. Se observaron también señales para los metilos H-15, H-13 y H-14 en 2.76 ppm, 2.32 ppm y 1.85 ppm, respectivamente. Por otra parte, desapareció la señal simple correspondiente al grupo acetilo del compuesto **23** comprobándose así la formación del naftofuranol (**21**) (Figura 28).



21

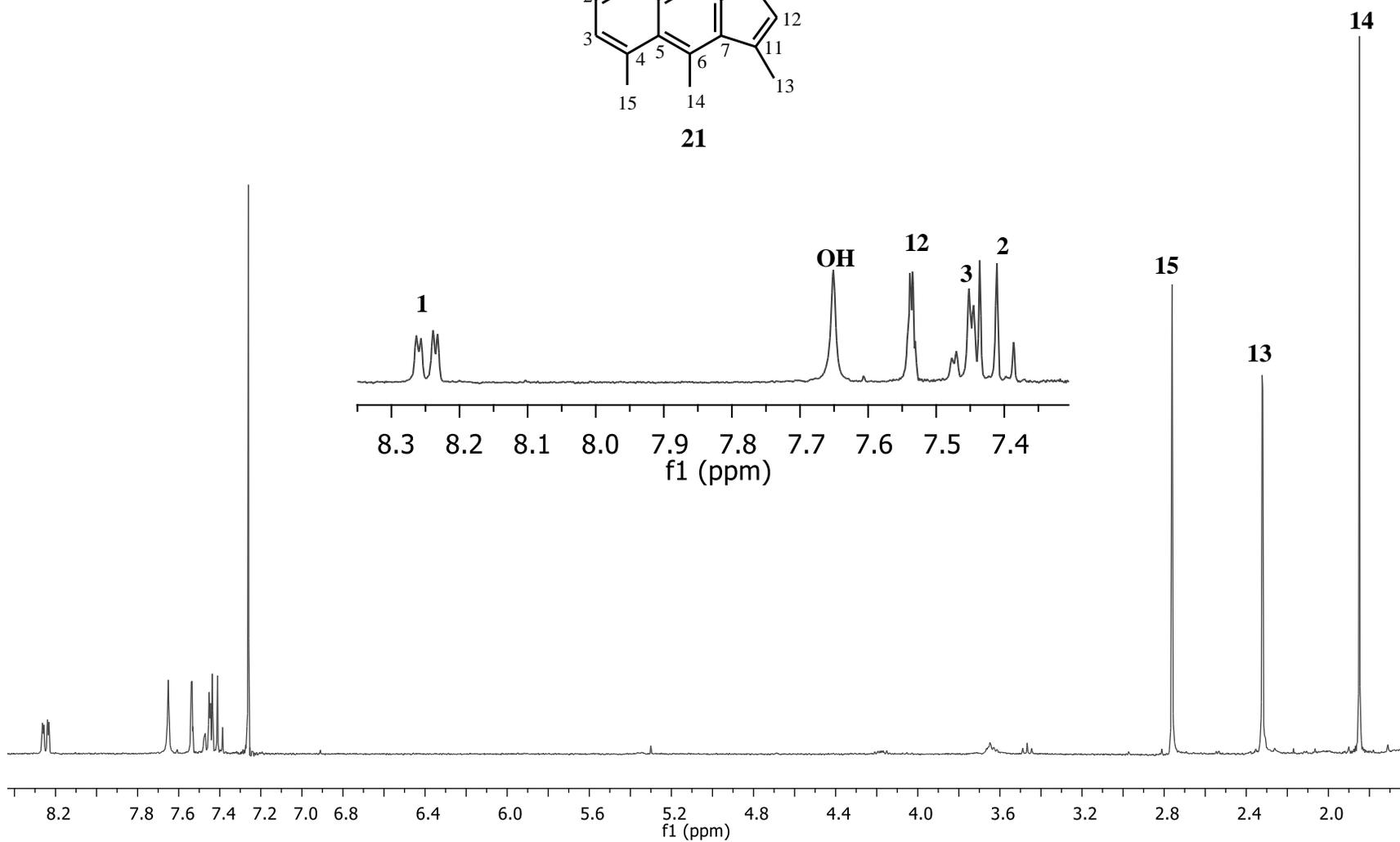


Figura 28. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del naftofuranol (**21**).

5.6 Evaluación *in vitro* de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos en presencia de derivados del furanoeremofilano

A continuación se describe la influencia de los derivados del furanoeremofilano preparados en este trabajo sobre la inestabilidad dinámica de los microtúbulos formados por heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina, en donde se utilizó una modificación del método original de Shelanski *et al*³⁴. Como controles positivos se empleó el paclitaxel y el nocodazol por ser agentes potentes que estabilizan e inhiben la polimerización de los microtúbulos, respectivamente. Como control negativo se empleó el vehículo que se utilizó para agregar, tanto el compuesto **16** y sus derivados **17**, **20** y **21-23**, que en todos los casos fue DMSO.

El cacalol (**16**) a una concentración de 100 μ M presentó un efecto sobre la tubulina al inhibir la polimerización en comparación, cuando sólo se empleó el vehículo (DMSO). La polimerización máxima se alcanzó al minuto 60 con una Δ de absorbancia de 0.258. Durante el periodo de enfriamiento a -20 °C, la inestabilidad de los microtúbulos en presencia de **16** se manifestó al registrarse una caída en la Δ de absorbancia de 0.210, seguida de una lenta repolimerización (Figura 29). La información obtenida de este experimento sugirió que una serie de derivados del compuesto natural **16** podría inhibir la polimerización de los microtúbulos, teniendo un efecto similar al obtenido con el nocodazol.

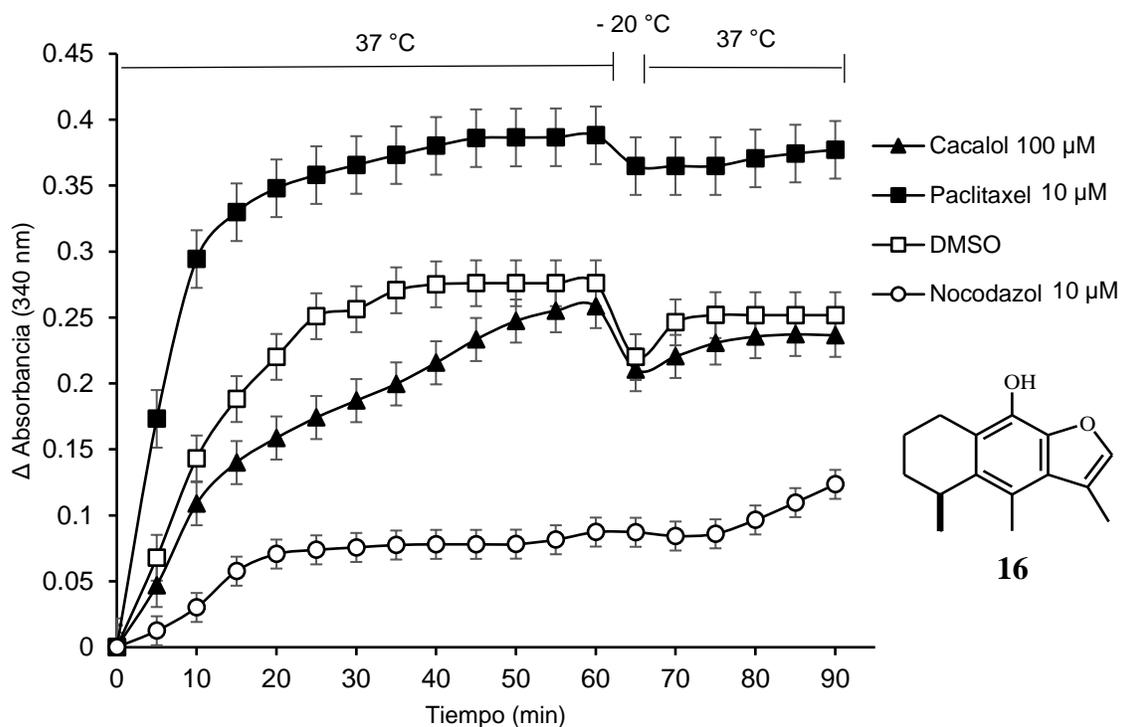


Figura 29. Efecto del cacalol (**16**) sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de temperatura, $n = 3$.

El derivado **17** en una concentración de $100 \mu\text{M}$, generó al minuto 60 una Δ absorbancia de tan sólo 0.162 mucho menor que la observada en el control negativo. Al disminuir la temperatura de incubación, la despolimerización no disminuyó a la par que en el vehículo DMSO, dejando en evidencia la estabilización de los microtúbulos, así como la inhibición de la polimerización. De igual manera al reincubar, se observó una rápida repolimerización (Figura 30). La diferencia estructural entre la sustancia natural **16** y el derivado **17** es la estructura de metilenciclohexadienona, lo cual indica que esta modificación favorece notablemente la inhibición la polimerización de la tubulina *in vitro*; así como, su actividad estabilizante en microtúbulos.

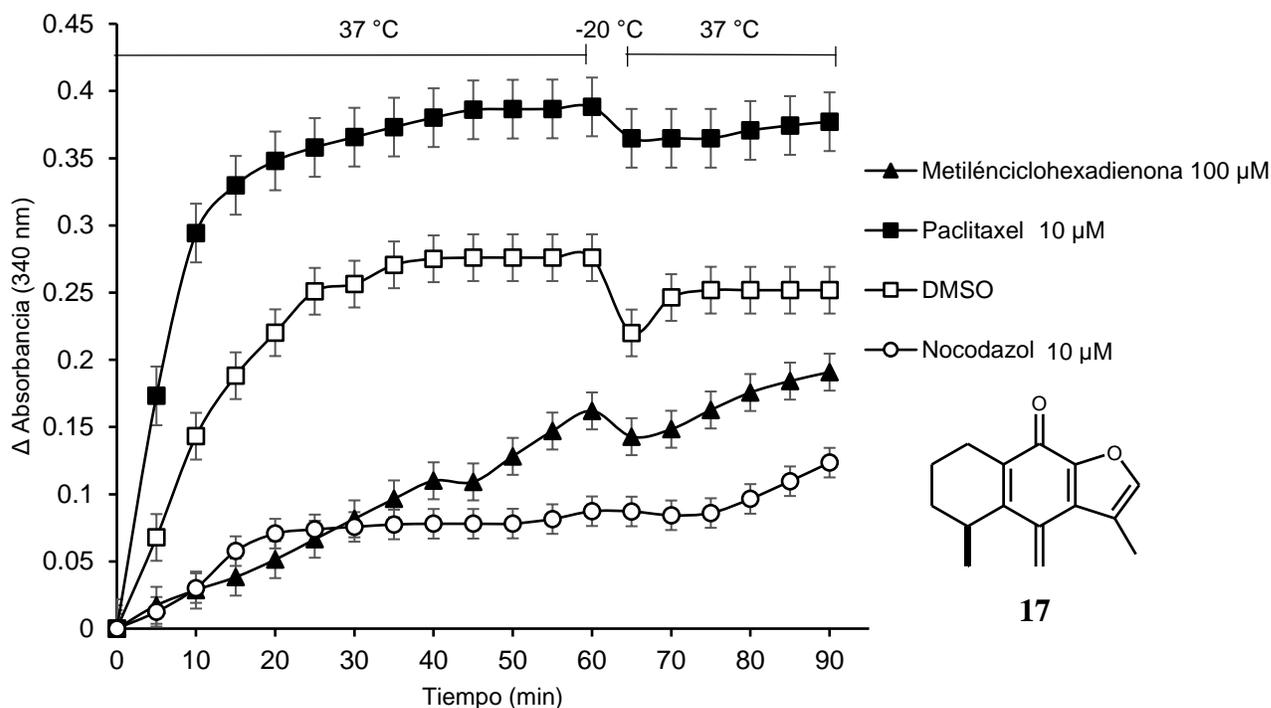


Figura 30. Efecto de la metilenciclohexadienona (**17**) sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de temperatura, $n = 3$.

Con respecto al acetato de cacalol (**20**) a $100 \mu\text{M}$, en esta prueba se produjo un máximo de polimerización al minuto 60 con un Δ de absorbancia de 0.311. La tubulina se comportó con un aumento en la polimerización con respecto al vehículo (DMSO), ya que se alcanzó un máximo de polimerización al minuto 60 con un valor de Δ absorbancia de 0.276. La despolimerización de los microtúbulos se observó en el sistema del compuesto **20**, cayendo al igual que en el vehículo, por lo que el derivado **20** aumenta la polimerización de la tubulina y no es estabilizador de microtúbulos (Figura 31). Los resultados de este experimento revelaron que la presencia de un grupo acetilo en C-9, favoreció la polimerización de la tubulina en comparación con el cacalol (**16**) que tiene un grupo hidroxilo.

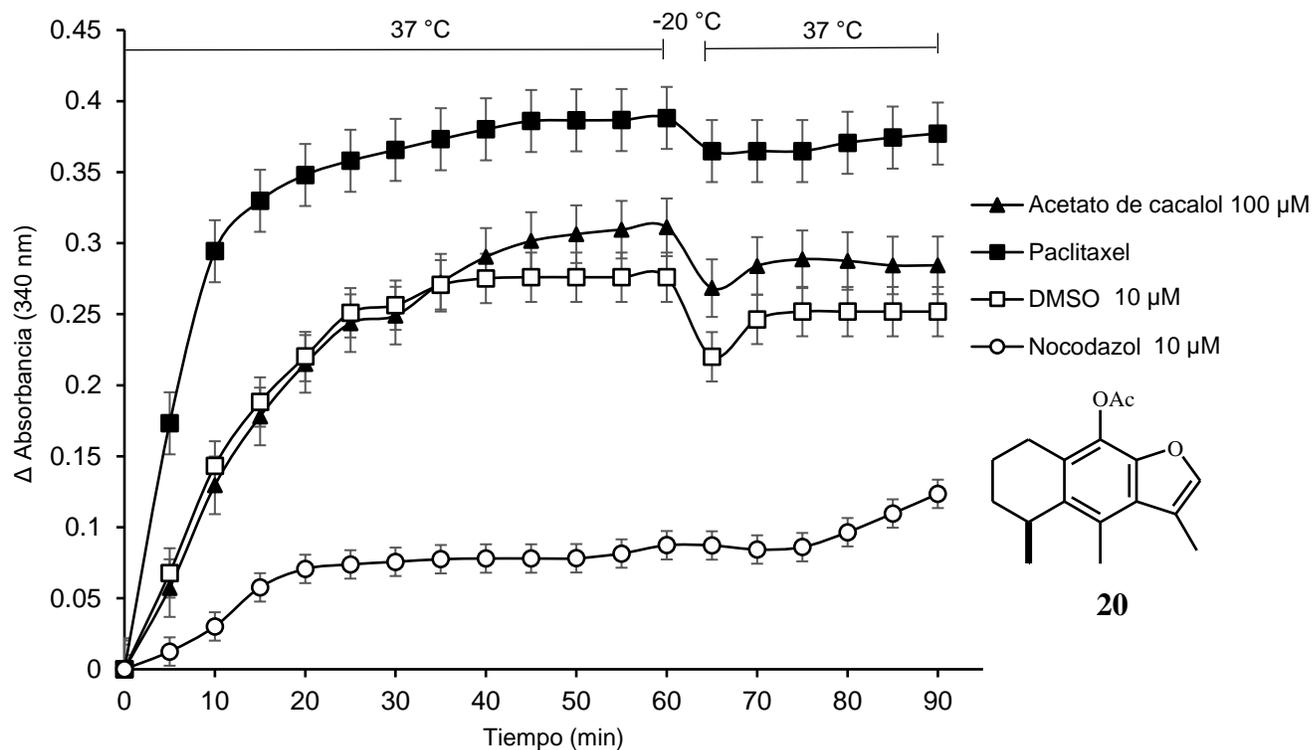


Figura 31. Efecto del acetato de cacalol (**20**) sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de temperatura, $n = 3$.

El naftofuranol (**21**) en 100 μ M promovió un nivel máximo de polimerización al minuto 55 (0.319 con un Δ de absorbancia) y en la fase de despolimerización generó una aceleración del fenómeno reflejada en una caída de Δ absorbancia por debajo del vehículo (DMSO), por lo que podemos decir que el compuesto **21** aceleran tanto la velocidad de polimerización y la despolimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina (Figura 32). La diferencia estructural entre el producto natural **16** y el naftofuranol (**21**) es la presencia de dobles enlaces en los C-1, C-2, C-3 y C-4, quedando de manifiesto que una deshidrogenación podría afectar la velocidad del equilibrio dinámico de los microtúbulos.

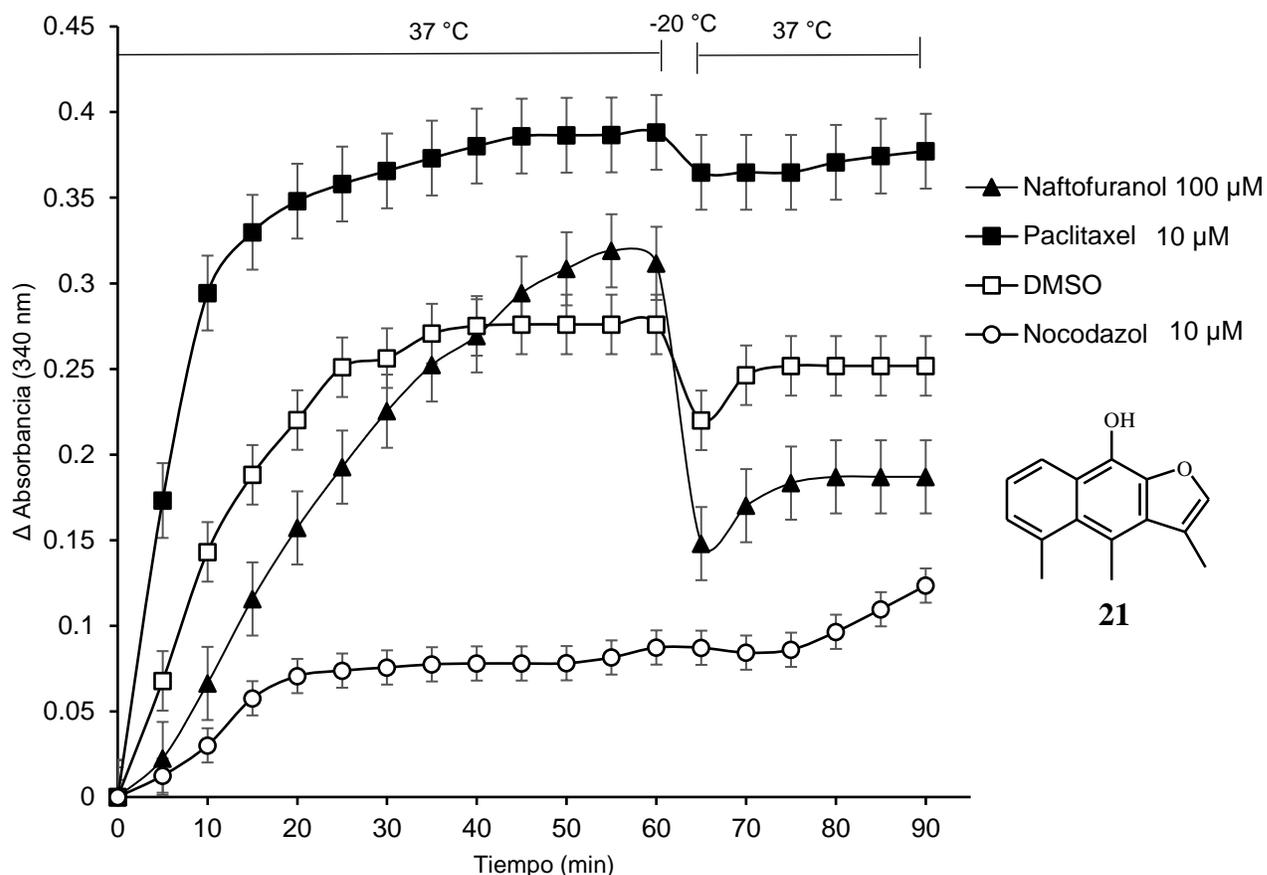


Figura 32. Efecto del naftofuranol (**21**) sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de temperatura, $n = 3$.

Además la metilenciclohexadienona aromática (**22**), con una estructura química parecida a la del derivado **17**, a concentraciones de 50 μ M y 100 μ M, generó máximos de polimerización al minuto 60 con Δ absorbancia de 0.111 y 0.110, respectivamente. Sin embargo, el área bajo la curva de polimerización fue diferente sugiriendo que el proceso de polimerización se ve afectado al aumentar la dosis de **22** (Figura 33). Cabe señalar que en los dos sistemas, la polimerización fue un poco menor que la observada en el control negativo; de igual manera, después del estímulo despolimerizante, no se apreció una caída pronunciada como en el caso del vehículo (DMSO), por lo que este compuesto a 50 μ M y 100 μ M inhibe la polimerización de la tubulina y estabiliza los microtúbulos seguida de una rápida repolimerización. Debido a que el derivado **22** posee en su estructura un esqueleto de

metilenciclohexadienona en combinación con la presencia de dobles enlaces en los carbonos C-1, C-2, C-3 y C-4; se podía esperar una modificación del efecto dinámico en los microtúbulos.

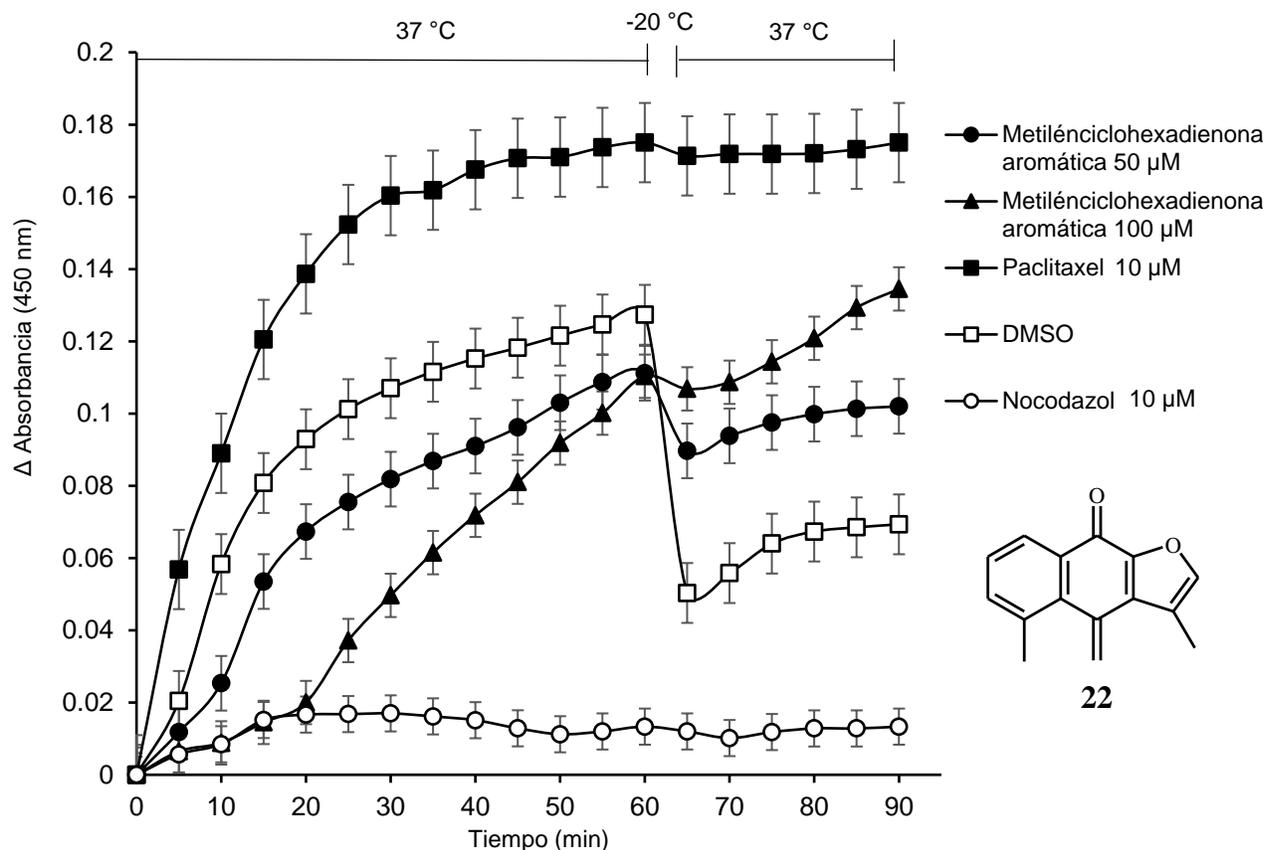


Figura 33. Efecto de la metilenciclohexadienona aromática (**22**) sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de temperatura, $n = 3$.

La polimerización de la tubulina en presencia de **23** fue mucho menor que la del vehículo (DMSO). A la concentración de 100 μ M, el sistema alcanzó el máximo de polimerización al minuto 60 con una Δ de absorbancia 0.187. Después del estímulo despolimerizante, se apreció una caída pronunciada como en el caso del vehículo (DMSO) por lo que podemos decir que el acetato de naftofuranol (**23**), inhibe la polimerización de la tubulina y no estabiliza microtúbulos (Figura 34). Con base a los resultados obtenidos, se puede establecer que la inclusión de un grupo acetilo en C-9, además de las presencia de dobles enlaces en los carbonos C-1, C-2, C-3 y C-4, en el derivado **23**, aumentan la actividad en la inhibición de

la polimerización de los heterodímeros α -tubulina- β -tubulina en comparación con el producto natural **16**.

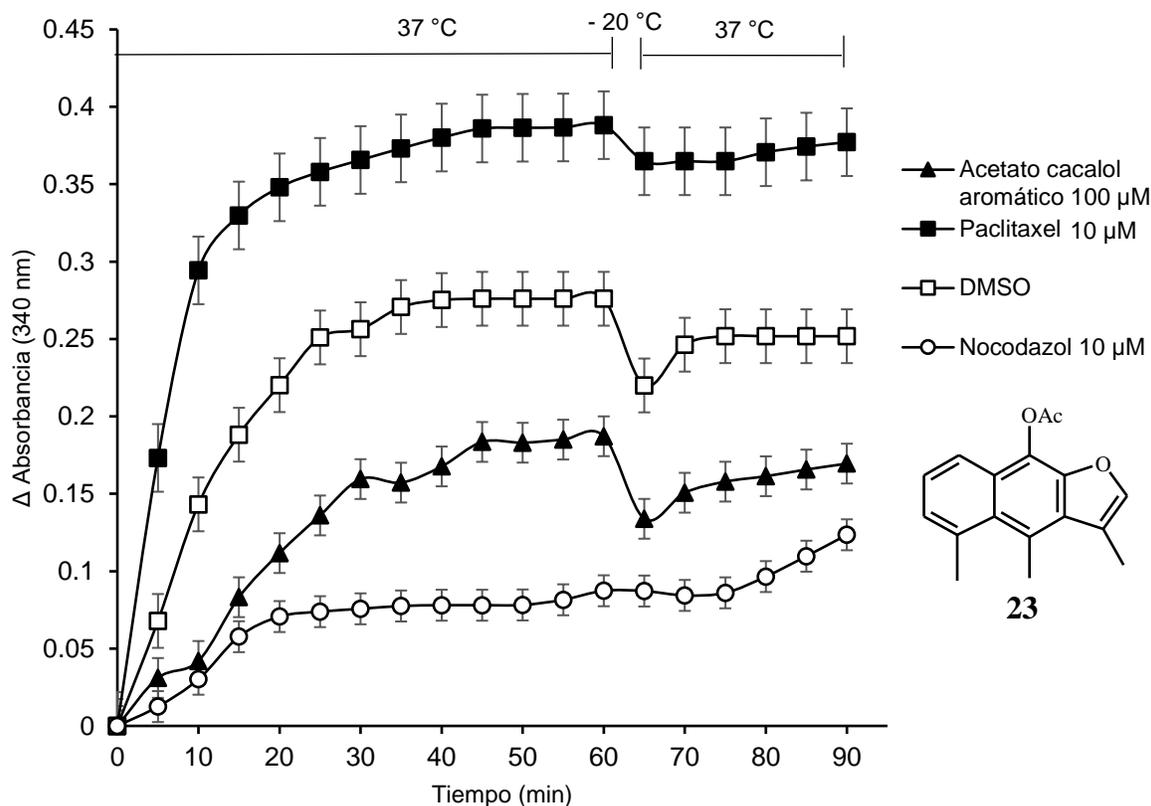


Figura 34. Efecto del acetato de naftofuranol (**23**) sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de temperatura, $n = 3$.

En resumen, la incorporación particular del grupo acetilo en C-9 o dobles enlaces en C-1, C-2, C-3 y C-4 al esqueleto del furanoeremofilano sólo aumenta la polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina o se ve favorecida la velocidad de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos, respectivamente. Sin embargo, al incorporar el grupo acetilo en C-9 junto con los dobles enlaces en C-1, C-2, C-3 y C-4 o la estructura de la metilenciclohexadienona al producto natural **16** se aumenta la inhibición de la polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina y la actividad estabilizante sobre los microtúbulos resulta muy significativa.

5.7 Determinación de los residuos de tubulina modificados por la metilenciclohexadienona (17) en los microtúbulos

Una vez purificado el derivado **17** y caracterizado por métodos espectroscópicos y espectrométricos, se procedió a incubar a la tubulina-GTP con y sin la metilenciclohexadienona (**17**) a 37 °C durante 1 h en un buffer general de tubulina GTP para inducir la polimerización de los heterodímeros α -tubulina- β -tubulina³⁴. Tras la incubación, los microtúbulos formados se precipitaron con acetona a -20 °C³⁵, se sedimentaron mediante centrifugación^{35,36,37} y se disolvieron en una solución de 50 mM de NH_4HCO_3 ³⁵. Posteriormente, la proteína fue reducida y alquilada, para digerir las muestras usando tripsina y los péptidos resultantes se analizaron por MALDI-TOF MS^{38,39}, para detectar los péptidos covalentemente modificados por la metilenciclohexadienona (**17**).

Cabe señalar que aunque no todos los péptidos generados por la digestión se ionizaron en el MALDI-TOF, principalmente los que contenían residuos de cisteínas, los cromatogramas de estos experimentos muestran un pico diferencial entre las muestras tratadas con la metilenciclohexadienona (**17**) y las muestras control digerido con tripsina. En el espectro control se observó un péptido que contenía residuos de serina y lisina que generó un pico con m/z 1487 (Figura 35a), y que en el espectro de masas de la tubulina modificada por el derivado **17** no se encontró. Al sumar 228 uma (peso molecular del derivado **17**) se obtiene un peso molecular de 1715 correspondiente a un pico que se observó el espectro de masas de la tubulina modificada (Figura 35b). Es pertinente mencionar que este pico no se encontró en el control. Este resultado preliminar nos estaría indicando que la metilenciclohexadienona (**17**) se está uniendo covalentemente al grupo OH libre de un residuo de serina o al grupo NH_2 de la cadena lateral de la lisina del fragmento 230-243 de la α -tubulina (Figura 36). Cabe destacar, que debido a la baja intensidad de las señales de espectrometría de masas, correspondientes a estos picos, no se pudieron fragmentar y determinar con exactitud que aminoácido fue el que se modificó covalentemente por la metilenciclohexadienona (**17**).

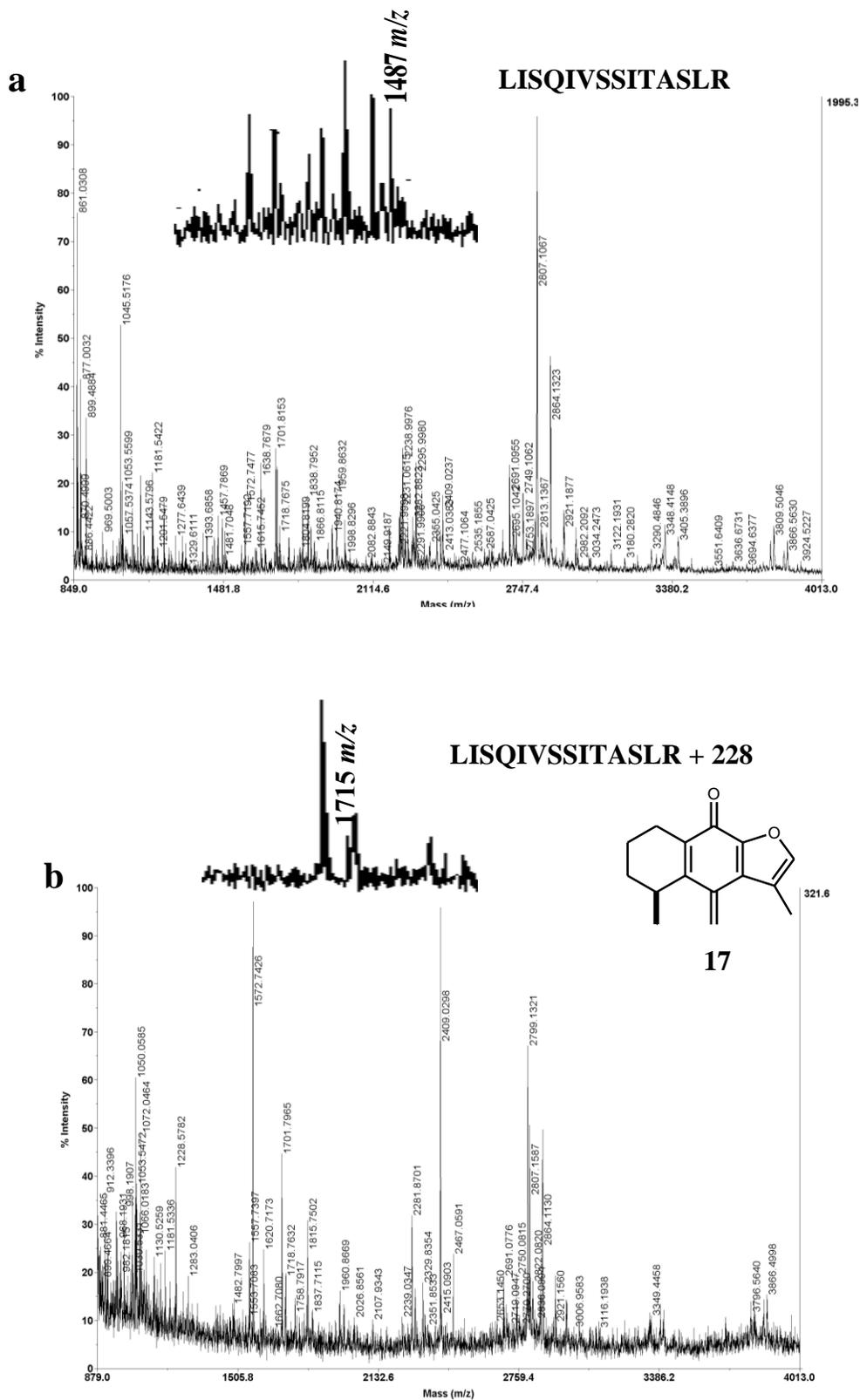


Figura 35. (a) Análisis cromatográfico de los péptidos trípticos de la muestra de tubulina y el péptido con m/z 1487. (b) Análisis cromatográfico de los péptidos trípticos de la muestra de tubulina incubados con metilenciclohexadienona (**17**).

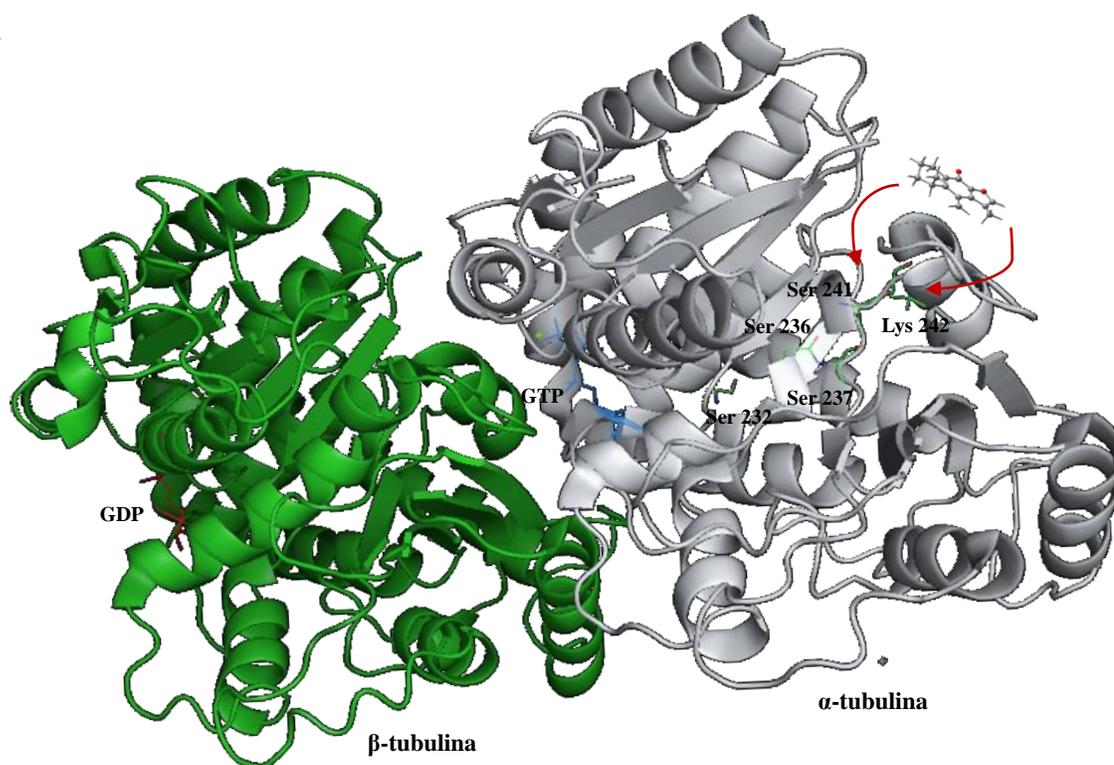


Figura 36. Esquema del sitio de unión de la metilciclohexadienona (**17**) con el grupo OH libre de un residuo de serina o al grupo NH₂ de un residuo de lisina del fragmento 230-243 de la subunidad α -tubulina. Para construir esta figura de la proteína se ha empleado el archivo cristalográfico del *RCSB Protein Data Bank*^{13, 40} bajo el código 1JFF. El GTP y GDP unido al sitio interno, están coloreados azul oscuro y rojo, respectivamente.

6. CONCLUSIONES

- Se prepararon y se caracterizaron cuatro derivados del furanoeremofilano (**17**, **21-23**) a partir del producto natural 3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol (**16**), encontrándose que el producto natural **16** inhibe la polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina *in vitro*. Los derivados **20** y **21** aumentan la polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina o favorece la velocidad de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos, respectivamente. El derivado **23** aumenta la inhibición de la polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina con respecto al producto natural **16**. Los derivados **17** y **22** inhiben de la polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina; así como, la actividad estabilizante sobre los microtúbulos resulta muy significativa.
- Los estudios preliminares de digestión de tubulina indican que la metilenciclohexadienona (**17**) se está uniendo covalentemente al grupo OH libre de un residuo de serina o al grupo NH₂ de un residuo de lisina del fragmento 230-243 de la α -tubulina.
- El posible mecanismo del cacalol (**16**) para su efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, es la transformación a la metilenciclohexadienona (**17**) por el alto nivel de radicales libres en células cancerosas; y así, el derivado **17** se une covalentemente a un residuo de serina o lisina del fragmento 230-243 de la α -tubulina modificando la inestabilidad dinámica de los microtúbulos e induciendo la apoptosis de este tipo de células.

7. PERSPECTIVAS

- Continuar los estudios farmacológicos de los derivados **17**, **22** y **23** en líneas celulares, así como determinar la IC₅₀ de estos derivados.
- Determinar con exactitud, que aminoácido o aminoácidos están modificados covalentemente por el derivado **17** y **22**, realizando una digestión en gel de la proteína y analizando todos los péptidos que conforman a la tubulina por MALDI-TOF, para obtener así un resultado más preciso y detectar los péptidos unidos covalentemente tanto de la metilenciclohexadienona (**17**) y su homólogo **22**.
- Utilizar los derivados **17** y **22** en subsecuentes modificaciones químicas con el objetivo de aumentar su potencia inhibitoria de la polimerización del heterodímero α -tubulina- β -tubulina y su actividad estabilizadora de microtúbulos.

8. PARTE EXPERIMENTAL (MATERIALES Y MÉTODOS)

8.1 Procedimientos generales de purificación de los compuestos

8.1.1 Cromatografía en capa fina

Para los análisis cromatográficos se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 soportada en aluminio con revelador UV marca Merck F₂₅₄. La detección de los constituyentes se llevó a cabo utilizando luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm).

8.1.2 Cromatografía en columna abierta

Esta técnica se desarrolló empacando columnas de vidrio con gel de sílice de 70-230 y 230-400 mallas y/o alúmina neutra, utilizando como eluyente hexano y mezclas de hexano-AcOEt en orden de polaridad ascendente.

8.1.3 Determinación de los puntos de fusión

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

8.2 Datos generales de la espectroscopía y espectrometría utilizadas en la determinación estructural de los furanoeremofilanos

8.2.1 Rotación específica

La rotación específica se midió a cinco longitudes de onda (589, 578, 546, 436 y 365 nm) utilizando un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341.

8.2.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Los espectros de IR se obtuvieron usando un espectrofotómetro marca BUCK Scientific 500 utilizando CHCl₃ como disolvente. Se dan las lecturas de las bandas más importantes.

8.2.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se determinaron en CDCl₃ utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros a 300 MHz para ¹H y a 75.4 MHz para ¹³C, así como los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC

se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300. La multiplicidad de las señales se indica de acuerdo a las siguientes abreviaciones: s (simple), d (doble), dd (doble de doble), t (triple), q (cuádruple), a (ancha).

8.2.4 Espectrometría de masa (EM)

Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro Varian Saturn 2000 de trampa iónica por impacto electrónico a 70 eV (IE) y por ionización química con acetonitrilo (IQ).

8.3 Datos generales sobre la polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos

8.3.1 Mediciones de absorbancia para el ensayo de polimerización-despolimerización de la α,β -tubulina

Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro universal BioTek EL808UI empleando placas de ELISA de 96 pozos.

8.4 Datos generales sobre la digestión con tripsina de la tubulina sin modificar y modificada con metilenciclohexadienona (17)

8.4.1 Digestión proteica

La digestión con tripsina se realizó en un baño agua con microprocesador integrado con número de serie 2802829 de Thermo Scientific. A una temperatura de 37 °C durante 12 horas.

8.4.2 Sedimentación de microtúbulos

Los microtúbulos se sedimentaron en una centrífuga Beckman Coulter AllegraTm 64R y un rotor F2402H. A 3000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos.

8.4.3 Purificación de péptidos con ZipTips C18

Los péptidos trípticos tanto de la tubulina modificada por el derivado **17** y no modificada, fueron desalados usando puntas ZipTips C18 de Millipore.

8.4.4 Concentrador de vacío para DNA

Los péptidos trípticos fueron concentrados hasta un volumen aproximado de 2 μ L en un concentrador de vacío para DNA DNA1200P ThermoSavant.

8.4.5 Espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF

Los péptidos generados por la digestión se ionizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 plus de ABSciex.

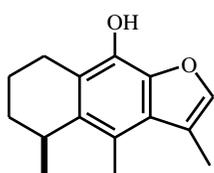
8.5 Colecta de *Senecio cervarifolium*

La especie *Senecio cervarifolium* se colectó en noviembre del 2013, en el km 23, de la carretera Morelia-México, Vía Mil Cumbres frente al Parque Nacional Insurgente José María Morelos, con coordenadas: N 19°, 39.928'; W 101°, 00.300'; 2076 msnm.

8.6 Espectroscopía y espectrometría del producto natural 16 y sus derivados 17, 20, 21-23

8.6.1 Obtención del cacalol (16)

Una solución de 0.5 g de acetato de cacalol (20) con 0.24 g de KOH en 20 ml de MeOH se sometió a reflujo por 1.5 h. Transcurrido este tiempo, se evaporó el MeOH en el rotavapor, se resuspendió en HCl al 10% y se extrajo con acetato de etilo, se lavó tres veces con solución saturada de NaHCO₃ y tres veces con agua, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad en rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando una fase normal de gel de sílice de 230-400 mallas y una mezcla de 98:2 hexano-acetato de etilo como fase móvil.



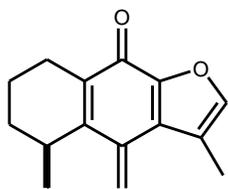
Cacalol (16) (5,6,7,8-Tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol).

Rendimiento 85%. Sólido blanco. p.f. 89-91 °C. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.27 (q, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-12), 5.03 (s, 1H, OH), 3.29 – 3.23 (m, 1H, H-4), 3.01 (dd, *J* = 11.7, 2.3 Hz, 1H, H-1a), 2.73 – 2.59 (m, 1H, H-1b), 2.56 (s, 3H, Me-14), 2.41 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, Me-13), 2.00–1.79 (m, 4H, H-2a, H-2b, H-3a y H-3b), 1.22 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, Me-15).

8.6.2 Obtención de la metilenciclohexadienona (17)

Una mezcla de 0.04 g de cacalol (16) con 0.205 g del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en 3 ml de diclorometano, se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó con una corriente de nitrógeno. El producto de la reacción

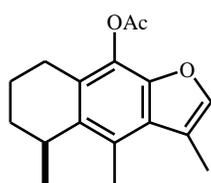
se purificó usando placas de fase reversa C18 empleando como fase móvil una mezcla 8:2 acetonitrilo-agua; por último, se realizó una re-purificación por cromatografía en columna, utilizando una fase normal de gel de sílice de 230-400 mallas y cloroformo como fase móvil.



Metilenciclohexadienona (17) (5,6,7,8-Tetrahidro-3,5-dimetil-4-metilen-nafto[2,3-*b*]furan-9(4H)-ona). Rendimiento 20%. Miel color amarillo. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.41 (q, $J = 1.1$ Hz, 1H, H-12), 6.28 (s, 1H, H-14a), 6.19 (s, 1H, H-14b), 3.20 – 3.10 (m, 1H, H-4), 2.78 (dd, $J = 20.1, 4.0$ Hz, 1H, H-1a), 2.46 – 2.30 (m, 1H, H-1b), 2.29 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, Me-13), 1.84 – 1.70 (m, 4H, H-2a, H-2b, H-3a y H-3b), 1.27 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, Me-15). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm 175.3 (C-9) 147.3 (C-8), 146.5 (C-5), 143.9 (C-12), 135.0 (C-6), 134.1 (C-10), 129.4 (C-7), 121.8 (C-14), 118.8 (C-11), 29.2 (C-3), 27.8 (C-4), 22.9 (1C, C-1), 22.9 (1C, C-15), 16.3 (C-2), 10.8 (C-13). IR (CHCl_3) ν_{max} 2932 cm^{-1} (C-H), 1725 cm^{-1} (C=O), 1634 cm^{-1} (C=C Acíclico), 1621 cm^{-1} (C=C), 1467 cm^{-1} (C=CH), 1222 cm^{-1} (C-O Arom), 977 cm^{-1} (C=CH₂). $[\alpha]_{589} = +21$, $[\alpha]_{578} = +22$, $[\alpha]_{546} = +28$, UV $\lambda_{\text{max EtOH}}$ 221 nm (log ϵ 3.85), 299 nm (log ϵ 3.73). EMIQ (CH_3CN) m/z 229 $[\text{M}]^+$ (100), 230 (16), 228 (4.6), 200 (1.7), 231 (1.2), 63 (1.1).

8.6.3 Obtención del acetato de cacalol (20)

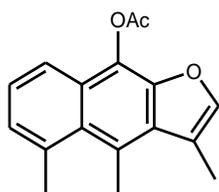
El acetato de cacalol (20) se aisló de una fracción acetilada del extracto hexánico de la raíz de *Senecio cervarifolium* por medio de una separación por cromatografía en columna. En dicha separación se utilizó una fase normal de gel de sílice de 230-400 mesh y una polaridad de 97:3 hexano-acetato de etilo. El derivado 20 se identificó por RMN de ^1H y ^{13}C .



Acetato de cacalol (20) (5,6,7,8-Tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-acetato). Sólido blanco. p.f. 103-104 °C. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.23 (q, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-12), 3.28 – 3.20 (m, 1H, H-4), 2.83 (dd, $J = 12.3, 2.1$ Hz, 1H, H-1a), 2.56 (s, 3H, Me-14), 2.54 – 2.47 (m, 1H, H-1b), 2.38 (s, 3H, OAc), 2.37 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, Me-13), 1.97 – 1.71 (m, 4H, H-2a, H-2b, H-3a y H-3b), 1.18 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, Me-15).

8.6.4 Obtención del acetato de naftofuranol (23)

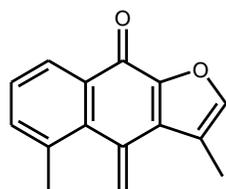
Una solución de 0.2 g de acetato de cacalol (**20**) y 0.72 g de cloranilo en 15 ml de xileno se calentó a reflujo por 20 h. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó usando vacío. El residuo obtenido se disolvió en hexano y se calentó nuevamente a reflujo por 2 h; una vez concluido el calentamiento, la mezcla se filtró y el filtrado obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alúmina y como fase móvil una combinación 98:2 de hexano-acetato de etilo.



Acetato de naftofuranol (23) (3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-acetato). Rendimiento 23%. Sólido ligeramente amarillo. p.f. 154-156 °C. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.80 (dd, $J = 8.2$, 1.8 Hz, 1H, H-1), 7.39 (q, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-12), 7.31 (dd, $J = 8.2$, 7.0 Hz, 1H, H-2), 7.21 (dd, $J = 7.0$, 1.8 Hz, 1H, H-3), 3.17 (s, 3H, Me-14), 2.98 (s, 3H, Me-15), 2.53 (s, 3H, OAc), 2.49 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, Me-13).

8.6.5 Obtención de la metilenciclohexadienona aromática (22)

Del filtrado y del residuo sólido obtenido en la reacción anterior, se purificaron por cromatografía en columna usando como fase normal alúmina utilizando como fase estacionaria alúmina y como fase móvil una combinación 95:5 de hexano-acetato de etilo.

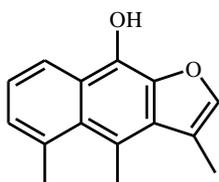


Metilenciclohexadienona aromática (22) (3,5-dimetil-4-metilen-nafto[2,3-*b*]furan-9(4H)-ona). Rendimiento 20%. Sólido ligeramente amarillo. p.f. 160-161°C. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.30 (dd, $J = 7.6$, 1.6 Hz, 1H, H-1), 7.53 (q, $J = 1.1$ Hz, 1H, H-12), 7.50 (d, $J = 7.6$, 1.6 Hz, 1H, H-3), 7.41 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-2), 6.35 (s, 1H, H-14a), 6.33 (s, 1H, H-14b), 2.76 (s, 3H, Me-15), 2.36 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, Me-13).

8.6.6 Obtención del naftofuranol (21)

A 21.5 mg de acetato de naftofuranol (**23**) se le agregaron 10.8 mg de K_2CO_3 disueltos en 1 ml de agua, posteriormente la solución se trató con MeOH (5 ml). La mezcla se dejó en agitación por 1 h a temperatura ambiente con atmósfera de argón. Transcurrido el tiempo de

reacción, el MeOH se evaporó en el rotavapor y el producto se extrajo con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, utilizando una fase normal de gel de sílice de 230-400 mallas y una mezcla de 8:2 hexano-acetato de etilo como fase móvil.



Naftofuranol (21) (3,4,5-trimetilnafto[2,3-*b*]furan-9-ol).

Rendimiento 20%. Sólido blanco. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.25 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H, H-1), 7.7 (s, 1H, OH), 7.54 (q, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-12), 7.46 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1H, H-3), 7.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-2), 2.76 (s, 3H, Me-15), 2.32 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, Me-13), 1.85 (s, 3H, Me-14). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ ppm 146.0 (C-6), 141.6 (C-5), 140.0 (C-7), 137.4 (C-4), 136.5 (C-3), 133.4 (C-10), 128.3 (C-2), 128.3 (C-12), 126.1 (C-1), 120.3 (C-11), 97.8 (C-8), 83.2 (C-9), 24.4 (C-14), 21.0 (C-15), 8.81 (C-13). UV λ_{max} dioxano 218 nm (log ε 3.85), 235 nm (log ε 3.68), 252 nm (log ε 3.51), 272 nm (log ε 3.4), 304 nm (log ε 3.79).

8.7 Evaluación *in vitro* sobre la polimerización de los heterodímeros α-tubulina-β-tubulina y despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura

El producto natural **16** y los derivados **17**, **20**, **21-23** se disolvieron en DMSO y se colocaron por triplicado en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y de media área, en alícuotas de 10 μL de una concentración tal que permitiese tener concentraciones finales de 10, 50 y 100 μM, según el compuesto a analizar. Por otro lado, se preparó una solución de tubulina de cerebro bovino de >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E.U.A.) manteniéndola siempre a 0 °C. Para preparar la solución, la tubulina se descongeló y se disolvió la cantidad necesaria de un buffer de pH 6.9 para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL. El buffer contenía sal sesquisódica del ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etansulfónico) 80.0 mM, cloruro de magnesio 2.0 mM, ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético 0.5 mM y 5'-trifosfato de guanosina 1.0 mM. La solución de tubulina a 0 °C se agregó, en alícuotas de 100 μL, a los pozos con los compuestos. La placa de ELISA, mantenida a 0 °C, se transfirió inmediatamente a un lector de placas Biotek EL808IU precalentando a 37 °C durante 30

minutos. La polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 340 nm o 450 nm⁴¹ según sea el caso, cada minuto durante 60 minutos con temperatura controlada a 37 °C y con un periodo mezclado inicial de 5 segundos. Después de 60 minutos de incubación, la placa se removió del lector e inmediatamente se llevó a una temperatura de -20 °C por 15 minutos. Después de este tiempo, la placa se colocó nuevamente en el lector por 30 minutos más a 37 °C para determinar el efecto del frío en la inestabilidad de los microtúbulos inducida por los compuestos a probar. La lectura de absorbancia al tiempo cero se restó de las lecturas subsecuentes para cada pozo (Δ absorbancia)⁴². Los ensayos de polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura se realizaron por triplicado. Los resultados se graficaron con el programa Excel 2013, los puntos de las gráficas muestran la desviación estándar de las lecturas para cada derivado evaluado.

8.8 Ensayo de la digestión con tripsina a la tubulina sin modificar y modificada con metilenciclohexadienona (17)

Los análisis correspondientes a los experimentos de unión de la metilenciclohexadienona (17) a la tubulina se realizaron en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. El derivado 17 se disolvió en DMSO y se colocó en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y de media área, en alícuota de 10 μ L de una concentración tal que permitiese tener una concentración final de 100 μ M. Por otro lado, se preparó una solución de tubulina de cerebro bovino de >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E.U.A.) manteniéndola siempre a 0 °C. Para preparar la solución, la tubulina se descongeló y se disolvió la cantidad necesaria del buffer preparado en la sección anterior (8.7) para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL. La solución de tubulina a 0 °C se agregó, en alícuotas de 100 μ L, al pozo con el derivado 17. Se procedió a incubar a la tubulina-GTP sin y con la metilenciclohexadienona (17) a 37 °C durante 1 h. Tras la incubación, se precipitaron 100 μ g de tubulina modificada y sin modificar, agregando 6 volúmenes de acetona fría por cada volumen de muestra y dejando en reposo a -20 °C durante 12 h. Al día siguiente, se sedimentaron las muestras de proteína en una centrífuga Beckman Coulter AllegraTm 64R

con un rotor F2402H, a 3000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró con el cuidado de no remover el pellet; éste último, se secó con una corriente de nitrógeno y se resuspendió en 50 µL de NH₄HCO₃ a 50 mM. Posteriormente, se agregó un equivalente del agente reductor ditionitrotol (Sigma-Aldrich) a una concentración 10 mM en NH₄HCO₃ 100 mM y se incubó a 56 °C por 45 minutos. Después se adicionó como agente alquilante de los puentes de disulfuro, dos equivalentes de iodoacetamida 50 mM (Sigma-Aldrich) en NH₄HCO₃ 100 mM, se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos protegido de la luz. Se realizó la digestión en solución usando 1 µg de tripsina grado proteómica (Sigma-Aldrich) la mezcla se incubó en un baño de agua, a 37 °C por 12 h. Los péptidos tripticos resultantes se concentraron con una corriente de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 15-20 µL y desalados usando puntas ZipTips C18 de Millipore (no de catálogo ZTC18S096). Los péptidos eluidos se concentraron hasta un volumen aproximado de 2 µL en un concentrador de vacío para DNA DNA1200P ThermoSavant y se cocrystalizaron en una placa de acero inoxidable con ayuda de una solución de 5 mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en 50% de acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente, los spots generados se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 plus de ABSciex (Foster City, CA). Cada espectro de MS se adquirió mediante un acumulado de 1000 disparos en un rango de masas de 850-4000 Da con una intensidad de láser de 3100. Se programó seleccionar los 100 precursores más intensos con una mínima relación señal-ruido (S/N) de 20. Los espectros MS/MS de los precursores seleccionados se fragmentaron activando la celda de colisión CID (Collision Induced Dissociation), y se adquirieron mediante un acumulado de 3000 disparos con una intensidad de láser de 3800. Los espectros de MS/MS generados se compararon utilizando el software Protein Pilot v. 2.0.1 (AB SCIEX, Foster City, CA) contra una base de datos de *Bos taurus* (descargada de Uniprot) usando el algoritmo Paragon. Los parámetros de búsqueda fueron: modificación en las cisteínas por iodoacetamida (carbamidometilcisteína), enzima de corte tripsina y todas las modificaciones biológicas establecidas por el algoritmo. El umbral de detección de la proteína (Unused Score) fue establecida en 1.3 para adquirir un 95% de confianza. Las proteínas identificadas se agruparon de acuerdo algoritmo ProGroup para minimizar redundancias.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 703-723.
2. Sepúlveda Jiménez, G.; Porta Docoing, H.; Rocha Soasa, M. La participación de los metabolitos en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.*, **2003**, *21*, 355-363.
3. Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.*, **2005**, *78*, 431-441.
4. Gutiérrez Ravelo, A.; Estevéz Braun A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.*, **2009**, *103*, 409-419.
5. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 311-335.
6. Martel, C.; Ferlay, J.; Franceschi, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.*, **2012**, *13*, 607-615.
7. Información disponible en: [http:// www.oms.org](http://www.oms.org)
8. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**, *144*, 646-674.
9. Nogueira, V.; Nissim, H. Molecular pathways: Reactive oxygen especies homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2013**, *19*, 4309-4314.

10. Shin, S. Y.; Lee, J. M.; Lee, M. S.; Koh, D.; Jung, H.; Lim, Y.; Lee, Y. H. Targeting cancer cells via the reactive oxygen species-mediated unfolded protein response with a novel synthetic polyphenol conjugate. *Clin. Cancer Res.*, **2014**, *20*, 4302-4313.
11. Gerber, D. E. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am. Fam. Physician*, **2008**, *77*, 311-319.
12. Mukhtar, E.; Adhami, V. M.; Mukhtar, H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, **2014**, *13*, 275-284.
13. Nogales, E.; Wolf, S.; Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, **1998**, *391*, 199-203.
14. Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature*, **2004**, *4*, 253-265.
15. Holzbaur, E. L.; Scherer, S. S. Microtubules, axonal transport, and neuropathy. *N. Engl. J. Med.*, **2011**, *365*, 2330-2332.
16. Valiron, O.; Caudron, N.; Job D. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 2069-2084.
17. Zhou, J.; Giannakakou, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **2005**, *5*, 56-71.
18. Wilson, L.; Jordan, M. A. Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chem. Biol.*, **1995**, *2*, 569-573.
19. Checchil, P. M.; Nettles, J. H.; Zhou, J.; Snyder, J. P.; Joshi, H. C. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol.Sci.*, **2003**, *24*, 361-365.

20. Liu, S. J.; Liao, Z. X.; Liu, C.; Yao, G. Y.; Wang, H. S. A new triterpenoid and eremophilanolide from *Ligularia przewalskii*. *Phytochem. Lett.*, **2014**, *9*, 11-16.
21. Chen, J.J.; Chen, C.J.; Yao, X.J.; Jin, X. J.; Gao, K. Eremophilane-type sesquiterpenoids with diverse skeletons from *Ligularia sagittal*. *J. Nat. Prod.*, **2014**, *77*, 1329–1335.
22. Wang, Q.; Mu, Q.; Shibano, M.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H.; Chen, D. F. Eremophilane sesquiterpenes from *Ligularia macrophylla*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1259-1262.
23. Beattie, K. D.; Waterman, P. G.; Forster, P I.; Thompson, D. R.; Leach, D. N. Chemical composition and cytotoxicity of oils and eremophilanes derived from various parts of *Eremophila mitchellii* Benth. (Myoporaceae). *Phytochem.*, **2011**, *72*, 400–408.
24. Romo, J.; Joseph-Nathan, P. The constituents of *Cacalea decomposita* A. Gray, *Tetrahedron*, **1964**, *20*, 2331-2337.
25. Joseph-Nathan, P.; Morales, J. J.; Romo, J. Contribution to the chemistry of cacalol, *Tetrahedron*, **1966**, *22*, 301-307.
26. Shindo, K.; Kimura, M.; Iga, M. Potent antioxidative activity of cacalol, a sesquiterpene contained in *Cacalia delphiniifolia* Sleb et Zucc, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 1393-1394.
27. Ardila Fierro, K. J. Estudio de la transformación del cacalol en presencia de radicales libres. Tesis de Maestría en la especialidad de Farmacología del Cinvestav, México, D. F., **2011**.
28. Jimenez, E. M.; Chilpa, R. R.; Apan, R. T.; Lledias, F.; Hansberg, W., Arrieta, D.; Aguilar, F. J. Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *105*, 34-38.

29. Liu, W.; Shindo, K.; Watabe, M. Cacalol, a natural sesquiterpene, induces apoptosis in breast cancer cells by modulating Akt-SREBP-FAS signaling pathway. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2011**, *128*, 57-68.
30. Wan, P.; Brousmiche, D. W.; Chen, C. Z.; Cole, J.; Lukeman, M.; Xu, M. Quinone methide intermediates in organic photochemistry. *Pure Appl. Chem.*, **2001**, *73*, 529-534.
31. McCracken, P. G.; Bolton, J. L.; Thatcher, G. R. J. Covalent modification of proteins and peptides by the quinone methide from 2-tert-Butyl-4,6-dimethylphenol: Selectivity and reactivity with respect to competitive hydration. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 1820-1825.
32. Taljaard, J. H. Synthesis, properties and reactions of novel quinones methides. Tesis doctoral, Departamento de Química, Nelson Mandela Metropolitan University, Sudáfrica, **2007**.
33. Bolton, J. L.; Turnipseed, S. B.; Thompson, J. A. Influence of quinone methide reactivity on the alkylation of thiol and amino groups in proteins: studies utilizing amino acid and peptide models. *Chem. Biol. Interact.*, **1997**, *107*, 185-200.
34. Shelanski, M. J.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1973**, *70*, 765-768.
35. Reglamento de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM) del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales, del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), México, D. F., **2014**.
36. Wandosell, F.; Villanueva, N.; Serrano, L.; Ávila, J. Analysis of drug-tubulin interaction by trypsin cleavage: comparison for colchicine, podophyllotoxin, griseofulvin, vinblastine and taxol. *Comp. Biochem. Physiol.* **1986**, *85*, 635-638.

37. Mandelkow, E. M.; Herrmann, M.; Ruhl, U. Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies. *J. Mol. Biol.*, **1985**, *185*, 311-327.
38. Takashi, N.; Minoru, Y.; Osamu, N. Terminal proteomics: N- and C- terminal analyses for high-fidelity identification of proteins using MS. *Proteomics*, **2008**, *8*, 673-685.
39. Bantscheff, M.; Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J.; Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.*, **2007**, *389*, 1017–1031.
40. <http://www.pdb.org>
41. Andreu, J. M.; Timasheff, S. N. Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1982**, *79*, 6753-6756.
42. García-Gutiérrez, H. A. Obtención de nuevos derivados del verticilano estabilizadores de microtúbulos a partir de productos naturales del género *Bursera*. Tesis de Doctorado en la especialidad de Farmacología del Cinvestav, México, D. F., **2010**.

10. APÉNDICE. Espectros de ^{13}C del producto natural 16 y los derivados 17, 20, 21-23, espectros de masas de la metilenciclohexadienona (17), metilenciclohexadienona aromática (22) y acetato de cacalol aromático (23) y tablas de masas de los residuos de aminoácidos presentes en los péptidos

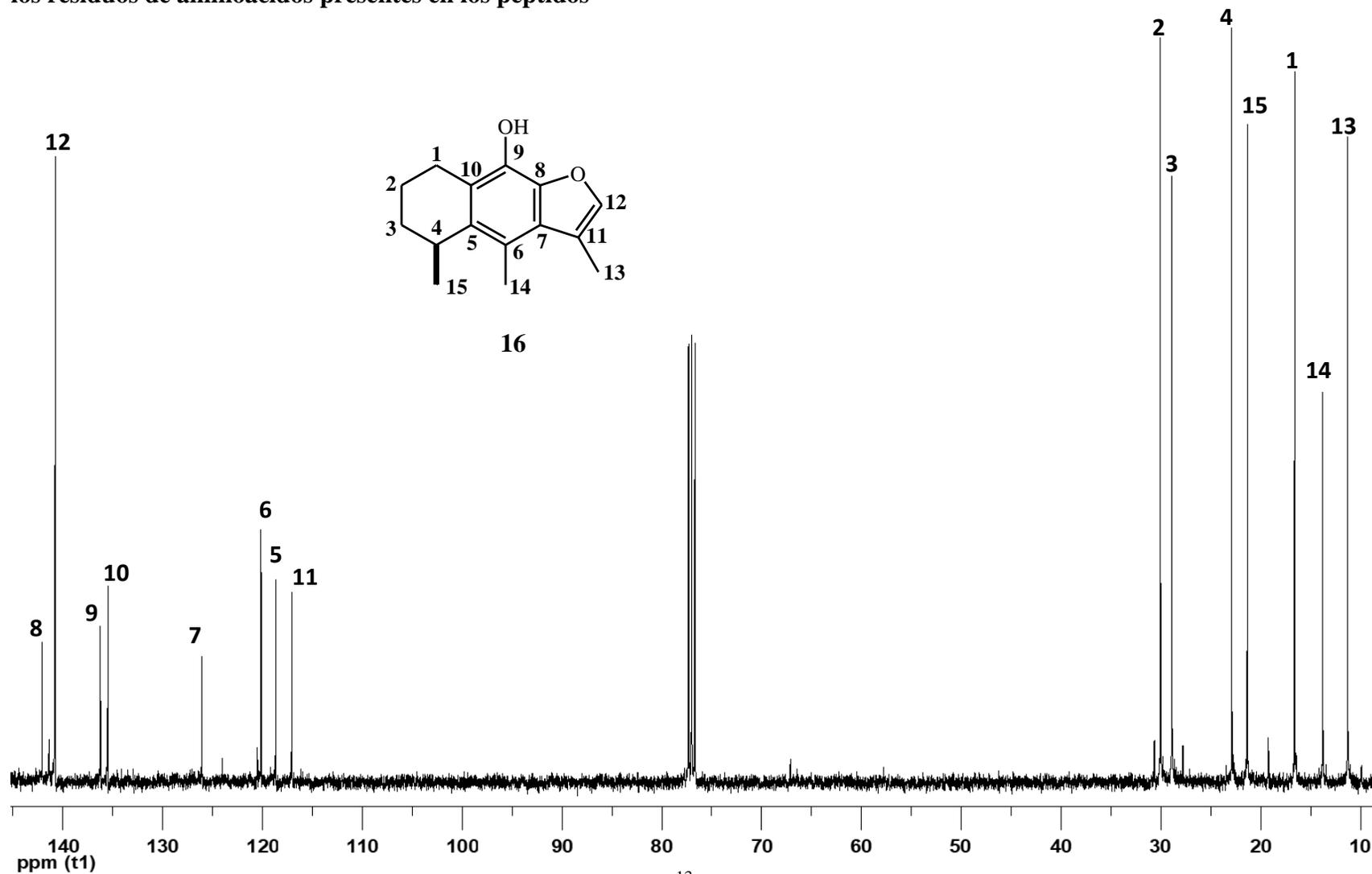


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del cacalol (16)

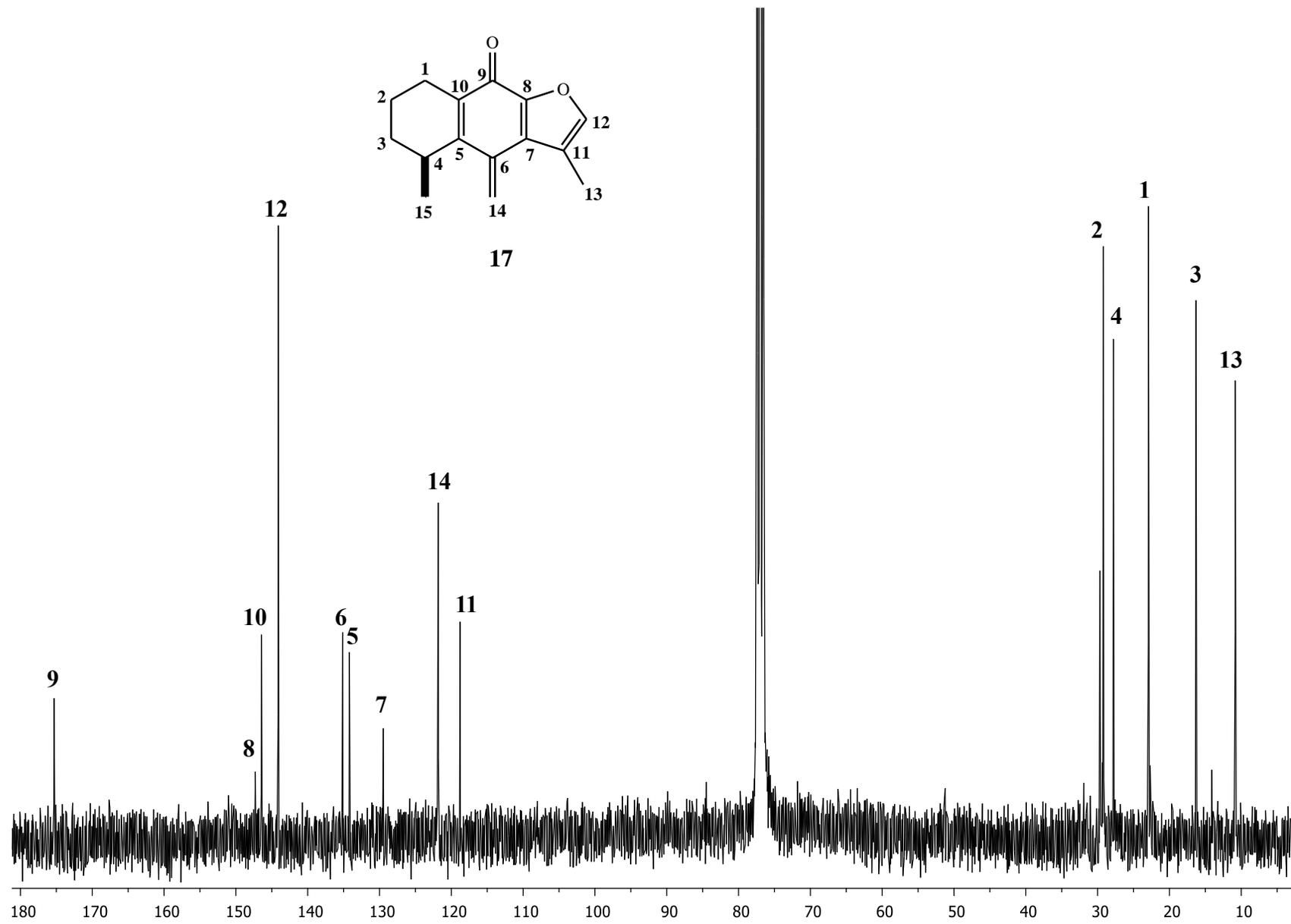
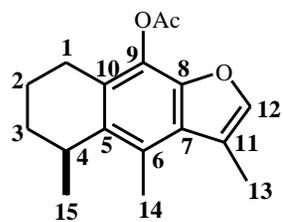


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz de la metilciclohexadienona (17)



20

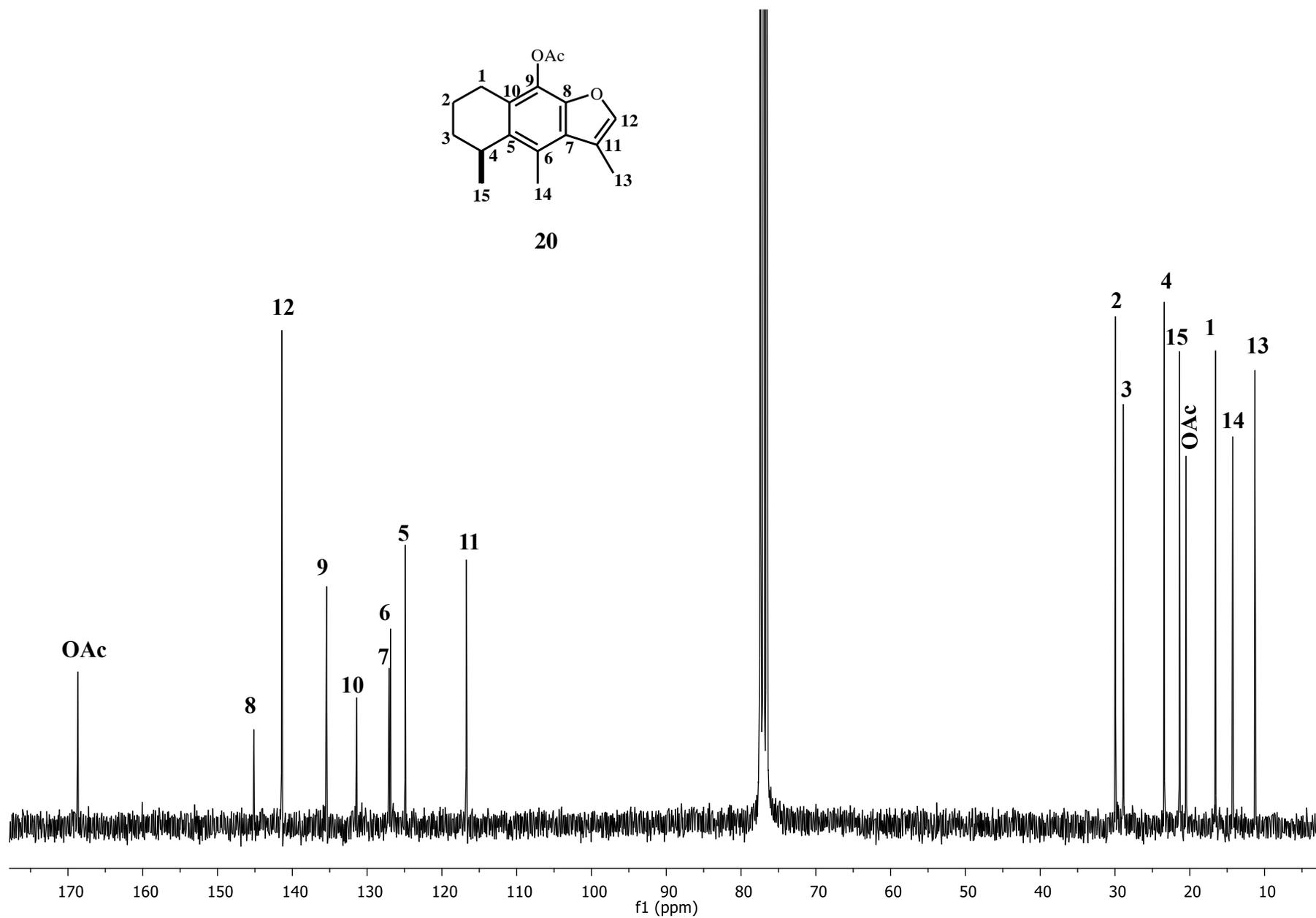


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del acetato de cacalol (20)

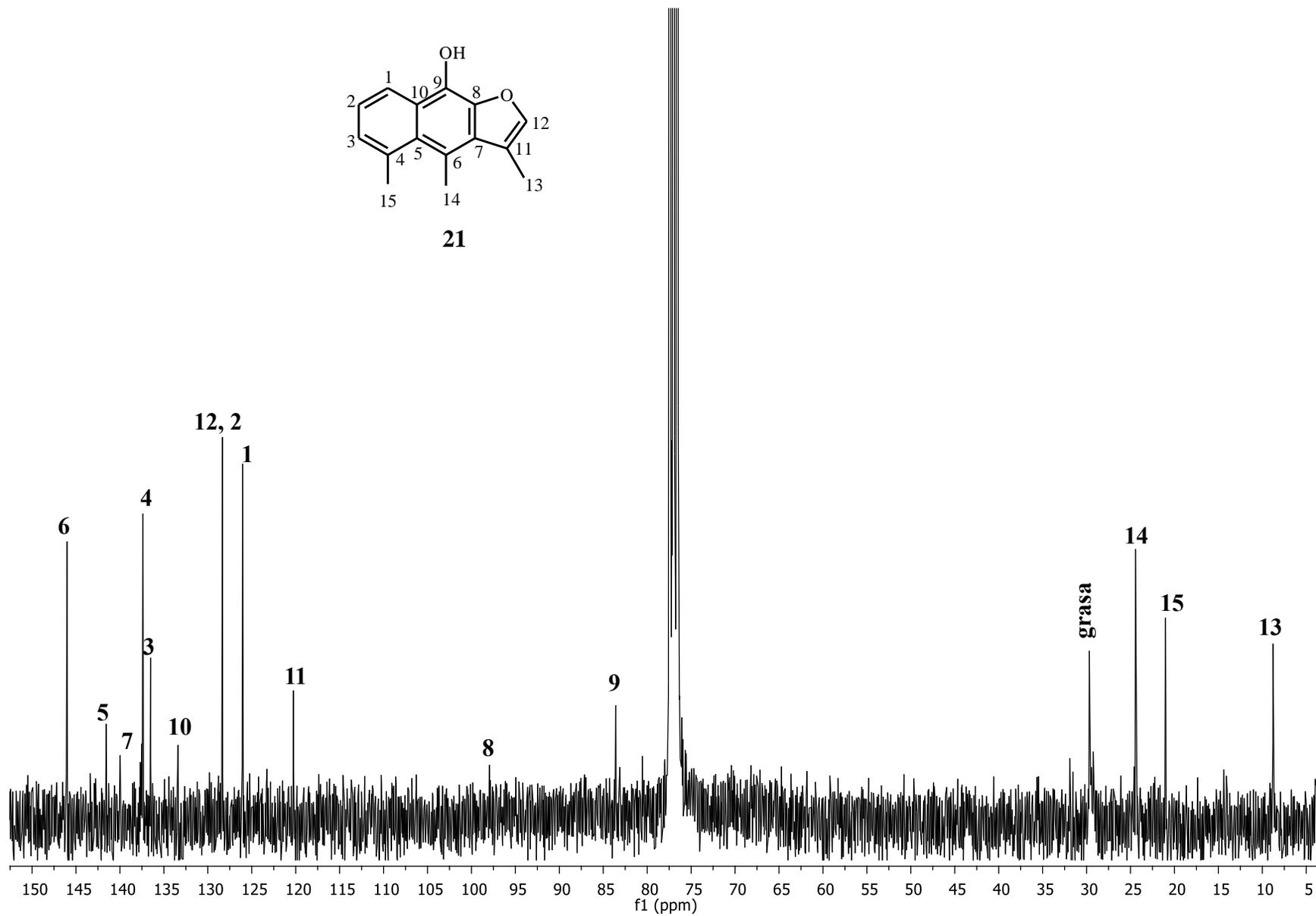
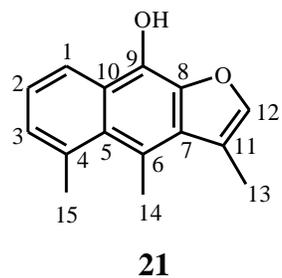


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del naftofuranol (**21**)

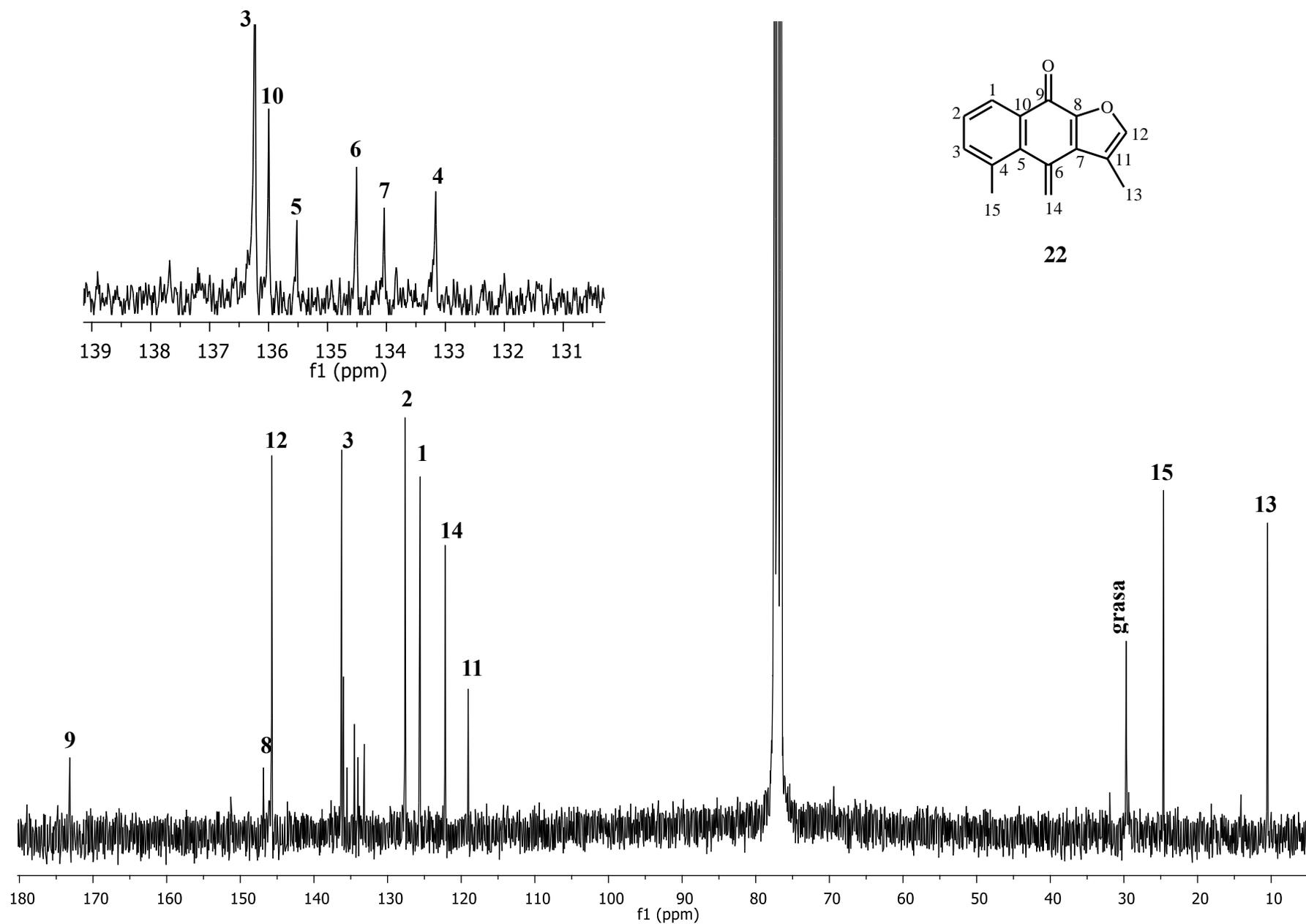


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz de la metilenciclohexadienona aromática (**22**)

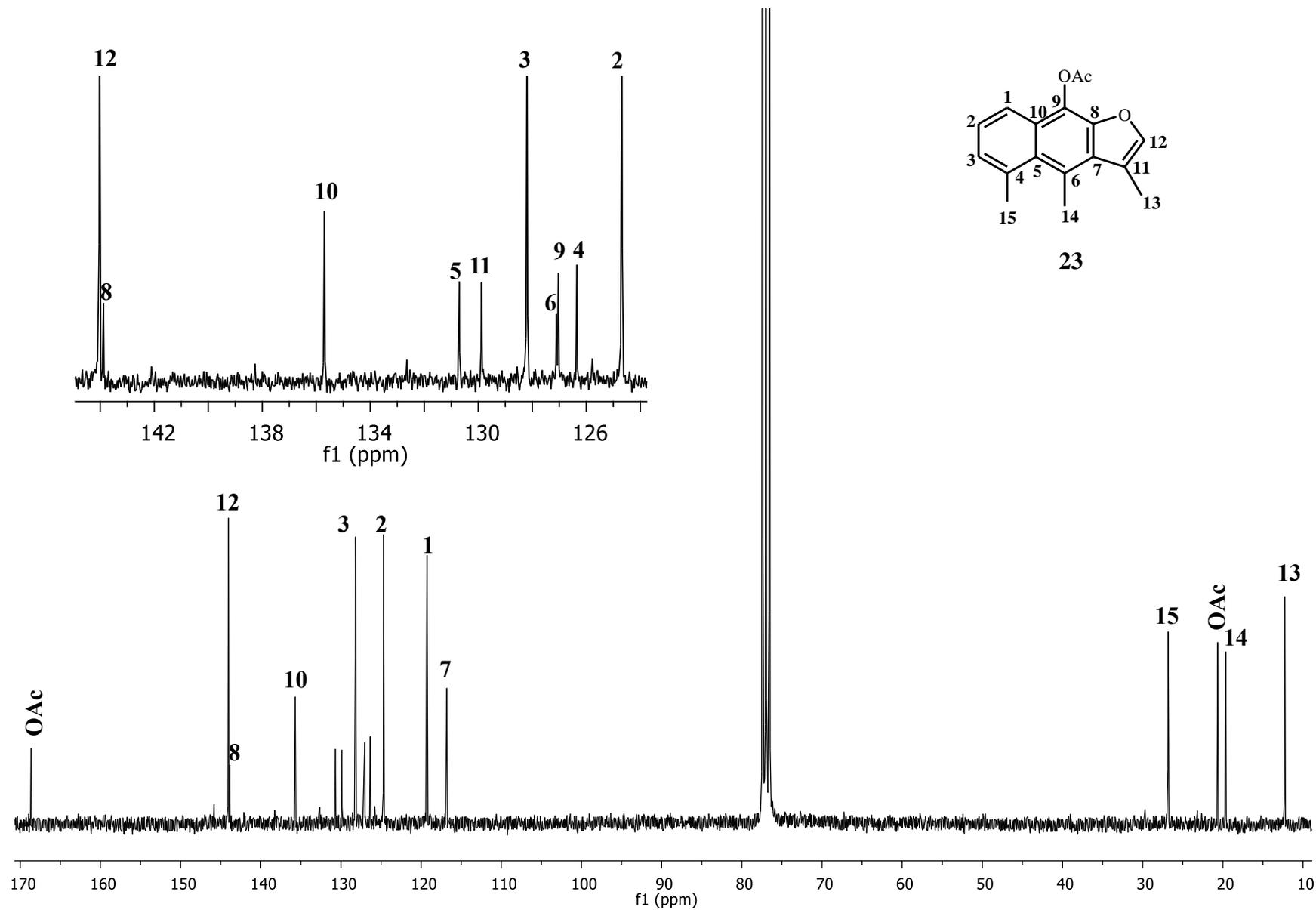


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del acetato de naftofuranol (23)

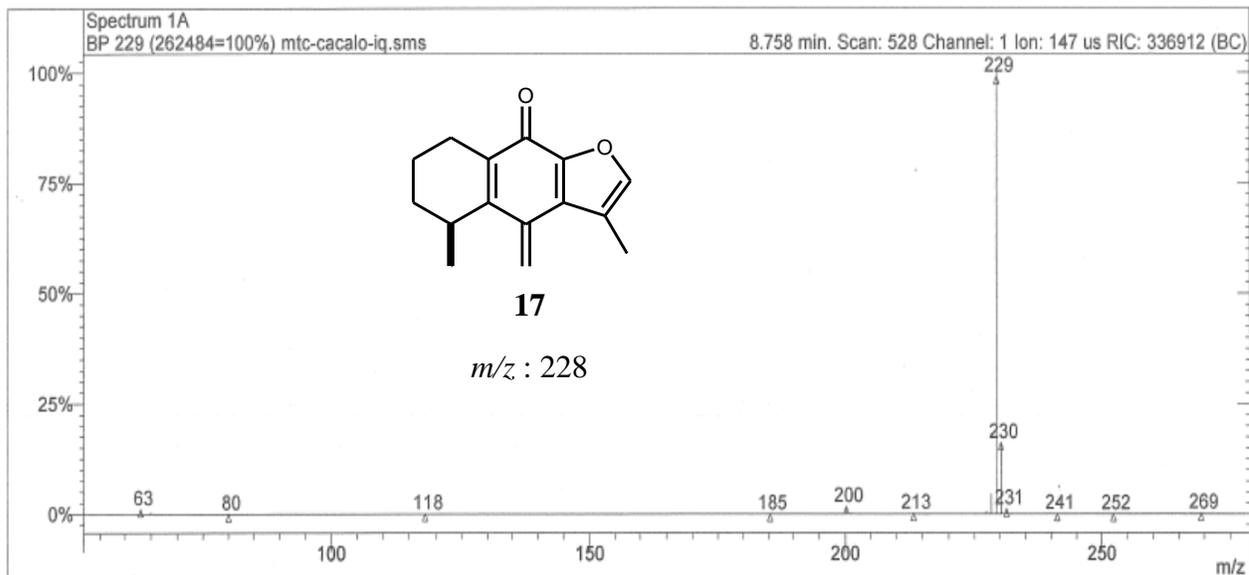


Figura 43. Espectro de masas de la metilenciclohexadienona (**17**)

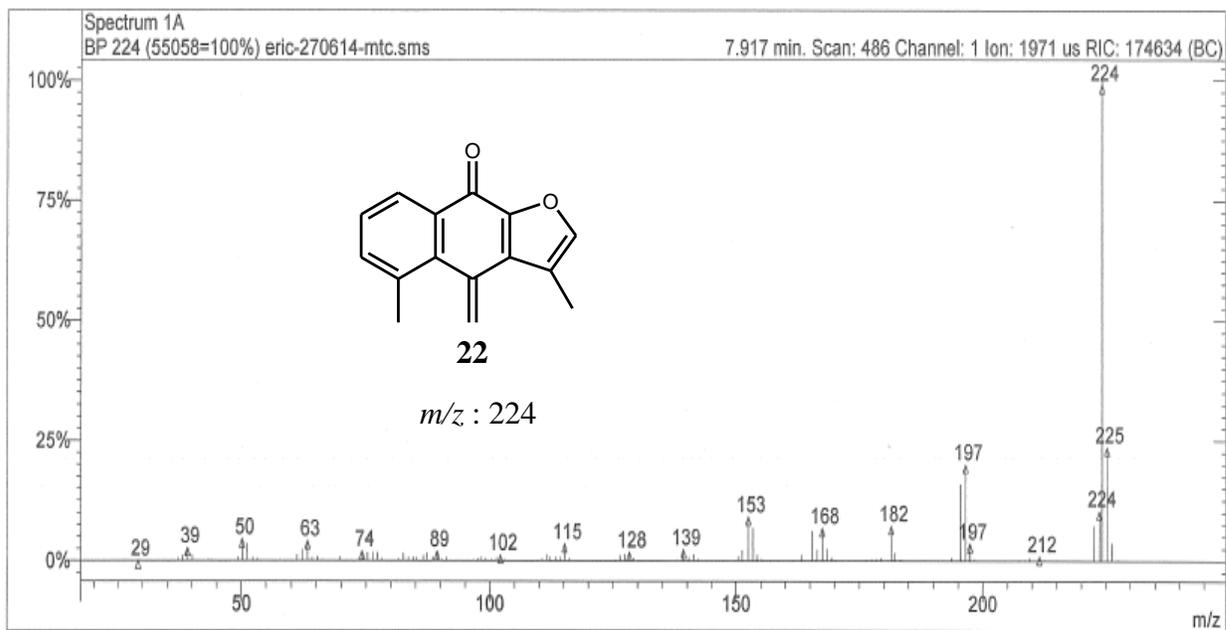


Figura 44. Espectro de masas de la metilenciclohexadienona aromática (**22**)

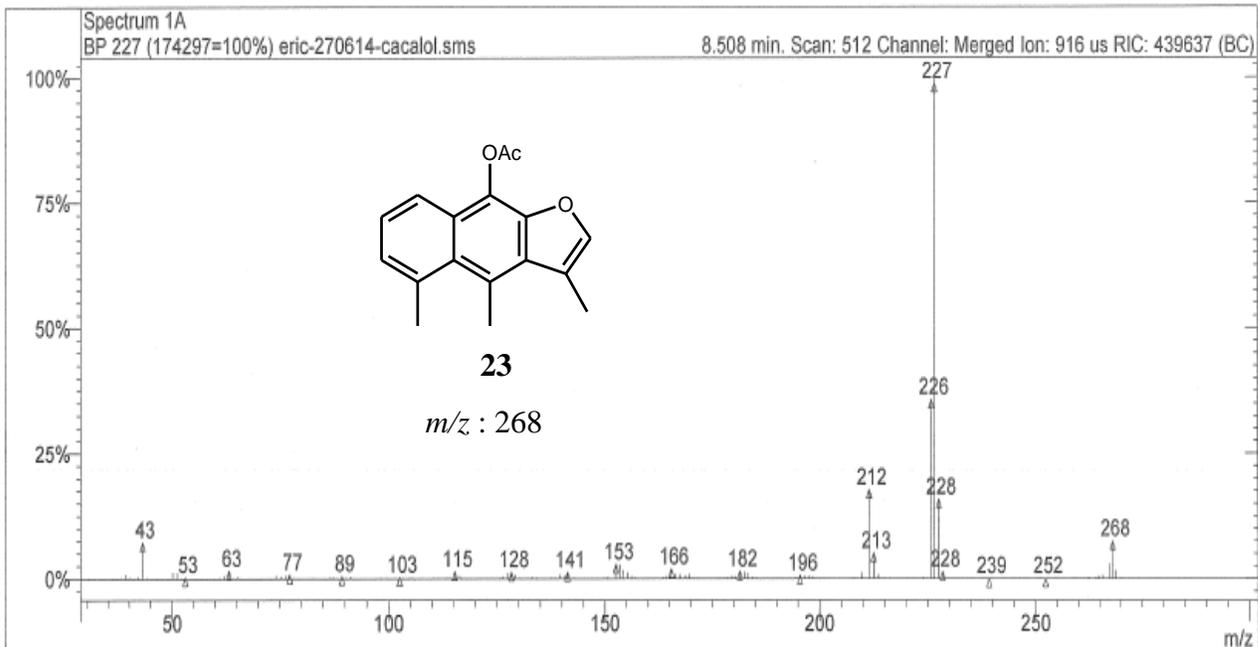


Figura 45. Espectro de masas del acetato de cacalol aromático (**23**)

Tabla 1. Peso molecular de los residuos de aminoácidos presentes en los péptidos

Aminoácido	Abreviatura	Peso molecular en péptidos
Alanina	A	71.04
Arginina	R	156.10
Ácido aspártico	D	115.03
Asparagina	N	114.04
Cisteína	C	103.03
Ácido glutámico	E	129.06
Glutamina	Q	128.06
Glicina	G	57.02
Histidina	H	137.06
Isoleucina	I	113.08
Leucina	L	113.08
Lisina	K	128.10
Metionina	M	131.04
Fenilalanina	F	147.06
Prolina	P	97.05
Serina	S	87.06
Treonina	T	101.05
Triptófano	W	186.06
Tirosina	Y	163.06
Valina	V	99.06