



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Estudio de derivados de productos naturales en su interacción con la
tubulina utilizando herramientas *in silico*”**

T E S I S

Que presenta

Q. C. EDGAR LÓPEZ LÓPEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de la Tesis:

Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

Dr. José Luis Medina Franco

Ciudad de México

Diciembre de 2021

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, Profesor del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y del Dr. José Luis Medina Franco, Profesor del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del Programa de Posgrado en Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional con una beca de inversión en el conocimiento, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 762342.

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mi madre **Teresa López y Izquierdo**, a mi padre **Francisco López León**, y mi hermana **Jocelyn López López**, por motivarme e inspirarme.

Han sido, son, y siempre serán mi más grande razón de ser.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el **Dr. Carlos M. Cerda García Rojas** y el **Dr. José L. Medina Franco**, por permitirme aprender de su forma de ver la ciencia, el mundo y la vida misma. Por generar un ambiente de trabajo que me ha permitido crecer de manera académica, profesional y personal. Gracias por su inmensa paciencia, compromiso y entusiasmo. Gracias por TODO.

A mi comité tutorial, el **Dr. Pablo Muriel de la Torre** y el **Dr. Francisco J. Camacho Arroyo** por sus valiosas aportaciones a este trabajo, sus consejos y su amabilidad.

A mis padres, por brindarme educación, cuidados, y sobre todo por regalarme la oportunidad de ir en la búsqueda de mis más grandes sueños. Por todas aquellas veces que me dijeron “si puedes”.

A mi hermana, por todas las veces que me cuidó, me abrazó y me hizo sentir que el mundo tenía sentido.

A mi novia, **Diana V. Avila Martínez**, por apoyarme en mis malos y peores momentos. Gracias por la paz que traes a mi cotidianidad.

A toda mi familia y amigos, mi vida es mejor cuando bailo, canto, o cuando me tomo una cerveza con alguno de ustedes.

ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Generalidades del sistema tubulina-microtúbulos	10
1.2 Relación entre el sistema tubulina-microtúbulos y el cáncer.....	11
1.3 Hechos epidemiológicos y socioeconómicos relacionados con el cáncer.....	12
1.4 Resumen de las estrategias anticancerígenas actuales	12
1.5 Generalidades del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos.....	14
1.6 Generalidades del diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).....	15
1.6.1 Diseño basado en el ligando.....	16
1.6.2 Diseño basado en la estructura de la diana biológica.....	17
1.6.3 Enfoque consenso.....	17
1.7 Técnicas comúnmente utilizadas como herramientas en el DIFAC	17
1.7.1 Cálculo de propiedades.....	18
1.7.2 Similitud química, molecular y biológica.....	18
1.7.3 Espacio químico	19
1.7.4 Acoplamiento molecular.....	21
1.7.5 Dinámica molecular.....	21
1.7.6 Modelo del farmacóforo.....	22
1.8 Productos naturales como agentes anticancerígenos.....	23
1.8.1 Productos naturales dirigidos a la tubulina	23
1.9 DIFAC inspirado en productos naturales	25
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Construcción de bases de datos	26
5.2. Espacio químico.....	27
5.3 Modelado de panoramas de actividad.....	27
5.4 Análisis de núcleos base.....	28

5.5 Gráficos de constelación.....	29
5.6 Modelado y acoplamiento molecular de los compuestos seleccionados	29
5.7 Modelado del farmacóforo	30
5.8 Cribado virtual	30
5.9 Dinámica molecular	30
5.10 Perfil ADMET <i>in silico</i>	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Construcción y curado de una base de datos basada en líneas celulares	32
6.2 Espacio químico.....	33
6.3 Panoramas de actividad	34
6.4 Gráfico de constelación (<i>constellation plot</i>).....	37
6.5 Construcción del modelo farmacofórico	38
6.6 Cribado virtual	39
6.7 Dinámica molecular	40
6.8 Cálculo de propiedades ADMET.....	42
6.9 Resumen de resultados.....	43
7. DISCUSIÓN.....	44
8. CONCLUSIONES.....	49
9. PERSPECTIVAS	50
10. BIBLIOGRAFÍA.....	51
11. ANEXOS.....	61

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Acantilados de actividad: Compuestos con alta similitud estructural y grandes e inesperados cambios en su actividad biológica.

Acoplamiento molecular (*docking*): Técnica que pertenece al área de diseño de fármacos basado en la diana biológica. Permite identificar posibles sitios y modos de unión de una molécula con su receptor correspondiente.

Andamio químico (*scaffold*): Porción central y representativa de la estructura de una molécula.

Bioinformática: Ciencia que estudia los datos bioquímicos y -ómicos utilizando métodos computacionales.

Cálculos de similitud: Técnica que pertenece al área de diseño de fármacos basada en el ligando. Permite identificar las características estructurales y químicas que un grupo (o un par) de compuestos tienen en común. De manera general, a mayor sea la similitud entre los compuestos, mayor será la probabilidad de que compartan la misma magnitud de alguna propiedad, por ejemplo, su actividad biológica.

Descriptor molecular: Característica química, fisicoquímica, biología, estructural, o cualquier otra, que permita explicar alguna propiedad que emerge de un compuesto químico.

Dinámica molecular: Técnica que pertenece al área de diseño de fármacos basado en la diana biológica. Permite estudiar, a lo largo del tiempo, posibles mecanismos de unión de una molécula con su respectiva diana. La dinámica molecular contempla aspectos fisicoquímicos y termodinámicos con el objetivo de reproducir con mayor fidelidad un entorno biológico controlado.

Diseño basado en consenso: Reúne al diseño de fármacos basado en el ligando y en la diana biológica.

Diseño basado en el ligando: Enfoque del diseño de fármacos que utiliza información generada a partir de únicamente de la estructura química de los compuestos.

Diseño basado en la diana biológica: Enfoque del diseño de fármacos que utiliza información de la interacción generada entre el complejo ligando-diana biológica.

Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC): Área de la química medicinal que se encarga del diseño, la propuesta y la generación de nuevas moléculas bioactivas.

Espacio químico: Es un plano cartesiano “n” dimensional que condensa “n” cantidad de descriptores moleculares.

Farmacóforo: Es un ensamble de características electrónicas y estéricas que son necesarias para una óptima interacción entre ligandos y una determinada diana biológica.

Informática biomédica: Ciencia que estudia los datos clínicos utilizando métodos computacionales.

Panorama de actividad: Es un subtipo de espacio químico cuyo objetivo es representar gráficamente la relación existente entre la similitud de los compuestos y su actividad (o actividades) biológica(s) asociada(s).

Quimioinformática: Ciencia que estudia datos químicos y fisicoquímicos utilizando métodos computacionales.

Relaciones estructura actividad cuantitativa (QSAR): Método que permite predecir una propiedad “x” de alguna molécula a partir de sus propios “y” datos.

ABREVIATURAS

AC: *Activity cliff*

ADMET: Absorción, distribución, metabolismo excreción y toxicidad

DIFAC: Diseño de fármacos asistido por computadora

GDP: Guanosina difosfato (GDP)

GTP: Guanosina-5-trifosfato

MAPs: Proteínas que se asocian a microtúbulos

MOE: *Molecular operating environment*

MTs: Microtúbulos

PCA: Cálculo de componentes principales

pIC_{50} : Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50

PNs: Productos naturales

QSAR: Estudios de relación estructura actividad cuantitativos

RECAP: Reglas retrosintéticas

SALI: *Structure activity landscape index*

SAS: Similitud estructura actividad

SH: *Scaffold hops*

TPSA: Área topológica superficial polar

t-SNE: Incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

La modificación de la dinámica del sistema tubulina-microtúbulos ha permitido generar estrategias efectivas para tratar diferentes tipos de cáncer. En la clínica, una gran cantidad de datos sobre inhibidores del sistema tubulina-microtúbulos respaldan a este blanco farmacológico como un objetivo validado para tratamientos terapéuticos. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores reportados hasta ahora se han desarrollado alrededor de andamios químicos (*scaffolds*) comunes que cubren una región estrecha del espacio químico con una innovación estructural limitada. Este estudio tiene como objetivo desarrollar un protocolo de cribado virtual de productos naturales con un enfoque consenso (diseño basado en el ligando + diseño basado en la estructura de la diana biológica) cuya función es identificar nuevos inhibidores potenciales del sistema tubulina-microtúbulos. Para tal fin, se empleó una estrategia combinada de cálculos de similitud molecular, acoplamiento y dinámica molecular, así como cálculos de propiedades ADMET *in silico*, lo que permitió seleccionar un grupo de compuestos para llevar a cabo evaluaciones biológicas futuras con una mayor probabilidad de éxito. Los compuestos seleccionados derivan del dihidroresveratrol, de la parvifolina, del benzoato de bencilo y de la centaureidina y en general poseen anillos aromáticos y grupos metoxilo e hidroxilo.

ABSTRACT

Modification of the tubulin-microtubule system dynamics has generated effective strategies for developing different treatments for cancer. A huge amount of clinical data about inhibitors of the tubulin-microtubule system has supported and validated the studies on this pharmacological target. However, a high proportion of tubulin-microtubule inhibitors has been developed from representative and common scaffolds that cover a small region of the chemical space with limited structural innovation. The main goal of this study is to develop a consensus virtual screening protocol for natural products (ligand- and structure-based drug design method) useful for the identification of new potential inhibitors of the tubulin-microtubule system. A combined strategy has been used that involves molecular similarity, docking, and molecular dynamics, as well as *in silico* ADMET prediction, which allowed the selection of a group of compounds for future biological tests with a high probability of success. The selected compounds are dihydroresveratrol, parvifoline, benzyl benzoate, and centaureidine derivatives and, in general, contain aromatic rings as well as methoxy and hydroxy groups.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del sistema tubulina-microtúbulos

Los microtúbulos (MTs) son una serie de componentes filamentosos que estructuran parte del citoesqueleto de las células eucariotas, cuyas funciones esenciales radican en el control del tráfico vesicular, división y morfología celular.¹ Estas estructuras están compuestas principalmente por heterodímeros de α - y β -tubulina.

Las α - y β -tubulinas, curiosamente, se originan de genes independientes que han sido filogenéticamente conservados. No obstante, existe una gran diversidad de variantes de *splicing* y modificaciones postraduccionales que les otorgan la capacidad de interactuar con un gran repertorio de proteínas que se asocian a microtúbulos (MAPs).²

Los MTs son estructuras cilíndricas con un diámetro aproximado de 25 nm de ancho y su longitud puede variar entre decenas a millones de nanómetros. A diferencia de otros polímeros, los MTs son estructuras bastante dinámicas que sufren cambios bruscos de un estado polimerizado a otro despolimerizado (catástrofe), o a la inversa (rescate). Esto genera una rápida adaptabilidad ante los diferentes eventos celulares en los que participan.³

Ambas subunidades de tubulina (α y β) tienen su respectivo sitio de unión a guanosina-5-trifosfato (GTP). No obstante, sólo la subunidad β es capaz de hidrolizar este sustrato, convirtiéndolo a guanosina difosfato (GDP). Esto último contribuye en la desestabilización de la estructura cuaternaria de los MTs, lo que eventualmente culmina en la “catástrofe” del MT. En contraste, un extremo del MT cuyos heterodímeros (α y β) son ricos en GTP (cap) promueven el “rescate” del mismo. Cabe resaltar que estos fenómenos moleculares suceden secuencialmente, de manera dinámica y temporalmente organizada, además de responder efectivamente ante cascadas de señalización y, por tanto, a los estímulos extra e intracelulares.⁴

Por otro lado, y de manera general, los compuestos químicos que interactúan con la tubulina se clasifican en dos grandes grupos: agentes que promueven su polimerización y agentes que la inhiben. De igual manera, los compuestos que interactúan con los MTs se clasifican en agentes estabilizadores y agentes desestabilizadores. Es decir, existe una gran diversidad estructural de compuestos de origen natural con estos efectos, y dentro de los más comunes destacan los alcaloides derivados de la vinca, los taxanos, los derivados de la colchicina, derivados

de la pironetina y los derivados de la laulimalida. Cada uno de estos grupos de compuestos posee mayor afinidad a cierto sitio de unión en la tubulina (Figura 1),⁵ de ahí la complejidad de modelar o diseñar racionalmente nuevos agentes que interactúen en el sistema tubulina-MTs.

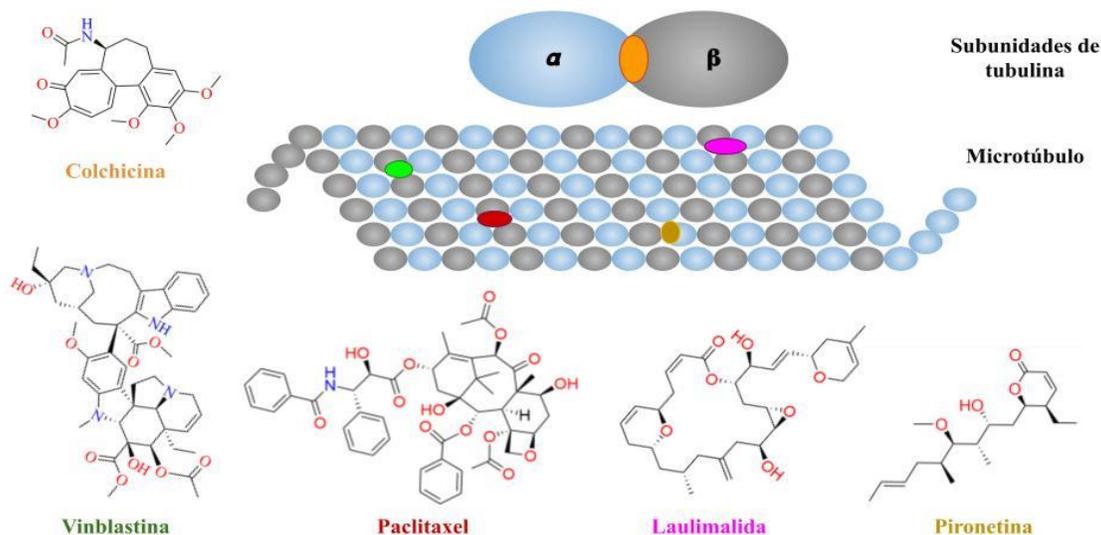


Figura 1. Sitios de unión en los microtúbulos y moduladores representativos. Adaptada de López-López *et al.* 2021.⁵

1.2 Relación entre el sistema tubulina-microtúbulos y el cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, o *WHO* por sus siglas en inglés) el cáncer se define como un conjunto de enfermedades localizadas en cualquier parte del organismo que se caracterizan por crecimientos celulares descontrolados y desorganizados que, además, adquieren la capacidad de invadir otros tejidos u órganos.⁶

Dentro de las características esenciales del cáncer, destacan la adquisición de ventajas evolutivas que transforman las células “sanas” en células “fenotípicamente malignas”. Por ejemplo, adquieren respuestas alteradas ante el estrés, fomentan la vascularización del tejido, adquieren capacidad metastásica (migración e invasión), sufren modificaciones en su metabolismo energético (mitocondrial), generan microambientes proinflamatorios e inmunomodulan su entorno generando evasión de la respuesta inmune.⁷ En este sentido, el “control” de la dinámica de los

MTs (sección 1.1) permite elaborar estrategias anticancerígenas efectivas. Un ejemplo claro de estas estrategias es la interrupción (o arresto) de los usos mitóticos en la fase G₂/M del ciclo celular.

8

1.3 Hechos epidemiológicos y socioeconómicos relacionados con el cáncer

De manera general, la OMS refiere que en 2018 el cáncer constituyó la segunda causa de muerte en el mundo. Además, se estima que al menos 1 de cada 6 personas mueren a causa de este tipo de padecimientos. Se sabe que, de las muertes reportadas, alrededor del 70% radican en países de ingresos bajos y medios. Todo lo anterior, genera un impacto económico cercano a \$1.16 trillones de dólares anuales, según estimaciones de la misma OMS (durante el año 2010).⁹ Particularmente en México, la tasa de mortalidad por cáncer sigue en un aumento sostenido siendo los cánceres de próstata, mama, cervicouterino, colorrectal y hepático los que más se presentan en nuestra población.¹⁰

1.4 Resumen de las estrategias anticancerígenas actuales

Afortunadamente, existe un gran repertorio de alternativas terapéuticas que actualmente están disponibles para uso clínico en los distintos tipos de cáncer, y se pueden clasificar de acuerdo con sus blancos moleculares en: antimetabolitos, agentes dirigidos al DNA, antimitóticos y anticuerpos monoclonales dirigidos a tumores (Tabla 1).¹¹

Como se resume en la Tabla 1, existe una gran diversidad de estrategias y moléculas capaces de tratar el cáncer. Sin embargo, es necesario puntualizar que existen diferencias importantes en los orígenes, eventos bioquímicos y celulares entre los distintos tipos de células cancerígenas. No obstante, los compuestos anticancerígenos también afectan mecanismos replicativos y de supervivencia en células sanas. Por esta razón, prevalecen los efectos adversos asociados a las terapias anticancerígenas. En este sentido, el diseño racional de fármacos y el uso de los nuevos conocimientos y las nuevas tecnologías podrían mejorar los resultados clínicos que hasta ahora se han obtenido.

Tabla 1. Ejemplos representativos de fármacos anticancerígenos. Adaptada de Anderson *et al.* 2009.¹¹

Clasificación según su blanco molecular	Ejemplos representativos	Mecanismo de acción	Evento biológico
Antimetabolitos	Metotrexato	Inhibición de la dihidrofolato reductasa	Enzima necesaria para la síntesis del DNA
	5-Fluoroxacilo	Inhibición de la timidilato sintasa	Enzima necesaria para la síntesis del DNA
Fármacos dirigidos al DNA	Daunomicina y Doxorubicina	Intercalador de unión no covalente con el DNA	Inhibe la replicación y transcripción del DNA
	Trabectedina	Agglutinante del surco menor del DNA	Promueven la apoptosis celular
	Mostazas nitrogenadas, aziridinas, metan-sulfonatos, nitrosoureas, triazenos, metilhidrazinas, agentes del platino	Alquilantes del DNA	Alquilación y fragmentación del DNA
Antimitóticos	Derivados de la vinca, colchicina, pironetina, taxol laulimalida	Interacción con los microtúbulos y la tubulina	Arresto del ciclo celular y apoptosis
Anticuerpos monoclonales	Trastuzumab	Unión selectiva a HER-2 (biomarcador de cáncer de mama)	Detención del ciclo celular, regulación negativa de la angiogénesis e inhibición de los mecanismos de reparación del ADN
	Bevacizumab	Unión selectiva a VEGF	Bloqueo de la cascada de señalización angiogénica

1.5 Generalidades del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos

En general, el proceso de descubrir fármacos consta de cuatro principales fases (Figura 2): (1) la fase de descubrimiento, en la que se identifica una posible diana molecular de interés, con la subsecuente identificación de moléculas activas contra esta diana (*hits*); (2) la fase de desarrollo, en la que las moléculas previamente identificadas se optimizan (*leads*) utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Es en esta fase donde se incluyen estudios preclínicos y clínicos (en sus diferentes subfases I, II y III); (3) la fase de aprobación y comercialización; (4) y, finalmente, la fase de farmacovigilancia en la que se analizan los posibles efectos adversos asociados al uso clínico del nuevo fármaco.¹²

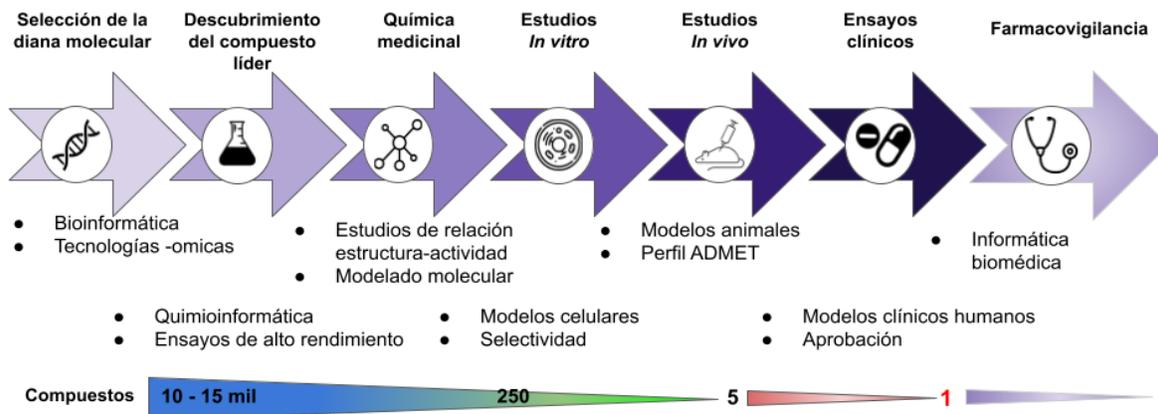


Figura 2. Panorama general de un flujo de trabajo convencional en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Adaptada de López-López *et al.* 2020.¹²

De manera general, y en proporciones de alrededor 10 mil a 15 mil compuestos (*hits*) que se analizan en este proceso, solo cinco de ellos tienen potencial para ser formulados y evaluados como posibles fármacos. Eventualmente sólo uno de ellos será aprobado para su uso clínico. Todo este proceso tiene una duración promedio de 15 años, con un costo de 3.4 millones de dólares sólo por las fases preclínicas, el cual se incrementa de 8.6 a 21.4 millones de dólares respectivamente en las fases clínicas II y III.¹³

1.6 Generalidades del diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

El diseño de fármacos asistido por computador (DIFAC o *CADD*, por sus siglas en inglés) tiene un rol crucial en el proceso de descubrir y desarrollar nuevos fármacos, pues uno de sus principales objetivos es filtrar, seleccionar y proponer compuestos novedosos para su futura síntesis y evaluación biológica. Este filtro cumple la función de optimizar los costos y tiempos involucrados en este proceso. Además, el enfoque DIFAC también facilita el reposicionamiento de fármacos aprobados, dándoles un uso terapéutico adicional al que fueron concebidos originalmente. En este sentido, el DIFAC se define como un enfoque que utiliza distintas herramientas informáticas para resolver problemas complejos en el área farmacéutica.¹⁴

El enfoque DIFAC recopila, organiza y analiza datos, que se convierten en información procesable, para posteriormente ser verificada en sistemas biológicos o no biológicos, con lo que logra generar nuevos conocimientos. Como se ilustra en la Figura 3 el enfoque DIFAC consta básicamente de tres disciplinas que se retroalimentan mutuamente: la informática biomédica, la bioinformática y la quimioinformática. Dado que las tres disciplinas principales del DIFAC utilizan métodos y tecnologías similares, es importante no confundirlas. Como se muestra en la Tabla 2 existen claras diferencias entre éstas.

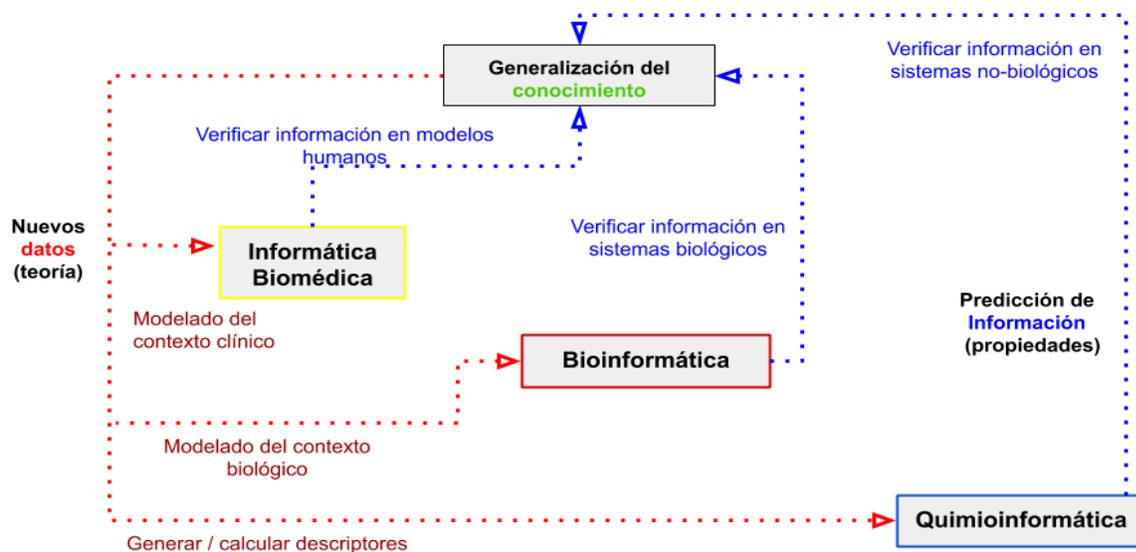


Figura 3. Interrelación entre informática biomédica, bioinformática y quimioinformática. Adaptada de López-López *et al.* 2021.¹⁵

Por otro lado, en el DIFAC existen diferentes métodos para resolver distintos tipos de retos farmacológicos. Por ejemplo, el diseño de fármacos basado en el ligando, en la diana biológica y el enfoque consenso.

Tabla 2. Comparación de técnicas y conceptos entre las distintas disciplinas del DIFAC. Adaptada de López-López *et al.* 2021.¹⁵

Característica	Bioinformática	Quimioinformática	Informática biomédica
Tipo de datos procesados	Macromoléculas y genes	Moléculas pequeñas y sus propiedades	Datos clínicos
Representación de los datos	Secuencias y estructuras	Huellas digitales moleculares, descriptores químicos	Patrones clínicos y no clínicos
Ejemplos de estudios	*Análisis de secuencias *Alineamiento y modelado de proteínas *Análisis evolutivos	* Librerías químicas * Análisis de diversidad * Predicción de propiedades y actividad * Determinación de estructuras químicas	* Bancos de datos clínicos * Predicción, pronóstico y diagnóstico clínico * Farmacovigilancia
Conceptos clave	* Homología * Alineamiento	* Espacio químico * Similitud molecular	* Análisis documental y de imágenes
Ejemplos de conceptos compartidos entre disciplinas	* Bases de datos * Visualización de datos	* Minería de datos * Interacción entre proteínas y ligandos	

1.6.1 Diseño basado en el ligando

Estos métodos están basados en el uso de información de las estructuras químicas de los ligandos a los que se les conoce su actividad biológica. Su principal objetivo es identificar nuevos compuestos bioactivos o proponer cambios estructurales que podrían mejorar la actividad de los ya existentes. Algunos ejemplos típicos de estos métodos son la aplicación de técnicas que permiten la búsqueda por similitud molecular, el cálculo de propiedades y la predicción de actividad (estudios de relación estructura actividad cuantitativos o *QSAR*, por sus siglas en inglés), así como el análisis del espacio químico (secciones 1.7.1 a 1.7.3).¹⁶

1.6.2 Diseño basado en la estructura de la diana biológica

Los métodos basados en la estructura dependen de la información tridimensional de la diana biológica. Ejemplos representativos de estos métodos son el uso de técnicas de acoplamiento molecular (*docking*) y dinámica molecular (secciones 1.7.4 y 1.7.5). Algunas aplicaciones de estos métodos son la caracterización de sitios de unión, la elucidación de los mecanismos de acción de compuestos activos (a nivel molecular), así como el modelado de estudios cinéticos y termodinámicos.¹⁷

1.6.3 Enfoque consenso

Por otro lado, los métodos consenso (o también llamados híbridos) recopilan y utilizan la información obtenida por los métodos basados en el ligando y en la estructura de la diana biológica para obtener un conocimiento más integral del sistema en estudio. Un ejemplo, de éstos es la construcción de modelos del farmacóforo (sección 1.7.6). Estos métodos suelen utilizarse en marchas analíticas donde existen una gran cantidad de compuestos y/o dianas biológicas. De manera simultánea, se realizan estudios de relación estructura actividad (SAR por sus siglas en inglés), modelado molecular (acoplamiento molecular y/o dinámica molecular), además de predicción de propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) para cada compuesto, lo que permite filtrar una gran cantidad de candidatos de manera eficiente, y lo que a su vez eficientiza aún más los tiempos y costos durante las fases 1 y 2 del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (sección 1.5).¹⁸

1.7 Técnicas comúnmente utilizadas como herramientas en el DIFAC

Como se ha mencionado, en el DIFAC se utilizan diferentes disciplinas y enfoques para resolver los problemas farmacológicos y de química medicinal. En este sentido, es claro que también existe una gran diversidad de técnicas o herramientas que satisfacen de una mejor manera las necesidades de cada enfoque y/o disciplina. En las secciones subsecuentes (de la 1.7.1 a 1.7.6) se mencionan brevemente las técnicas más comúnmente utilizadas en el DIFAC.

1.7.1 Cálculo de propiedades

En general, estas herramientas utilizan bancos de datos de moléculas previamente reportadas, de las cuales se conocen sus propiedades físicas, químicas y de actividad biológica. Esto permite predecir o calcular estas mismas propiedades para las distintas moléculas en estudio. Algunas propiedades que se suelen calcular para el DIFAC son las que permiten analizar si las moléculas de interés cumplen con un perfil farmacológicamente deseable (*drug-like*), por ejemplo: *log P*, peso molecular, número de enlaces rotables o número de donadores y aceptores de hidrógeno. Aunque, adicionalmente suelen calcularse descriptores que analizan la esfericidad, complejidad y factibilidad sintética de las moléculas.

Existe un gran repertorio de herramientas libres y especializadas en el área farmacológica. Por ejemplo, existen programas de cómputo tales como el *DataWarrior* y servidores web como el *SwissADME* con interfaces interactivas que facilitan la predicción/cálculo y análisis de las propiedades y/o descriptores.¹⁹

1.7.2 Similitud química, molecular y biológica

La similitud (química, molecular y biológica) es un concepto ampliamente utilizado en la química medicinal. Su objetivo principal consiste en establecer y cuantificar criterios para definir si un par de compuestos son similares entre ellos. En este sentido, se define la similitud con base en las propiedades fisicoquímicas (similitud química), estructurales (similitud molecular) o de bioactividad (similitud biológica) que se comparten entre los compuestos comparados. Otra manera de referirse a las propiedades es mediante los llamados “descriptores”, pues como su nombre lo dice, su función principal es describir o caracterizar las distintas características de moléculas. Usualmente, los valores de similitud están dentro del rango 0 a 1. Cuando un par de compuestos tienen una similitud de 1 sugiere que existe un 100% de descriptores compartidos.²⁰

Las ventajas de los cálculos de similitud molecular son su fácil implementación, su bajo costo computacional, la rapidez y la masiva cantidad de datos que pueden ser procesados paralelamente. Una de las desventajas importantes o puntos de cuidado son que *per se* la similitud es relativa (no invariante): depende del tipo, calidad, y cantidad de los descriptores utilizados, así como de la métrica para cuantificar dicha similitud.²¹

Algunas de las utilidades de las técnicas de similitud son: (1) permiten la identificación eficaz de “alertas estructurales” (*PAINS*), es decir, compuestos con porciones moleculares (núcleos base o sustituyentes) altamente reactivas (que generalmente se asocian a una alta tasa de falsos positivos en ensayos *in vitro*); (2) orientan el reposicionamiento y optimización de fármacos; y (3) facilitan la selección y/o priorización de compuestos a sintetizar o evaluar.

1.7.3 Espacio químico

Las definiciones de Lipinski y Hopkins puntualizan las similitudes entre el espacio químico y el espacio cósmico. Por ejemplo, toda la diversidad de compuestos químicos estaría poblando el espacio (cuando nos referimos al espacio químico), en lugar de las estrellas (cuando nos referimos al espacio cósmico).²² Y, justo como sucede con el espacio cósmico, para localizar una estrella (su equivalente sería un compuesto químico de interés) es necesario describir previamente sus características (en referencia por ejemplo, propiedades fisicoquímicas y/o biológicas), para luego construir una visión general del espacio (espacio químico).

Dentro de las aplicaciones prácticas que ofrece la construcción y el análisis del espacio químico, está el hecho de que permite representar gráficamente conceptos abstractos tales como: propiedades fisicoquímicas y biológicas, similitud molecular y diversidad química. No obstante, lo mismo que la similitud molecular, su representación no es absoluta, es decir, cambia en función de cómo se describe (¿qué descriptores se usarán para construir el espacio químico?, véase más adelante en esta misma sección) y con base en qué se define (¿qué descriptores se utilizarán para definir al espacio químico?, véase las secciones 1.7.1 y 1.7.2).²³

Hay una gran variedad de estrategias para explorar visualmente toda la diversidad de espacio químico, aunque estas técnicas pueden englobarse en tres tipos de aproximaciones: (1) basadas en redes. Son representaciones que relacionan nodos (cada nodo representa un compuesto distinto) a través de conexiones (a mayor cercanía, los compuestos comparten mayor similitud química, molecular o biológica), véase un ejemplo en la Figura 4. (2) Basadas en coordenadas. Constan de métodos matemáticos capaces de reducir “n” dimensiones a 2 (2D) o 3 (3D), lo que permite condensar múltiples variables en un solo gráfico (p. ej., descriptores *drug-like*). Algunos ejemplos representativos son el método PCA (cálculo de componentes principales) y t-SNE (incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t). (3) Basadas en mapas. Son gráficos que se

construyen con datos de bioactividad y similitud, aunque a diferencia de las aproximaciones basadas en redes, éstas permiten un análisis pareado. Es decir, cada compuesto se compara con todos los demás compuestos contenidos en la base de datos a estudiar.²⁴

Todas estas estrategias permiten explorar visualmente el espacio químico desde perspectivas complementarias. De hecho, cada una de éstas tiene determinadas utilidades en farmacología. Por ejemplo, facilitan el descubrimiento, reposicionamiento, desarrollo y optimización de fármacos.²⁵ Aunque su uso no se limita a esta área.

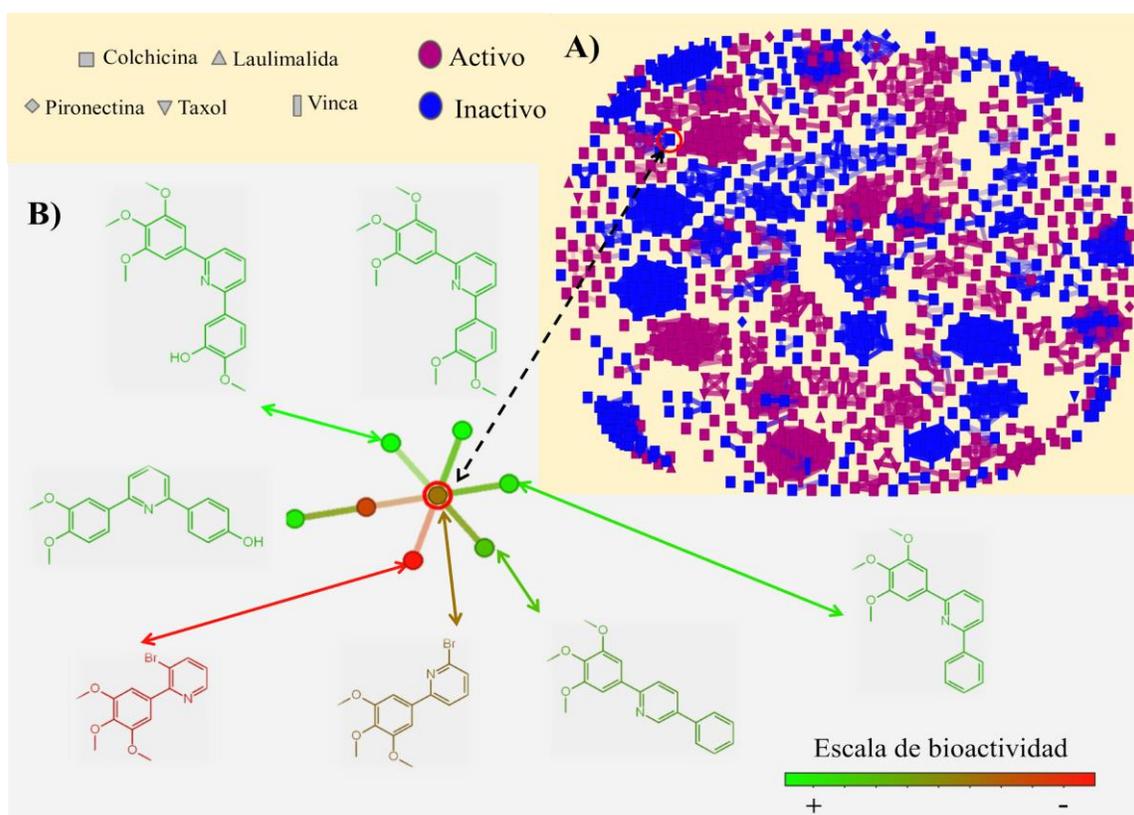


Figura 4. Ejemplo de un análisis visual del espacio químico basado en redes de similitud entre inhibidores de la tubulina conocidos. La base de datos utilizada para este ejemplo se describe a detalle en el capítulo 5 (sección 1) dentro del apartado de materiales y métodos. **A)** Espacio químico basado en redes de inhibidores conocidos, en morado los compuestos activos ($<1 \mu\text{M}$) y en azul los inactivos ($>1 \mu\text{M}$). **B)** Desglose de una porción del espacio químico muestreado, el cual se colorea en una escala de color verde (más activo) a rojo (menos activo).

1.7.4 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se define como un método computacional utilizado para predecir las interacciones entre dos moléculas. Para esto se utilizan campos de fuerza que contemplan la energía potencial del sistema, la capacidad de rotación, la geometría de unión, las cargas electrostáticas y los potenciales de Lenard-Jones.²⁶

Existen métodos de modelado molecular como la dinámica molecular (sección 1.7.5) que describen detalladamente los sistemas biológicos. No obstante, el acoplamiento molecular sigue siendo uno de los métodos más utilizados para explorar los mecanismos y modos de unión entre una proteína (diana molecular) y su ligando (molécula pequeña de interés). Esto en gran medida por el relativo bajo costo computacional, la creación de campos de fuerza mayormente descriptivos, así como por la implementación de algoritmos de búsqueda conformacional más sofisticados.²⁷

Sin embargo, estas mismas mejoras podrían paradójicamente generar puntajes de acoplamiento (*scores*) al predecir la unión del complejo proteína-ligando de una manera sesgada. Es decir, que sobreestimen las interacciones existentes. Esto constituye un problema metodológico, pues podría generar un incremento en la tasa de falsos positivos (*in silico*) reportados en la literatura. Por esta razón, actualmente se busca un equilibrio entre los modos de unión (de los ligandos) y sus puntajes de acoplamiento (energías de unión). Adicionalmente, otra desventaja es la baja capacidad resolutive de estos métodos en sistemas complejos, tales como metaloproteínas o sistemas covalentes.²⁸

Los métodos de acoplamiento molecular son ampliamente utilizados en farmacología, pues sirve de “puente” entre la quimioinformática y los enfoques de relación estructura- actividad. Permiten dar sentido a las contribuciones fisicoquímicas de los sustituyentes y núcleos base de las moléculas de interés en el sistema biológico para el que fueron diseñados (diana biológica). En resumen, el acoplamiento molecular es ampliamente utilizado en los procesos de descubrimiento y optimización de fármacos, y más recientemente, en su reposicionamiento.

1.7.5 Dinámica molecular

Se trata de un método computacional que permite predecir el comportamiento molecular de un sistema a lo largo de un intervalo de tiempo (milisegundos a femtosegundos). Basándose en mecánica clásica, este método busca estudiar las interacciones y movimientos de las moléculas

considerando las fuerzas enlazantes y no enlazantes en el sistema de tal manera que es posible analizar los cambios conformacionales en una diana biológica asociados con la interacción de un ligando.²⁹

Existen ventajas notorias de la dinámica molecular sobre otras técnicas de modelado (p. ej. el acoplamiento molecular), que sobre todo tienen que ver con la exactitud de los resultados, la representatividad del sistema estudiado y las implicaciones directas que tienen en el proceso de desarrollo de fármacos. Sin embargo, su alto costo computacional y la necesidad de equipo de cómputo especializado siguen limitando el uso de estas técnicas. Por todo lo anterior, la dinámica molecular suele utilizarse en la etapa final del DIFAC, donde la cantidad de ligandos candidatos es menor, lo que permite optimizar la relación costo-beneficio de este tipo de aproximaciones.

1.7.6 Modelo del farmacóforo

Como se mencionó en la sección 1.6.3, los métodos consenso (híbridos) utilizan técnicas basadas en el ligando y en la estructura. Un ejemplo representativo es el caso del método del modelo del farmacóforo. Se define como un ensamble de características electrónicas y estéricas que son necesarias para una óptima interacción entre ligandos y una determinada diana biológica.³⁰

Se dice que están basados en el ligando, cuando se superponen compuestos activos para analizar cuáles son las características moleculares en común, de las que se podría derivar su actividad biológica. Por otro lado, se dice que este método está basado en la estructura cuando a partir de acoplamientos moleculares (*docking*) se infieren los modos de unión de los ligandos activos e inactivos, se alinean y se analizan las características en común.³¹

El modelado del farmacóforo es ampliamente utilizado en el DIFAC pues su versatilidad permite modelar compuestos con o sin información estructural de la diana biológica en la que actúa, su mecanismo de acción o una vasta colección de compuestos con actividad biológica reportada. Se trata de un método ampliamente utilizado en las fases de optimización de moléculas líder (*leads*), reposicionamiento de fármacos y cribado virtual masivo. Así como en el diseño de fármacos *de novo*, de unión covalente³² y que actúan sobre diferentes dianas biológicas de manera paralela (multi-diana o *multi-target*).³³

1.8 Productos naturales como agentes anticancerígenos

Históricamente, y como se discute en la sección 1.5, el proceso tradicional de descubrimiento de fármacos es largo y costoso. En el caso particular del cáncer es aún más complejo, debido a las altas tasas de mutación y la diversidad celular y molecular (mosaico genómico) presente en este padecimiento, así como a la resistencia y los efectos adversos asociados a los fármacos actuales. Por lo anterior, recientemente se han comenzado a utilizar nuevamente fuentes de productos naturales (PNs) como inspiración para el diseño de nuevos fármacos anticancerígenos. Algunos ejemplos exitosos son los alcaloides, los flavonoides, los terpenoides, los polisacáridos, las saponinas y varios otros tipos de compuestos provenientes de microorganismos, plantas o venenos naturales.³⁴

A pesar de que la actividad anticancerígena de los PNs y sus derivados está ampliamente documentada, estos compuestos siguen generando retos para la industria farmacéutica, puesto que los métodos, temporadas y geolocalización de recolección y extracción han limitado enormemente la escalabilidad necesaria para desarrollar ensayos clínicos, y por lo tanto nuevos fármacos. Aunque recientemente, los nuevos métodos de síntesis orgánica, caracterización estructural y la generación de nano-formulaciones ha permitido el redescubrimiento de estos agentes.³⁵⁻³⁸

Afortunadamente, varios PNs han sobrepasado las dificultades técnicas y se han logrado posicionar como posibles agentes anticancerígenos. Algunos de ellos en fase preclínicas y clínicas (I, II y III), dentro de los que destacan metabolitos y venenos.³⁹ De hecho, alrededor del 50% de moléculas pequeñas aprobadas para uso clínicos (hasta el 2014) provinieron de fuentes naturales, y actualmente alrededor de 100 PNs (sin modificaciones estructurales) continúan en diversos ensayos clínicos (dentro de los que destacan los ensayos contra algún tipo de cáncer). Algunos ejemplos representativos de fármacos aprobados inspirados en productos naturales son la vincristina (aprobado en 1963, y nuevamente en 2012 en su formulación liposomal), paclitaxel (aprobado en 1993, y nuevamente en 2005 en su formulación liposomal), docetaxel (aprobado en 1995), cabazitaxel (aprobado en 2010) y homoharringtonina (aprobada en 2012), todos estos con propiedades anticancerígenas.⁴⁰

1.8.1 Productos naturales dirigidos a la tubulina

Existe una gran diversidad de PNs con propiedades anticancerígenas demostrada en múltiples estudios *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, su amplia diversidad estructural le confiere a cada uno de

ellos la capacidad de interactuar con diferentes dianas moleculares en la célula. En este sentido, algunos PNs tales como: los derivados del taxol, la colchicina, los alcaloides de la vinca, algunos derivados del verticileno y algunos longipinenos, así como los derivados de la pironetina y de la laulimalida han demostrado tener una potencial actividad cancerígena vía la modulación del sistema tubulina-MTs.⁴¹⁻⁴³ Adicionalmente a la Figura 1, las Figura 5 y 6 muestran algunos ejemplos representativos de PNs capaces de estabilizar o desestabilizar el sistema tubulina-MTs, respectivamente.⁴⁴

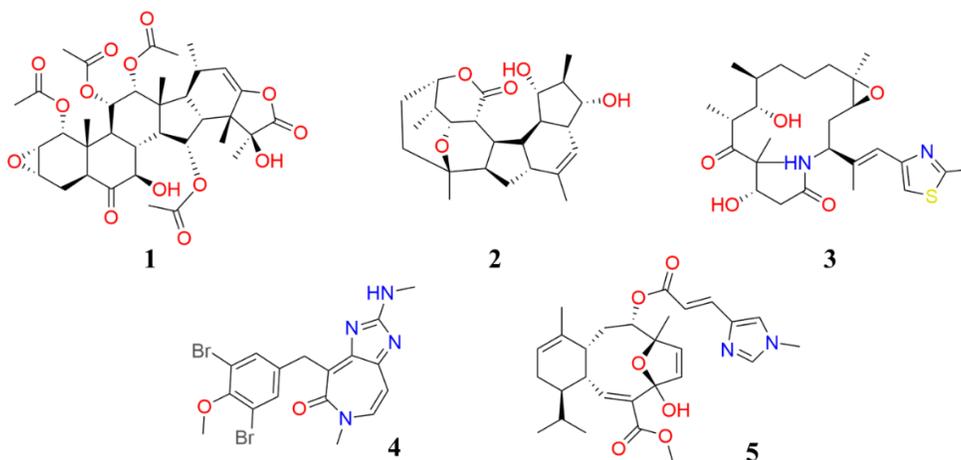


Figura 5. Ejemplos representativos de moléculas derivadas de productos naturales estabilizadores del sistema tubulina-MTs. Taccalonolida A (1), cyclostreptina (2), ixabepilona (3), ceretamina A (4) y sarcodietycina A (5).⁴¹⁻⁴⁴

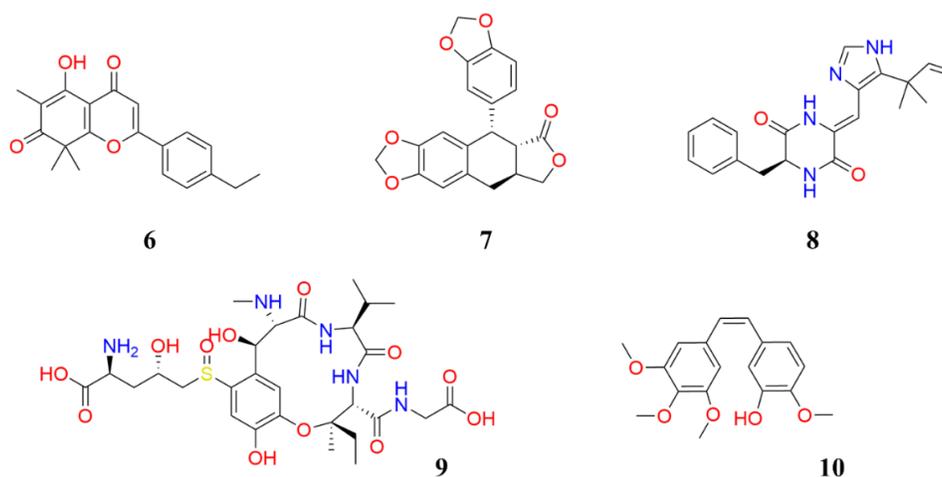


Figura 6. Ejemplos representativos de moléculas derivadas de productos naturales desestabilizadores del sistema tubulina-MTs. 4-Etil-desmosdumotina B (6), poligamaina (7), (-)-fenilhistina (8), ustiloxin A (9) y combretastatina A4 (10).⁴¹⁻⁴⁴

1.9 DIFAC inspirado en productos naturales

Recientemente, los PNs han tomado nuevamente un rol vital en las etapas de diseño y desarrollo de nuevos fármacos, particularmente en el área del DIFAC. Esto debido a los nuevos y procesos informáticos de recolección mejorados, almacenamiento, procesamiento, análisis y predicción de propiedades de moléculas complejas (p. ej. moléculas de orígenes naturales tales como metabolitos secundarios, toxinas y anticuerpos).⁴⁵

Sin embargo y dada la complejidad de los PNs, es común que éstos no concuerden del todo con las reglas empíricas que caracterizan a una molécula como buen candidato a fármaco (*drug-like*). Aunque, como se ha mencionado en secciones previas (1.8 y 1.8.1), existen excepciones a estas reglas que confirman la necesidad de continuar explorando a los productos naturales como posibles agentes terapéuticos, especialmente en el sistema tubulina-MTs.⁴⁶

2. JUSTIFICACIÓN

Existen un gran repertorio y diversidad estructural de compuestos que actúan como inhibidores de la polimerización de la tubulina y otros que actúan como inhibidores de la despolimerización de los microtúbulos. No obstante, muchos de ellos tienen un perfil ADMET deficiente que ha limitado su estudio en fases clínicas. Por lo anterior, el desarrollo e implementación de protocolos de cribado virtual con un enfoque consenso permitirá proponer sistemáticamente inhibidores novedosos del sistema tubulina-MTs que además tengan un perfil ADMET mejorado y que permitan priorizar la evaluación *in vitro* de aquellos candidatos con mayor potencial.

3. HIPÓTESIS

Las herramientas *in silico* con un enfoque consenso permitirán la identificación de inhibidores potenciales del sistema tubulina-MTs.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar y evaluar *in silico* compuestos de origen natural o semisintético con una posible interacción sobre la tubulina y/o sobre los microtúbulos.

4.2 Objetivos específicos

1. Construir una base de datos de compuestos que interactúen con la tubulina y que muestren actividad contra líneas celulares de cáncer, así como estudiar relaciones estructura-actividad utilizando el concepto de panorama de actividad.
2. Diseñar un modelo farmacofórico para los sitios de unión de la colchicina y del taxol en la tubulina.
3. Cribar diversas bases de datos de productos naturales para seleccionar inhibidores potenciales de polimerización de tubulina y/o despolimerización de microtúbulos.
4. Evaluar el perfil ADMET *in silico* de los candidatos seleccionados en el cribado.
5. Analizar la dinámica molecular de los mejores candidatos propuestos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Construcción de bases de datos

Se construyó una base de datos de 851 compuestos evaluados como inhibidores del sistema tubulina-MTs en diferentes líneas celulares de cáncer.⁴⁷⁻⁶⁷ Los datos de todos los compuestos se obtuvieron de artículos originales, revisiones y patentes publicadas en un periodo de 15 años (2005-2020). La lista completa de compuestos puede ser consultada en la referencia: López-López *et al.* (2021).⁵ Los compuestos se clasificaron con base en su actividad contra diferentes tipos

líneas celulares: cérvix (HeLa), colon (HCT-116), mama (MDF-7 y MDA-MB-231), pulmón (A-549), o próstata (PC3).

El sistema de entrada lineal de datos moleculares simplificados (SMILES, por sus siglas en inglés) es una notación comúnmente utilizada para representar en una sola dimensión (utilizando códigos alfanuméricos) a un compuesto bi- o tri- dimensional. En este sentido, se utilizó la representación SMILES para representar la información de conectividad estructural de los compuestos en nuestra base de datos.⁶⁸ Por otro lado, se enlistan los valores de pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) para cada compuesto (véase la referencia: López-López *et al.*, 2021).⁵ Finalmente, las moléculas duplicadas se removieron utilizando el módulo *WASH* implementado en el programa *Molecular Operating Environment* (MOE), versión 2020.⁶⁹

Adicionalmente, se generó una segunda base de datos con 429 PNs y sus derivados (previamente obtenidos en el grupo de investigación), a la que se le denominó biblioteca *in house*, además de algunos otros PNs de interés.

5.2. Espacio químico

A partir de las estructuras químicas codificadas (SMILES) se calcularon seis propiedades fisicoquímicas (PF) de interés farmacéutico: coeficiente de partición octanol/agua (*clog P*), peso molecular (MW), área topológica superficial polar (TPSA), número de enlaces rotables (RB), número de átomos de hidrógeno donadores y aceptores de puentes (HBD/HBA). Las PF se agruparon utilizando el método t-SNE,⁷⁰ el cual se generó con el programa DataWarrior, versión 5.2.1.¹⁹

5.3 Modelado de panoramas de actividad

Un mapa de similitud estructura-actividad (SAS, por sus siglas en inglés) es un gráfico bidimensional utilizado para realizar análisis SAR de compuestos evaluados contra una misma diana biológica. A su vez, permite la rápida identificación de acantilados de actividad (o *Activity Cliff* - AC), definidos como compuestos con alta similitud estructural e inesperadas y grandes diferencias de actividad biológica. Los mapas SAS de igual manera permiten la identificación de cambios estructurales en los núcleos base en las moléculas (*scaffold hops* - SH), es decir, compuestos con baja similitud estructural, pero con inesperada y equivalente actividad biológica.⁷¹

Los mapas SAS se generaron a través de comparaciones pareadas entre cada uno de los 851 compuestos contenidos en la base de datos (sección 1), mientras que la similitud entre cada compuesto se calculó utilizando el coeficiente de Tanimoto y la métrica ECFP4, la cual reconoce sistemáticamente a cada átomo distinto de hidrógeno a una distancia de cuatro átomos, esto se repite para cada átomo dentro de cada molécula estudiada.⁷² Los valores de similitud se representan en el eje X del mapa, mientras que la diferencia de actividad, que corresponde a diferencias de valores de pIC_{50} entre cada par de compuestos, se grafica en el eje Y del mapa SAS. Es decir, si un compuesto “A” tiene un valor de actividad de 5 y un compuesto “B” tiene un valor de actividad de 7, la diferencia de actividad de este par de compuestos A-B es de 2. Existen múltiples aproximaciones para determinar las cohortes que permiten definir a un AC.⁷³ En este trabajo, el criterio seleccionado fue el valor promedio + dos desviaciones estándar de los valores de similitud provenientes de la base de datos completa. Por otro lado, la cohorte de diferencia de actividad corresponde a dos unidades logarítmicas.⁷⁴ Cada punto (análisis pareado) mostrado en el mapa SAS se coloreó utilizando el índice de panoramas de estructura-actividad (SALI, por sus siglas en inglés).⁷³ El cual se calcula de la siguiente manera:

$$SALI_{i,j} = (|A_i - A_j|)/(1 - sim_{i,j})$$

donde A_i y A_j son las actividades de las moléculas i y j , y $sim_{i,j}$ representa a los coeficientes de similitud entre las dos moléculas. El análisis cuantitativo del mapa SAS se realizó con el servidor *Activity Landscape Plotter*, un servidor web de acceso libre: <http://132.248.103.152:3838/ActLSmaps/> (consultado el 23 April 2021).⁷⁴

5.4 Análisis de núcleos base

Para el estudio de los núcleos base, se utilizó la metodología implementada por Bemis y Murcko.⁷⁵ Brevemente, el método implica un análisis de grafos de cada compuesto, donde el “núcleo base” es definido como la unión de sistemas cíclicos a través de “cadenas de átomos centrales” en una molécula, las cadenas laterales son removidas, así como cualquier otro átomo no unido directamente al núcleo base. Esto se realizó con el nodo de fragmentación de RDKit implementado

en KNIME, versión 3.7.2.⁷⁶ Las estructuras de los núcleos base están disponibles en el material suplementarios de la referencia: López-López *et al.* (2021).⁵

5.5 Gráficos de constelación

Un gráfico de constelación es una representación gráfica del espacio químico basado en redes y coordenadas. Cada nodo representa a un grupo de series análogas. En otras palabras, un gráfico de constelación reduce el número de puntos representados en el espacio químico, lo cual incrementa la calidad y el volumen de datos interpretables en un espacio químico bidimensional. El objetivo principal es identificar aquellas series análogas repetidas entre los compuestos de nuestra base de datos, y asociarlas a una actividad promedio.⁷⁷ El gráfico fue generado a partir de un código abierto en lenguaje de programación Python.⁷⁸

5.6 Modelado y acoplamiento molecular de los compuestos seleccionados

5.6.1 Preparación de complejo proteico y ligandos

Las estructuras cristalográficas de la α - y β -tubulina (PDB ID: 4O2B y 5SYF) se obtuvieron de la base de datos *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>).⁷⁹ Las moléculas de agua y ligandos del complejo se removieron. Adicionalmente, los átomos de hidrógeno y cargas formales se asignaron con el campo de fuerza AMBER10_EHT utilizando el programa MOE. Por otro lado, todos los ligandos contenidos en las bases de datos se reconstruyeron a partir de sus códigos SMILES y se minimizaron utilizando el campo de fuerza MMFF94x.

5.6.2 Acoplamiento molecular

Utilizando MOE, se seleccionó el método *Triangle Matched Pair*, con la función de puntaje GBVI/WSA para realizar el acoplamiento molecular. Se consideraron todos los residuos a una distancia no mayor de 4.5 Å del sitio de unión de la colchicina o del taxol. Para cada ligando se evaluaron 30 pasos de búsqueda en un formato de ajuste inducido y se seleccionó la conformación

de mejor puntaje. Posteriormente, cada una de las conformaciones de cada compuesto se inspeccionó manualmente. Los mejores modos de unión de cada compuesto se utilizaron para los estudios farmacofóricos y de dinámica molecular.

5.7 Modelado del farmacóforo

A partir de los 20 compuestos más activos (y estructuralmente diversos) contenidos en la base de datos generados (sección 1) para el sitio de unión de la colchicina o el taxol, se utilizaron sus respectivas posiciones de acoplamiento y se definieron aquellas características químicas (regiones farmacofóricas) que tuvieran una frecuencia mayor al 60% en los compuestos activos (al menos 12 de los 20 seleccionados cumplen con esa característica) utilizados para construir el modelo. Este procedimiento se realizó automáticamente utilizando por defecto los parámetros sugeridos por la función *pharmacophore* implementada en el MOE.

5.8 Cribado virtual

Se cribó la base de datos *in house* con 429 compuestos de origen natural y/o semisintético. Se seleccionaron, para evaluaciones *in silico* más exhaustivas, tales como la dinámica molecular, aquellos compuestos que cumplieran de manera consensuada con diferentes características: (1) compuestos con valores de similitud molecular (mayor al promedio) contra alguno de los compuestos reportados previamente como activos (sección 1); (2) compuestos con valores de acoplamiento molecular calculados (*binding score*) mayores a los compuestos control (colchicina y/o taxol); (3) compuestos que cumplen con las características farmacofóricas de unión (sección 7); y (4) aquellos compuestos que no violaran las reglas empíricas utilizadas en el diseño racional de fármacos (sección 2). Los mejores candidatos fueron seleccionados para estudios por dinámica molecular y cálculos de predicción de energía de afinidad (pK_i).⁸⁰

5.9 Dinámica molecular

Utilizando el programa Desmond con el campo de fuerza OPLS 2005, se preparó el complejo proteína-ligando con la herramienta “*System Builder Utility*” en una malla de dimensiones 10×10

$\times 10 \text{ \AA}$. Se empleó el modelo de agua TIP3 y el complejo se neutralizó con NaCl (0.15 M). El complejo se minimizó con el algoritmo de descenso profundo con el método LBFGS de 3 fases. El periodo de equilibración fue de 250 ps con una dinámica browniana, utilizando el termostato de Berendsen. La simulación de DM se realizó con el ensamble NVT de calentamiento lento de 10 a 300 K en 3000 ps.⁸¹

Finalmente, el ensamble de equilibración se generó con el termostato de Berendsen y el barostato de Langevin durante 250 ps adicionales. El sistema se sometió a 100 ns de producción, con un ensamble NPT en condiciones 1 bar (barostato MTK) y 300 K (termostato Nosé-Hoover). Las fuerzas electroestáticas se calcularon con el método PME usando 9 \AA de corte. La integración se realizó cada 1.2 fs, con un intervalo de 50 ps. La calidad de la simulación y el análisis de la trayectoria se generó con la herramienta implementada en el programa Maestro-GUI.⁸²

5.10 Perfil ADMET *in silico*

Utilizando la plataforma de acceso libre SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) se predijeron parámetros farmacocinéticos (p. ej. absorción gastrointestinal y posible inhibición de citocromos) y el perfil de química medicinal (p. ej. presencia de alertas estructurales) para cada compuesto contenido en nuestra base de datos *in house*.⁸³

6. RESULTADOS

6.1 Construcción y curado de una base de datos basada en líneas celulares

Como se describe en el capítulo 5 (sección 5.1), se construyó una base de datos de 851 compuestos a partir de la búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad reportada contra el sistema tubulina-MTs y con reportes de actividad asociados con la inhibición de la replicación de líneas celulares cancerígenas. La actividad citotóxica de los compuestos se expresó en pCI_{50} ($-\log IC_{50}$) y el formato de entrada de las moléculas se recopiló en formato SMILES. Finalmente, la base de datos fue procesada y curada. Este proceso se ilustra en la Figura 7.

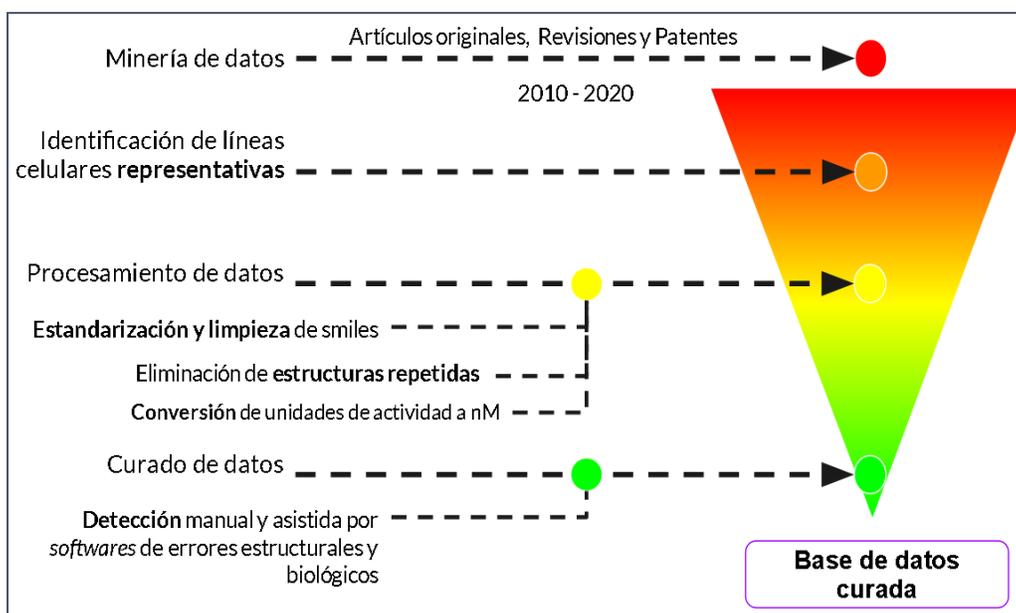


Figura 7. Construcción y curado de una base de datos basada en líneas celulares. El proceso de curado constó de cuatro fases: 1) Minería de datos, 2) Identificación de datos representativos; 3) Procesamiento de datos; y 4) Curado de datos. El procesamiento y el curado de datos se llevó a cabo con el programa MOE.⁶⁹

6.2 Espacio químico

La Figura 8A muestra una representación visual del espacio químico de los 851 compuestos utilizando coordenadas t-SNE basadas en descriptores de interés farmacéutico descritos en el capítulo 5, sección 5.2.

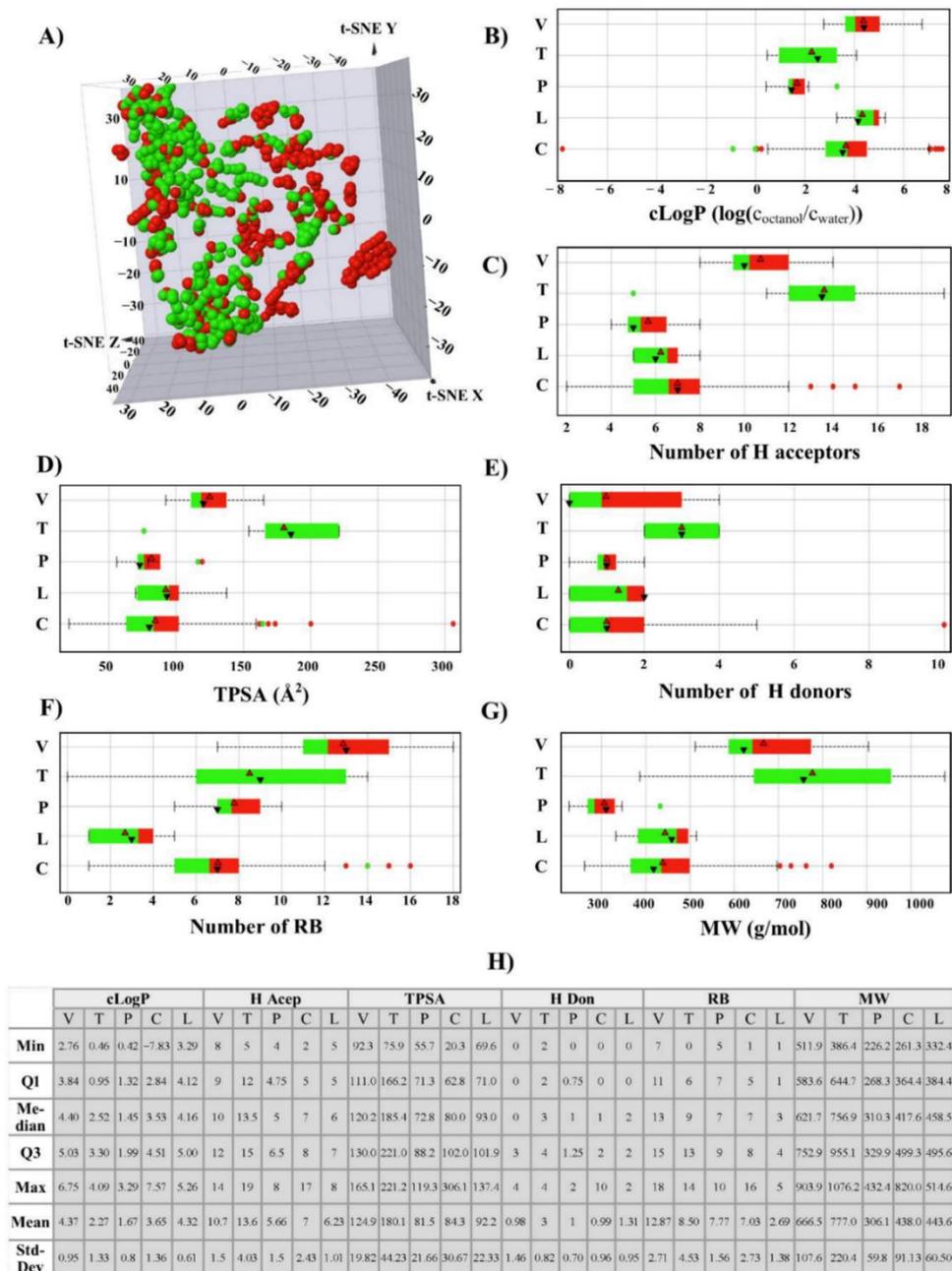


Figura 8. Descripción general de las propiedades fisicoquímicas de 851 compuestos evaluados en ensayos basados en células. Los compuestos están coloreados por rangos de valores de actividad biológica: verde

como activo ($<1 \mu\text{M}$) y rojo como menos activo ($>1 \mu\text{M}$). Los compuestos se agruparon por sitio de unión: sitio de los alcaloides de la vinca (V), sitio de paclitaxel (T), pironetina (P), laulimalida (L) y sitio de colchicina (C). (A) Representación visual del espacio químico utilizando t-SNE; (B–G) Diagramas de caja de las propiedades similares a las drogas comúnmente utilizadas en el proceso de diseño y desarrollo de fármacos. (B) *clog P*; (C) número de aceptadores de puentes de hidrógeno; (D) TPSA (superficie topológica); (E) número de donadores de puentes de hidrógeno; (F) RB (enlaces rotables); (G) MW (peso molecular). Las cajas delimitan los datos con valores en el primer y tercer cuartil. Los triángulos rojo y negro denotan las distribuciones de media y mediana, respectivamente. Los puntos de datos fuera de las cajas indican valores atípicos; (H) Estadísticas resumidas del conjunto de datos.

Se realizó un análisis descriptivo de las propiedades de interés farmacéutico que se muestra en la Figura 8B-G. Por ejemplo, en el panel B (*clog P*), los compuestos activos (área verde) tienen valores de alrededor de 2.5 a 4.0, y los compuestos inactivos (área roja) tienen valores más altos.

6.3 Panoramas de actividad

Siguiendo el concepto de panoramas de actividad descrito en los capítulos 1 y 5, se analizaron las relaciones estructura-actividad (SAR) de los 851 compuestos probados en ensayos basados en células. Las Figuras 9A y 9B muestran el mapa SAS y la amplificación en la zona de AC, respectivamente. Cada punto representa un par de compuestos que están coloreados por valores SALI, utilizando una escala de color desde verde (valor SALI bajo, es decir, no AC) hasta rojo (alto valor SALI, es decir, AC). La información ayuda a identificar pequeños cambios estructurales en las moléculas que disminuyen o aumentan su bioactividad. Curiosamente, el 97% de los puntos de datos corresponden a una serie de compuestos con baja similitud estructural: el 67% son SH (compuestos con baja similitud estructural y bajas diferencias de actividad o alta similitud de actividad). Este resultado es indicativo de la alta diversidad estructural de los compuestos en este conjunto de datos. Las Figuras 9B y 9C ilustran las estructuras químicas de la AC representativas.

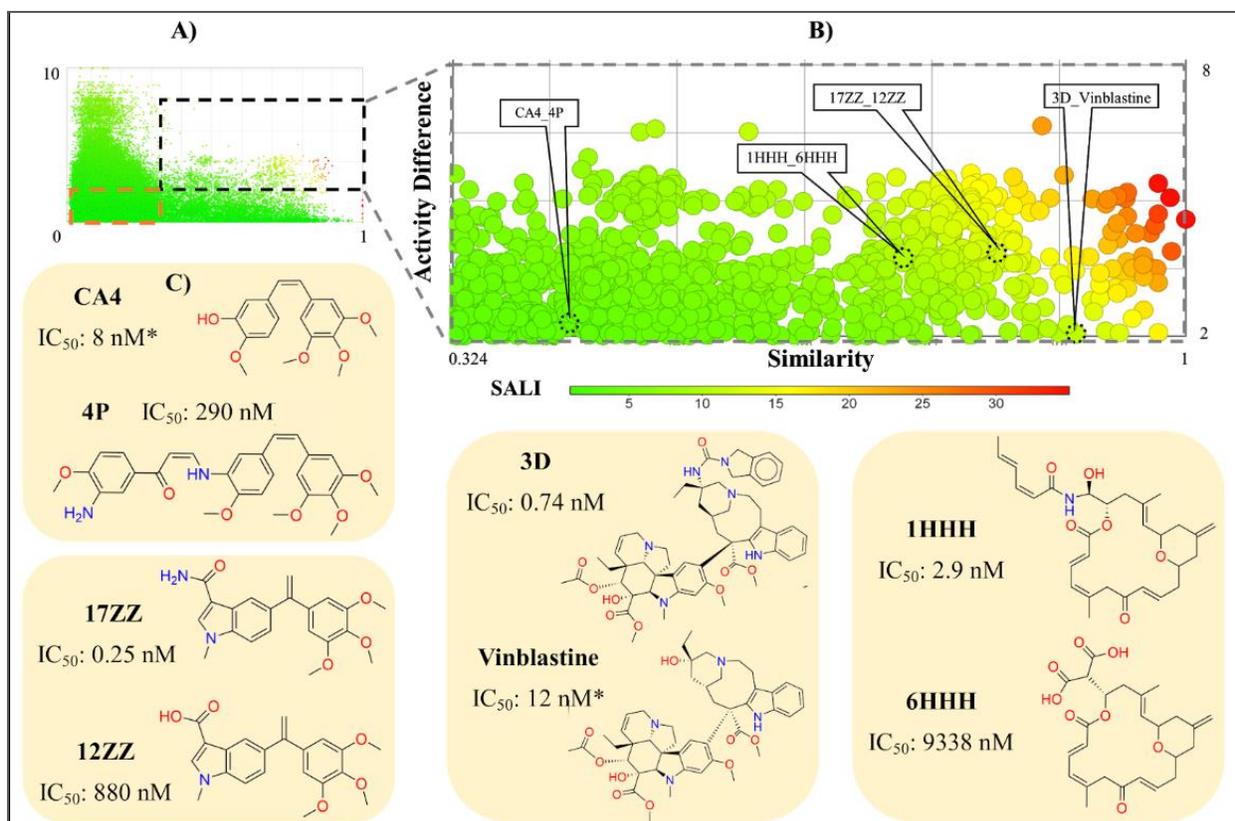


Figura 9. Panorama de actividad de inhibidores del sistema tubulina-MTs utilizando información basada en inhibición de líneas celulares. Un total de 856 compuestos se analizaron por pares utilizando el servidor “Activity Landscape Plotter” (<http://132.248.103.152:3838/ActLSmaps/>).⁷⁴

De manera complementaria, se realizaron estudios del contenido de núcleos base como se ilustra en la Figura 10A, la cual muestra una visión general de los diez núcleos base más comunes en la base de datos. En contraste, la Figura 10B muestra un panorama de actividad de los compuestos más bioactivos (con sus respectivos identificadores de núcleos base). La Figura 10B muestra los valores de pIC_{50} máximos reportados contra cualquiera de las líneas celulares estudiadas en este trabajo. Por ejemplo, el compuesto **3D** es más activo (pIC_{50} máx = 10.1) que **17ZZ** (pIC_{50} máx = 9.6) y este último, a su vez, es más bioactivo que **10III** (pIC_{50} máx = 9.2). En la Figura 10B, los compuestos (representados por puntos) están coloreados por una escala de color, desde el rojo (menor valor de similitud con el andamio de colchicina) hasta el azul (mayor similitud con el andamio de colchicina).

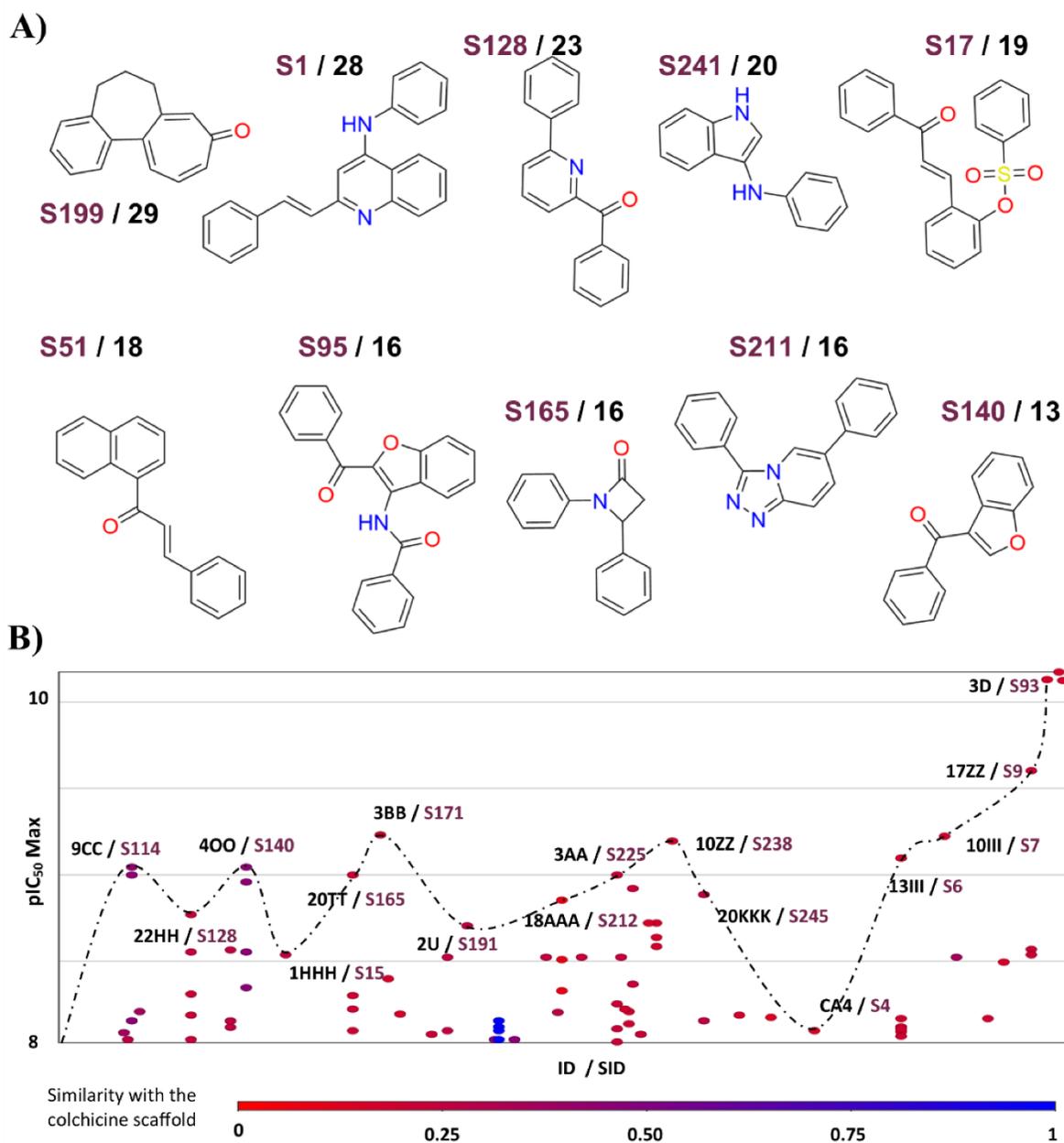


Figura 10. Análisis del contenido de núcleos base de compuestos con actividad contra el sistema tubulina-MTs utilizando datos de inhibición basados en células. (A) Frecuencia de los núcleos base más comunes. Los núcleos base se generaron utilizando la definición de Bemis y Murcko; (B) núcleos base de los compuestos más activos y diferencias de actividad. Se grafica el pIC_{50} máximo reportado para alguna de las líneas celulares estudiadas (pIC_{50} máx). Se ilustran el código identificador de moléculas (ID) y núcleos base (SID) para cada estructura. Cada núcleo base está coloreado por el valor de similitud bajo (rojo) o alto (azul) con el andamio estructural de Bemis y Murcko de la colchicina.

En forma notable, solo **S128**, **S140** y **S165** (núcleos base comunes) están contenidos en cinco, cuatro y cuatro casos, respectivamente, de los compuestos más activos. En otras palabras, son núcleos base (Bemis-Murcko) comunes que no necesariamente están contenidos en los compuestos más activos. La lista completa de núcleos base se encuentra en la Tabla S2 de la sección de anexos de López-López *et al.* 2021.¹⁵

6.4 Gráfico de constelación (*constellation plot*)

Los diagramas de constelación se desarrollaron como una representación gráfica que muestra las SAR, y que integra el estudio del espacio químico basado en coordenadas y en series análogas. Es decir, estos gráficos resumen el contenido de los núcleos base de un conjunto de compuestos químicos y muestran la diversidad de núcleos base y sus relaciones estructurales mutuas. Dado que los datos de actividad biológica se pueden mapear en un gráfico de constelación, estas representaciones bidimensionales del espacio químico permiten la identificación de regiones enteras en el espacio químico ricas en datos SAR, ya sean activas ("regiones brillantes" en analogía con el espacio químico) o inactivas ("regiones oscuras"), donde se han encontrado pocas o ninguna molécula activa. La Figura 11 muestra la constelación de inhibidores de tubulina-MTs.

A partir de la base de datos inicial de compuestos, las estructuras químicas de 851 inhibidores se han resumido en 142 series análogas (ilustradas en la Figura 11), que resumen aún más los 258 núcleos base de Bemis-Murcko Tabla S2 de la sección de anexos de López-López *et al.* 2021.¹⁵ Cabe destacar que los compuestos con diferentes núcleos base (Bemis-Murcko) comparten una fracción estructural (que no es un núcleo base completo). Esto explica por qué las moléculas con diferentes núcleos base podrían estar contenidas en la misma serie análoga. Una serie análoga considera la ruta sintética para generar los compuestos (utilizando reglas retrosintéticas – RECAP, por sus siglas en inglés).⁸⁴ En contraste, los núcleos base de Bemis-Murcko no consideran reglas sintéticas ya que éstos eliminan las cadenas laterales de cada compuesto. Además, los gráficos de constelaciones ordenan las series análogas utilizando coordenadas basadas en la similitud, es decir, las series análogas con estructuras químicas similares están estrechamente ordenadas porque comparten coordenadas X y Y similares en las gráficas 2D. En contraste, las series análogas con estructuras químicas diferentes permanecen muy separadas.

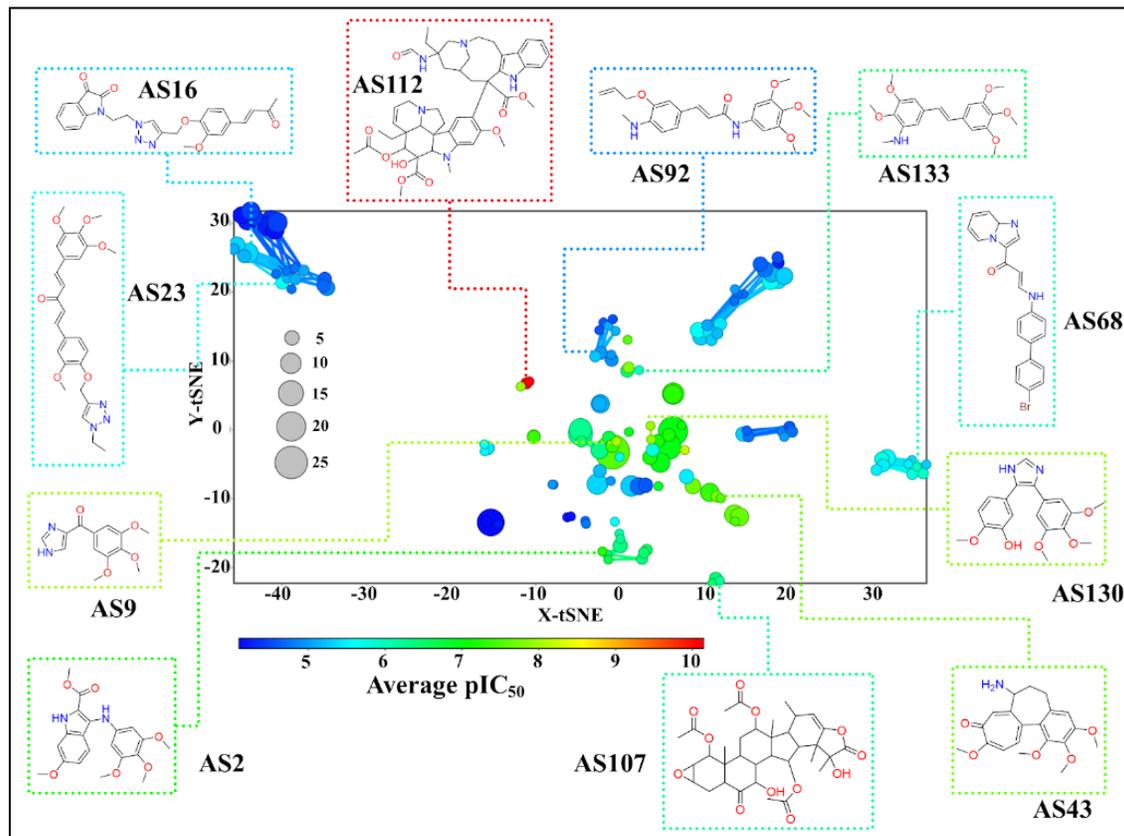


Figura 11. Diagrama de constelación de compuestos con actividad contra el sistema tubulina-MTs utilizando datos de inhibición basados en células. La gráfica muestra 147 puntos de datos, cada uno representando una serie análoga. Las series análogas seleccionadas se identifican con un número. El tamaño del punto de datos indica el número relativo de compuestos en cada serie análoga, y el color es relativo a la actividad promedio de los compuestos contenidos en cada serie análoga.

6.5 Construcción del modelo farmacofórico

Como se describe en el capítulo 5, sección 3, se acoplaron cada uno de los compuestos diseñados para interactuar con el sitio de unión de la colchicina y/o del taxol. Así, los modos de unión de los compuestos más activos se utilizaron para construir el modelo farmacofórico (Figura 12).

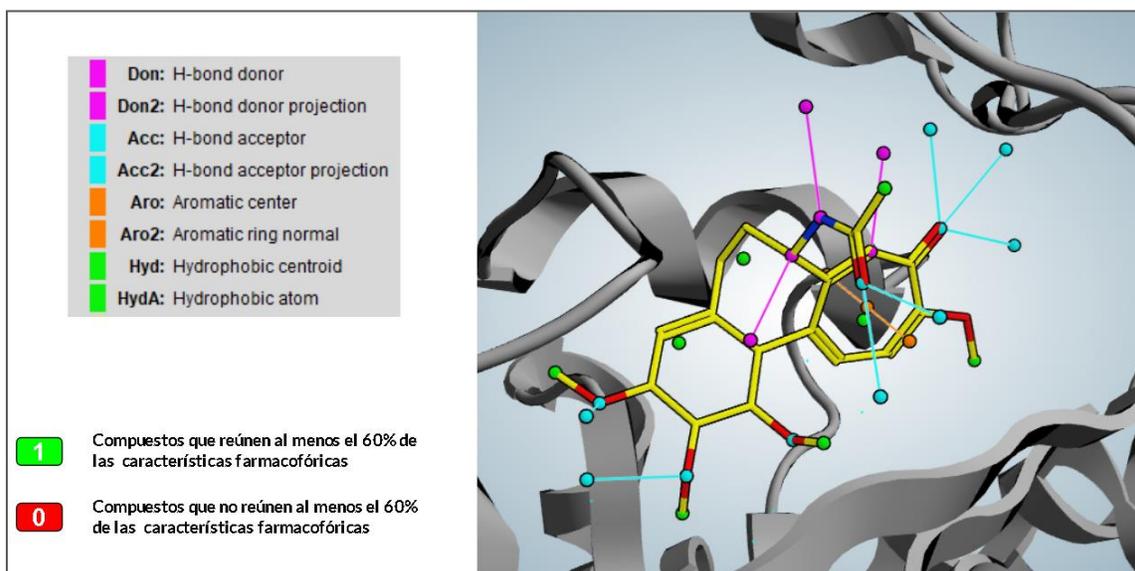


Figura 12. Modelo farmacofórico de compuestos que interactúan con el sitio de unión de la colchicina. En amarillo se muestra la colchicina. Los puntos coloreados en rosado (puentes donadores de hidrógeno), azul (puentes aceptores de hidrógeno), naranja (interacciones aromáticas) y verde (interacciones hidrofóbicas) describen la posición y la interacción necesaria que las moléculas deben de tener para inhibir a la tubulina. El acoplamiento molecular (*docking*) y el modelo farmacofórico se realizaron empleando el programa MOE.

Finalmente, estos modelos farmacofóricos permitieron cribar la base de datos *in house* (PNs y/o compuestos semisintéticos con actividad desconocida contra el sistema tubulina-MTs), lo que se discute en secciones posteriores.

6.6 Cribado virtual

Los enfoques de cribado virtual consenso, como su nombre lo indica, utilizan diversas aproximaciones (complementarias) que permiten priorizar aquellos compuestos con mayor potencial de ser activos. En este caso, se cribaron 429 compuestos (de origen natural y/o semisintético) de los cuales solo cinco compuestos cumplieron con todos los criterios de selección planteados en el capítulo 5, sección 4. Dichos compuestos se ilustran en la Figura 13.

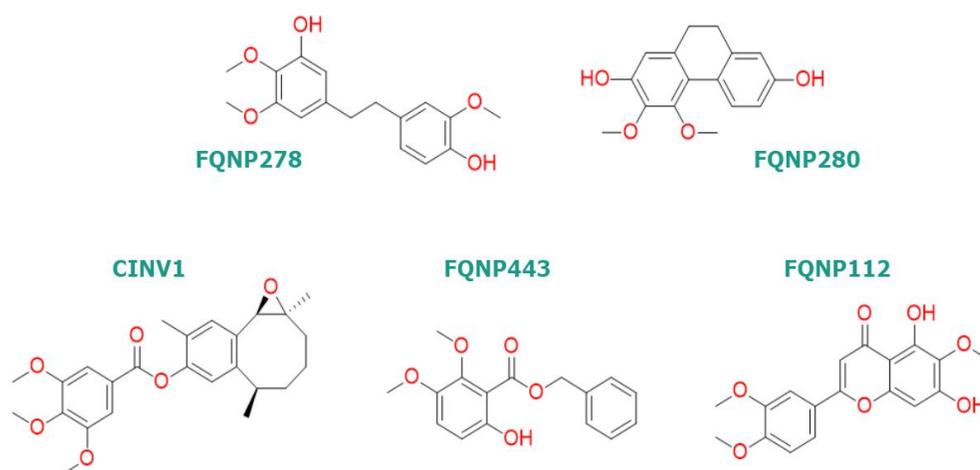


Figura 13. Compuestos que cumplieron cada uno de los criterios de selección planteados en el protocolo de cribado virtual.

A continuación, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva, y se encontró que, de los cinco compuestos seleccionados, tres de estos (**FQNP278**, **FQNP280** y **FQNP112**) tienen alguna actividad previamente reportada contra el sistema tubulina-MTs. De los cuales, el más potente es el compuesto **FQNP112** ($15 \mu\text{M}$, en ensayos celulares; y $40 \mu\text{M}$ en el sistema tubulina-MTs).⁸⁵ Los compuestos sin antecedentes de actividad en el sistema tubulina-MTs (**CINV1** y **FQNP443**) se estudiaron con mayor detalle utilizando cálculos de dinámica molecular. Algo importante de mencionar es que se sugiere que los compuestos seleccionados podrían estar interactuando con el sitio de unión de la colchicina en el sistema tubulina-MTs, esto de acuerdo con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular.

6.7 Dinámica molecular

Se utilizó al compuesto **DJ101** (Figura 14) como control de procesamiento. Existen reportes cristalográficos que demuestran la afinidad y el mecanismo de interacción entre el sistema tubulina-MTs y el compuesto **DJ-101** en el sitio de unión de la colchicina.⁸⁶

Los resultados de dinámica molecular con 100 ns de producción ilustrados en la Figura 14A muestran consistencia entre los resultados experimentales (datos cristalográficos previamente reportados) y los obtenidos utilizando el protocolo de dinámica molecular planteado en el capítulo 5, sección 9.

6.8 Cálculo de propiedades ADMET

Utilizando el servidor SwissADME, como se describe en el capítulo 5, sección 10, se predijeron las propiedades ADMET de los compuestos con mayor actividad moduladora en el sistema tubulina-MTs, los que a su vez se identificaron mediante el protocolo de cribado virtual que se ha abordado en este trabajo. Los datos obtenidos fueron valores relativos a la lipofilidad (consenso de $\log P_{o/w}$), farmacocinética (*absorción gastrointestinal - GI*, permeabilidad de *barrera hematoencefálica - BBB* y sustrato de *glicoproteína P - P-gp*), propiedades similares a fármacos aprobados (puntaje de biodisponibilidad) y propiedades de química medicinal (alertas estructurales), éstos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores ADMET predichos con el servidor SwissADME.

Compuesto	Consenso de $\log P_{o/w}$	Absorción GI	Permeabilidad de BBB	Sustrato de P-gp	Puntajes de biodisponibilidad	Alertas estructurales
Colchicina	2.36	Alta	NO	SI	0.55	0
DJ-101	3.62	Alta	NO	SI	0.55	0
FQNP112	2.54	Alta	NO	NO	0.55	0
FQNP443	2.79	Alta	SI	NO	0.55	0
CINV1	4.64	Alta	SI	SI	0.55	0

Los métodos de predicción implementados en SwissADME han sido ampliamente documentados por Antoine *et al.*⁸³ Por ejemplo, la propiedad “consenso de *log Po/w*” promedia los valores de coeficiente de solubilidad en octanol/agua calculados por cinco modelos distintos, en donde valores más altos sugieren mayor lipofilidad. Las propiedades “absorción GI” y “permeabilidad de BBB” se predicen a partir de la relación de *log P* y el TPSA de cada molécula, es decir, son métricas relativas al área de contacto y la lipofilidad de cada molécula. Por otro lado, basado en la similitud estructural contra un set de 1033 moléculas referencia, el servidor agrupa las moléculas consultadas y define si existe similitud relativa con aquellas moléculas “substrato” y “no-substrato” de la glicoproteína P. El puntaje de biodisponibilidad se expresa como la probabilidad de que la distribución de la concentración inicial administrada de la molécula evaluada (en un modelo murino) sea mayor al 10%. Finalmente, las alertas estructurales cuantifican la cantidad de elementos estructurales de las moléculas que podrían surgir durante las fases de evaluación en modelos *in vitro* o *in vivo* y podrían limitar el perfil ADMET de estas moléculas.

6.9 Resumen de resultados

Los resultados del protocolo de cribado virtual con un enfoque consenso se muestran en la Tabla 4. Desde los estudios inherentes al diseño de fármacos basado en los ligandos (cálculos de similitud molecular), pasando por métodos de diseño híbridos (similitud farmacofórica), hasta llegar los enfoques de diseño de fármacos basados en la diana biológica (acoplamiento y dinámica molecular y cálculos de energía de unión). Además, se añaden datos sobre aquellos compuestos que fueron utilizados como controles (**colchicina** y **DJ101**), que han sido reportados previamente como compuestos activos (**FQNP112**) y notas sobre aquellos compuestos con actividad aún desconocida sobre el sistema tubulina-MTs (**FQNP443** y **CINV1**).

Tabla 4. Resumen de resultados del protocolo de cribado virtual propuesto.

Molécula	Similitud estructural con compuestos activos	Puntaje de acoplamiento molecular	Similitud farmacofórica	Interacciones clave durante la dinámica molecular (100 ns)	Predicción de energía de unión*	Notas
Colchicina	---	-10.01	---	SI	5.402	Control (12-140 nM)
DJ-101	SI	-10.24	SI	SI	5.949	Control (3-12 nM)
FQNP112	SI	-9.02	SI	SI	5.883	Previamente reportado como activo (15 μ M)
FQNP443	SI	-7.97	SI	SI	5.182	Probablemente activo
CINV1	SI	-10.02	Parcialmente	Parcialmente	6.486	Posible mecanismo alternativo de unión o inactivo

* Calculado con: *Extended Connectivity Interaction Features*.⁷²

7. DISCUSIÓN

Hay un gran repertorio y diversidad estructural de compuestos que actúan como inhibidores de la polimerización de la tubulina y otros que actúan como inhibidores de la despolimerización de los microtúbulos. No obstante, muchos de ellos tienen un perfil ADMET deficiente que ha limitado su estudio en fases clínicas. Por lo anterior, el desarrollo e implementación de protocolos de cribado virtual con un enfoque consenso permiten proponer sistemáticamente inhibidores

novedosos del sistema tubulina-MTs que además tengan un perfil ADMET mejorado y que permitan priorizar la evaluación *in vitro* de aquellos candidatos con mayor potencial.

Usualmente, los estudios que relacionan la estructura química y la actividad de una serie de compuestos se construyen a partir de datos bioquímicos (ensayos de inhibición directamente en la diana biológica) lo que suele generar información útil sobre las características estructurales necesarias para que un compuesto posea buena actividad. No obstante, estudios recientes han demostrado que construir modelos a partir de datos basados en la inhibición de líneas celulares permite mejorar las predicciones de actividad. Con estos antecedentes, se construyó la primera base de datos de inhibidores reportados con actividad sobre el sistema tubulina-MTs que además presenten actividad contra líneas celulares cancerígenas.

Actualmente, la tecnología de la era de los grandes datos (*big data era*) ha permitido generar, almacenar, curar, administrar, utilizar y transversalizar múltiples datos. Es decir, generar información útil de los datos, y eventualmente conocimientos prácticos de éstos.¹⁵ La farmacológica, la química y cualquier otra ciencia quimio-biológica no deberían ser (en lo absoluto) ajenas a estos avances tecnológicos. En este sentido, este proyecto pretende ofrecer un ejemplo del impacto y la utilidad de las herramientas quimioinformáticas y bioinformáticas en torno al descubrimiento de moléculas activas y fármacos.

En esta sección se discuten los resultados (capítulo 6) derivados de este proyecto de investigación:

- Construcción y curado de una base de datos de compuestos con actividad contra líneas celulares.

Uno de los mayores logros derivados de este proyecto ha sido la creación y curado de 851 compuestos con actividad moduladora sobre el sistema tubulina-MTs. La captura de los datos y estructuras químicas continúa siendo uno de los mayores retos de este tipo de aproximaciones, pues al no utilizar un proceso automatizado en la captura de los datos, existe la posibilidad de generar errores involuntarios. No obstante, el proceso de curar o preparar la base de datos de manera automática permite identificar alguno o algunos de los errores cometidos durante el proceso de captura. Finalmente, el criterio químico y biológico humano complementa los procesos de curado automatizado.

Si se analiza el periodo de tiempo (del año 2010 al 2020) en que se publicaron los compuestos contenidos en la base de datos generada, se podría asegurar que la base de datos está lejos estar “completa”. Es decir, seguramente existen en la literatura estructuras químicas diversas que no han sido contempladas en este protocolo de cribado virtual. No obstante, la base de datos generada está enriquecida de una gran diversidad estructural de compuestos (capítulo 6, sección 3). Esto muestra el valor operativo de esta base de datos.

Es importante enfatizar que los datos de bioactividad contenidos en la base de datos generada provienen de ensayos basados en células. Por lo tanto, implica la afinidad de estos compuestos con su respectiva diana biológica (sistema tubulina-MTs), y también con la capacidad de interactuar favorablemente con un sistema biológico (celular). Por ejemplo, es relevante considerar aspectos de permeabilidad de barreras membranales, así como posibles uniones inespecíficas (además de la interacción con el sistema tubulina-MTs).

- Espacio químico y panoramas de actividad (mapas SAS)

En relación con los compuestos contenidos en la base de datos, los resultados sugieren que existen diferencias fisicoquímicas características que distinguen a los compuestos que interactúan en diferentes sitios de reconocimiento en sistema tubulina-MTs. Por ejemplo, en la Figura 8 se describen propiedades de interés farmacéutico para aquellos compuestos que interactúan en el sitio de unión de los alcaloides de la vinca, del paclitaxel, de la pironetina, de la laulimalida o de la colchicina, donde se observan diferencias claras entre cada grupo de compuestos. A pesar de que estos parámetros no fueron utilizados como criterios principales para predecir compuestos potencialmente activos, estos datos podrían ser empleados para futuros procesos de optimización, ya que ahora se tiene un antecedente de los límites inferiores y superiores de cada propiedad fisicoquímica de interés, específicamente, para los diferentes tipos de moduladores del sistema tubulina-MTs.

Por otro lado, y como se muestra en la Figura 9, existen patrones estructurales en los compuestos contenidos en la base de datos generada, que permitieron identificar pequeños cambios estructurales que modifican la actividad asociada a los compuestos. Esta información, es igualmente útil para futuros procesos de optimización de moléculas diseñadas para actuar en el

sistema tubulina-MTs. Algo interesante de resaltar, y que se ilustra en la Figura 10, es que los núcleos base más frecuentes no están contenidos en los compuestos reportados con mayor actividad, lo que podría sugerir dos posibles tendencias en la publicación de compuestos activos contra el sistema tubulina-MTs: (1) Los autores explícitamente están reutilizando los mismos núcleos base con el objetivo de tratar de optimizarlos, dejando de lado la búsqueda exhaustiva de moléculas con nuevas características estructurales y fisicoquímicas (se estudia una pequeña región del espacio químico); o (2) los núcleos base más activos (y menos frecuentes) podrían haber surgido de largos procesos de optimización previos al año 2010 (fecha de corte para construir esta base de datos).

- Gráfico de constelación

A partir de la fragmentación de los compuestos contenidos en la base de datos generada se identificaron series análogas con alto potencial de ser optimizadas. Por ejemplo, la Figura 11 muestra al núcleo **AS130**, un núcleo que en promedio tiene una alta actividad (color verde) y que además pocas estructuras comparten esta serie análoga (tamaño del punto), lo que lo hace una estructura química interesante para futuras optimizaciones al ser un compuesto novedoso y potente. Además, el gráfico de constelación muestra la clara identificación de "regiones oscuras" (inactivas) en el espacio químico de los inhibidores de tubulina-MTs, por ejemplo, las series análogas con valores de pIC_{50} promedio bajo: **AS16**, **AS23**, **AS68**, **AS92** y **AS96**. Por otro lado, también se identificaron series análogas prometedoras, por ejemplo, las series análogas con pIC_{50} promedio alto, como: **AS2**, **AS9**, **AS43**, **AS112**, **AS130** y **AS133**, que, aunque son series análogas poco exploradas, tienen una actividad promedio alta. Por lo tanto, estas series análogas podrían ser el futuro de nuevos y potentes inhibidores. Sin embargo, y a pesar de su alta actividad promedio, algunas series (por ejemplo, **AS112**) aún podrían tener limitaciones debido a su difícil accesibilidad sintética o su pobre perfil farmacocinético.

- Acoplamiento molecular y construcción del modelo farmacofórico

El acoplamiento molecular es una de las estrategias más utilizadas en el DIFAC. Sin embargo, y como cualquier técnica, el acoplamiento molécula tiene sus limitaciones. Por ejemplo, que los puntajes de acoplamiento (*scoring*) podrían sobreestimar la afinidad de un producto natural (por

ejemplo), esto pues este tipo de compuestos tienden a ser estructuras más complejas y con mayor cantidad de posibles interacciones.²⁶ No obstante, que puedan generar más interacciones no significa que éstas serán estables en un entorno biológico. Es por esto, que, aunque el acoplamiento molecular ofrece resultados que guían en el diseño racional de fármacos, está lejos de suponer una solución predictiva absoluta de la posible actividad de un compuesto. De hecho, en este caso de estudio en particular, los puntajes de acoplamiento entre los compuestos activos e inactivos no presentaron diferencias importantes. Es decir, en promedio los puntajes de acoplamiento de compuestos activos e inactivos fueron similares. Si únicamente se hubiese considerado este criterio, la tasa de casos falsos positivos se incrementaría dramáticamente en nuestro protocolo de cribado virtual.

Los modelos farmacofóricos construidos a partir de los modos de unión proteína-ligando permitieron reunir todas las características electrónicas y estéricas de los inhibidores del sistema tubulina-MTs. Así, el empleo de este método híbrido hizo posible el uso de la información tridimensional de los compuestos y de la diana biológica, lo que enriqueció el análisis generado únicamente por acoplamiento molecular.

No obstante que el acoplamiento molecular y el modelado farmacofórico proporcionan una representación tridimensional precisa de los complejos tubulina-ligandos, estos modelos tienen como limitante el hecho de que no generan sistemas dinámicos. En otras palabras, se analiza solo un estado conformacional de los múltiples existentes en un entorno biológico. Además, en el protocolo de cribado virtual no se considera ningún aspecto relacionado con la multirresistencia a fármacos, por ejemplo, los generados por mutaciones puntuales en la tubulina y los cambios conformacionales derivados de esto en los microtúbulos.¹

- Dinámica molecular

Las simulaciones por dinámica molecular permitieron analizar temporal y espacialmente las posibles interacciones de los ligandos, así como su estabilidad con la tubulina. Se pudo estructurar un protocolo que logra reproducir las características de unión para las moléculas con la información cristalográfica disponible (**colchicina** y **DJ101**). Esto permitió validar las interacciones potenciales entre las moléculas propuestas y la tubulina. Sin embargo, el sistema dinámico, nuevamente, está lejos de estar completo. Por ejemplo, se necesitaría modelar una parte

mayor, y más representativa, de un microtúbulo para poder modelar los cambios conformacionales asociados a la modulación del sitio de unión de la colchicina, el taxol, o cualquier otro en las α - y β -tubulinas.

- Cálculo de propiedades ADMET

Aunque estos criterios no fueron utilizados para priorizar la selección de compuestos con actividad moduladora potencial del sistema tubulina-MTs, se generó información útil para procesos de optimización y/o formulación de los compuestos de interés. Previo a esto, será indispensable la evaluación biológica de estos compuestos en distintos modelos enzimáticos y celulares para corroborar su actividad y justificar su posterior optimización.

8. CONCLUSIONES

Se construyó la primera base de datos de inhibidores reportados con actividad sobre el sistema tubulina-MTs que además muestran actividad contra líneas celulares cancerígenas. Esto permitirá guiar estudios posteriores de relaciones estructura-actividad (SAR) en un contexto biológico a nivel celular. Es decir, los datos basados en células contienen información implícita que no es posible analizar a través de ensayos bioquímicos. Se propone el uso de esta información para generar métodos predictivos SAR que permitan reducir la tasa de error en las evaluaciones biológicas de nuevos inhibidores de los sistemas tubulina-MTs.

El presente trabajo exploró y describió el método SAR bajo el concepto de panorama de actividad y el análisis de contenido de núcleos base de inhibidores del sistema tubulina-MTs con actividad reportada contra líneas celulares de cáncer. Este trabajo reveló que los inhibidores actuales de tubulina-MTs de origen natural constituyen una serie de compuestos con una diversidad estructural limitada. Se concluye que existen diferencias en el perfil fisicoquímico de los compuestos en función de su sitio de unión a la tubulina, ya sea en el sitio de la colchicina, de los alcaloides de la vinca, de la pironetina, del paclitaxel o de la laulimalida.

Cinco derivados de PNs se identificaron como inhibidores potenciales del sistema tubulina-MTs. Tres de ellos tienen reportes experimentales asociados que sustentan su actividad inhibitoria sobre el sistema tubulina-MTs.

9. PERSPECTIVAS

Una de las etapas lógicas e inmediatas de esta investigación es la evaluación de los compuestos **CINV1** y **FQNP443** en ensayos *in vitro* con el objetivo de determinar experimentalmente su actividad sobre el sistema tubulina-MTs.

Además, durante el desarrollo de esta investigación, se identificaron series análogas de interés biológico (por ejemplo, **AS2**, **AS9**, **AS43**, **AS112**, **AS130** y **AS133**). Estas series podrían ser el punto de partida para la síntesis y evaluación biológica de los que pueden ser análogos semisintéticos de productos naturales nuevos, diversos y más potentes que actúen como inhibidores del sistema tubulina-MTs.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Binarová, P., Tuszynski, J. (2019). Tubulin: structure, functions and roles in disease. *Cells*, **8** (10), 1294. doi:10.3390/cells8101294
2. Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., Janke, C. (2017). The tubulin code at a glance. *Journal of Cell Science*, **130** (8), 1347–1353. doi:10.1242/jcs.199471
3. Fedorov, V. A., Orekhov, P. S., Kholina, E. G., Zhmurov, A. A., Ataulakhanov, F. I., Kovalenko, I. B., Gudimchuk, N. B. (2019). Mechanical properties of tubulin intra- and inter-dimer interfaces and their implications for microtubule dynamic instability. *PLOS Computational Biology*, **15** (8), e1007327. doi:10.1371/journal.pcbi.1007327
4. Arnst, K. E., Banerjee, S., Chen, H., Deng, S., Hwang, D.-J., Li, W., Miller, D. D. (2019). Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, **39** (4), 1398-1426. doi:10.1002/med.21568
5. López-López, E., Cerda-García-Rojas, C. M., Medina-Franco, J. L. (2021). Tubulin inhibitors: a chemoinformatic analysis using cell-based data. *Molecules*, **26** (9), 2483. doi:10.3390/molecules26092483
6. OMS. (2021, 21 septiembre). Cáncer. Consultado el 4 de noviembre de 2021, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
7. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144** (5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
8. Chang, C.-H., Yu, F.-Y., Wu, T.-S., Wang, L.-T., Liu, B.-H. (2010). Mycotoxin citrinin induced cell cycle G₂/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. *Toxicological Sciences*, **119** (1), 84–92. doi:10.1093/toxsci/kfq309
9. WHO. (2021, 21 septiembre). Cancer. Consultado el 4 de noviembre de 2021, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

10. Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P., Motola-Kuba, D., Anaya, P., Rivera-Rivera, S., Cárdenas-Cárdenas, E. (2019). Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gaceta Mexicana de Oncología*, **17** (1). doi: 10.24875/j.gamo.m18000158
11. Anderson, R.J., Groundwater, P.W., Todd, A., Moore, A.J. (2009). An overview of cancer treatments. *The Pharmaceutical Journal*, **283**, 511-512.
12. López-López, E., Barrientos-Salcedo, C., Prieto-Martínez, F. D., Medina-Franco, J. L. (2020). *In silico* tools to study molecular targets of neglected diseases: inhibition of TcSir2rp3, an epigenetic enzyme of *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, capítulo 7, **122**, 203-229. doi:10.1016/bs.apcsb.2020.04.001
13. Martin, L., Hutchens, M., Hawkins, C., Radnov, A. (2017). How much do clinical trials cost? *Nature Reviews Drug Discovery*, **16** (6), 381–382. doi:10.1038/nrd.2017.70
14. Prieto-Martínez, F. D., López-López, E., Eurídice Juárez-Mercado, K., Medina-Franco, J. L. (2019). Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. In *Silico Drug Design*, 19–44. doi:10.1016/b978-0-12-816125-8.00002-x
15. López-López, E., Bajorath, J., Medina-Franco, J. L. (2020). Informatics for chemistry, biology, and biomedical sciences. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **61** (1), 26–35. doi:10.1021/acs.jcim.0c01301
16. Bacilieri, M., Moro, S. (2006). Ligand-based drug design methodologies in drug discovery process: An Overview. *Current Drug Discovery Technologies*, **3** (3), 155–165. doi:10.2174/157016306780136781
17. Śledź, P., Caflisch, A. (2018). Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, **48**, 93–102. doi:10.1016/j.sbi.2017.10.010
18. Santibáñez-Morán, M. G., López-López, E., Prieto-Martínez, F. D., Sánchez-Cruz, N., Medina-Franco, J. L. (2020). Consensus virtual screening of dark chemical matter and food chemicals uncover potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *RSC Advances*, **10** (42), 25089–25099. doi:10.1039/d0ra04922k

19. López-López, E., Naveja, J. J., Medina-Franco, J. L. (2019). DataWarrior: an evaluation of the open-source drug discovery tool. *Expert opinion on drug discovery*, **14** (4), 335–341. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1581170>
20. Maggiora, G., Vogt, M., Stumpfe, D., Bajorath, J. (2013). Molecular similarity in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, **57** (8), 3186–3204. doi:10.1021/jm401411z
21. Stumpfe, D., Bajorath, J. (2011). Similarity searching. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, **1** (2), 260–282. doi:10.1002/wcms.23
22. Lipinski, C., Hopkins, A. (2004). Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, **432** (7019), 855–861. doi:10.1038/nature03193
23. Oprea, T. I. (2002). Chemical space navigation in lead discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6** (3), 384–389. doi:10.1016/s1367-5931(02)00329-0
24. Osolodkin, D. I., Radchenko, E. V., Orlov, A. A., Voronkov, A. E., Palyulin, V. A., Zefirov, N. S. (2015). Progress in visual representations of chemical space. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **10** (9), 959–973. doi:10.1517/17460441.2015.1060216
25. Medina-Franco, J., Martinez-Mayorga, K., Giulianotti, M., Houghten, R., Pinilla, C. (2008). Visualization of the chemical space in drug discovery. *Current Computer Aided Drug Design*, **4** (4), 322–333. doi:10.2174/157340908786786010
26. Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento molecular: avances recientes y retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **21**, e20180143. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143
27. Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., Andricopulo, A. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, **20** (7), 13384–13421. doi:10.3390/molecules200713384
28. Verdonk, M. L., Taylor, R. D., Chessari, G., Murray, C. W. (n.d.). Illustration of current challenges in molecular docking. *Structure-Based Drug Discovery*, 201–221. doi:10.1007/1-4020-4407-0_8

29. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., Cavalli, A. (2016). Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, **59** (9), 4035–4061. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01684
30. Yang, S.-Y. (2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, **15** (11-12), 444–450. doi:10.1016/j.drudis.2010.03.013
31. Wermuth, C. G. (2006). Pharmacophores: historical perspective and viewpoint from a medicinal chemist. *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*, Eds. Langer, T., Hoffmann, R. D., capítulo 1, volumen 32, 1–13. doi:10.1002/3527609164.ch1
32. Schaller, D., ŠRibar, D., Noonan, T., Deng, L., Nguyen, T. N., Pach, S., Machalz, D., Bermudez, M., Wolber, G. (2020). Next generation 3D pharmacophore modeling. *WIREs Computational Molecular Science*, **10** (4), e1468. doi:10.1002/wcms.1468
33. López-López, E., Prieto-Martínez, F., Medina-Franco, J. (2018). Activity landscape and molecular modeling to explore the SAR of dual epigenetic inhibitors: a focus on G9a and DNMT1. *Molecules*, **23** (12), 3282. doi:10.3390/molecules23123282
34. Rayan, A., Raiyn, J., Falah, M. (2017). Nature is the best source of anticancer drugs: indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLOS ONE*, **12** (11), e0187925. doi:10.1371/journal.pone.0187925
35. Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., Pires, I. M. (2018). Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/3149362
36. Cerda-García-Rojas, C. M., Catalán, C. A. N., Muro, A. C., Joseph-Nathan, P. (2008). Vibrational circular dichroism of africanane and lippifoliane sesquiterpenes from *Lippia integrifolia*. *Journal of Natural Products*, **71** (6), 967–971. doi:10.1021/np8000927
37. Cerda-García-Rojas, C. M., Bucio, M. A., Román, L. U., Hernández, J. D., Joseph-Nathan, P. (2004). Preparation of moreliane-derived volatile sesquiterpenes. *Journal of Natural Products*, **67** (2), 189–193. doi:10.1021/np030354e

38. Rivero-Cruz, J. F., Macías, M., Cerda-García-Rojas, C. M., Mata, R. (2003). A new phytotoxic nonenolide from *Phoma herbarum*. *Journal of Natural Products*, **66** (4), 511–514. doi:10.1021/np020501t
39. Nair, P., James, F. V. (2019). Oligo-metastatic carcinoma cervix: a few do extremely well. *Cancer Studies and Molecular Medicine – Open Journal*, **5** (1), 23–25. doi:10.17140/csmmoj-5-128
40. Seca, A., Pinto, D. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International Journal of Molecular Sciences*, **19** (1), 263. doi:10.3390/ijms19010263
41. Chávez-Estrada, E. J., Cerda-García-Rojas, C. M., Román-Marín, L. U., Hernández-Hernández, J. D., Joseph-Nathan, P. (2020). Synthesis, molecular docking, and saturation-transfer difference NMR spectroscopy of longipinane derivatives as novel microtubule stabilizers. *Journal of Molecular Structure*, **1218**, 128519. doi:10.1016/j.molstruc.2020.12851
42. Bañuelos-Hernández, A. E., Mendoza-Espinoza, J. A., Pereda-Miranda, R., Cerda-García-Rojas, C. M. (2014). Studies of (–)-pironetin binding to α -tubulin: conformation, docking, and molecular dynamics. *The Journal of Organic Chemistry*, **79** (9), 3752–3764. doi:10.1021/jo500420j
43. Bennett, M. J., Barakat, K., Huzil, J. T., Tuszynski, J., Schriemer, D. C. (2010). Discovery and characterization of the laulimalide-microtubule binding mode by mass shift perturbation mapping. *Chemistry & Biology*, **17** (7), 725–734. doi:10.1016/j.chembiol.2010.05.01
44. Naaz, F., Haider, M. R., Shafi, S., Yar, M. S. (2019). Anti-tubulin agents of natural origin: targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **171**, 310–331. doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.025
45. Romano, J. D., Tatonetti, N. P. (2019). Informatics and computational methods in natural product drug discovery: a review and perspectives. *Frontiers in Genetics*, **10**, 368. doi:10.3389/fgene.2019.00368

46. Guo, Q., Zhang, H., Deng, Y., Zhai, S., Jiang, Z., Zhu, D., Wang, L. (2020). Ligand- and structural-based discovery of potential small molecules that target the colchicine site of tubulin for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **196**, 112328. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112328
47. Shen, Y.-N., Lin, L., Qiu, H.-Y., Zou, W.-Y., Qian, Y., Zhu, H.-L. (2015). The design, synthesis, in vitro biological evaluation and molecular modeling of novel benzenesulfonate derivatives bearing chalcone moieties as potent anti-microtubulin polymerization agents. *RSC Advances*, **5** (30), 23767–23777. doi:10.1039/c4ra12108b
48. Kamal S.U., Mekheimer A.R., Mohamed A.E. (2019). Recent developments in the synthesis of cinnoline derivatives. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **16** (6), 578 - 588. doi:10.2174/1570193X15666180712124148
49. Lin Y, Zhang M, Lu Q, *et al.* (2019). A novel chalcone derivative exerts anti-inflammatory and anti-oxidant effects after acute lung injury. *Aging*, **11** (18):7805-7816. doi:10.18632/aging.102288
50. Sayeed, I. B., Lakshma Nayak, V., Shareef, M. A., Chouhan, N. K., Kamal, A. (2017). Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine–propenone conjugates as potent tubulin inhibitors. *MedChemComm*, **8** (5), 1000–1006. doi:10.1039/c7md00043j
51. Miao, T.-T., Tao, X.-B., Li, D.-D., Chen, H., Jin, *et al.* (2018). Synthesis and biological evaluation of 2-aryl-benzimidazole derivatives of dehydroabiatic acid as novel tubulin polymerization inhibitors. *RSC Advances*, **8** (31), 17511–17526. doi:10.1039/c8ra02078g
52. Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., Wu, Q. (2021). Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. *Biomolecules*, **11** (6), 894. doi:10.3390/biom11060894
53. Sankara Rao, N., Lakshma Nayak, V., Subba Rao, A. V., Ali Hussaini, S. M., Sunkari, S., Alarifi, A., Kamal, A. (2016). Arylcinnamido-propionone conjugates as tubulin polymerization inhibitors and apoptotic inducers. *Arabian Journal of Chemistry*, **12** (8), 4740-4755. doi:10.1016/j.arabjc.2016.07.014
54. Wang, C., Li, Y., Liu, T., Wang, Z., Zhang, Y., Bao, K., Wu, Y., Guan, Q., Zuo, D., Zhang, W. (2020). Design, synthesis and evaluation of antiproliferative and antitubulin activities of 5-methyl-4-aryl-3-(4-arylpiperazine-1-carbonyl)-4H-1,2,4-triazoles. *Bioorganic Chemistry*, **104**, 103909. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103909

55. Yang, F., Jian, X.-E., Diao, P.-C., Huo, X.-S., You, W.-W., Zhao, P.-L. (2020). Synthesis, and biological evaluation of 3,6-diaryl-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridine analogues as new potent tubulin polymerization inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **204**, 112625. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112625
56. Li, Q., Jian, X. E., Chen, Z. R., Chen, L., Huo, X. S., Li, Z. H., You, W. W., Rao, J. J., Zhao, P. L. (2020). Synthesis and biological evaluation of benzofuran-based 3,4,5-trimethoxybenzamide derivatives as novel tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, **102**, 104076. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104076
57. Huang, L., Liu, M., Man, S., Ma, D., Feng, D., Sun, Z., Guan, Q., Zuo, D., Wu, Y., Zhang, W., Bao, K. (2020). Design, synthesis and bio-evaluation of novel 2-aryl-4-(3,4,5-trimethoxy-benzoyl)-5-substituted-1,2,3-triazoles as the tubulin polymerization inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **186**, 111846. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111846
58. Diao, P. C., Jian, X. E., Chen, P., Huang, C., Yin, J., Huang, J. C., Li, J. S., Zhao, P. L. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of novel indole-based oxalamide and aminoacetamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **30** (2), 126816. doi:10.1016/j.bmcl.2019.126816
59. Oliva, P., Romagnoli, R., Manfredini, S., Brancale, A., Ferla, S., Hamel, E., Ronca, R., Maccarinelli, F., Giacomini, A., Rruga, F., Mariotto, E., Viola, G., Bortolozzi, R. (2020). Design, synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation of 2-amino-3-arylbenzo[b]furan derivatives as highly potent tubulin polymerization inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **200**, 112448. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112448
60. Shao, Y.-Y., Yin, Y., Lian, B.-P., Leng, J.-F., Xia, Y.-Z., Kong, L.-Y. (2020). Synthesis and biological evaluation of novel shikonin-benzo[b]furan derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **190**, 112105. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112105
61. Romagnoli, R.; Prencipe, F.; Oliva, P.; Kimatrai Salvador, M.; Brancale, A.; Ferla, S.; Hamel, E.; Viola, G.; Bortolozzi, R.; Persoons, L.; *et al.* (2020) Design, synthesis and biological evaluation of 2-alkoxycarbonyl-3-anilinoindoles as a new class of potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorganic Chemistry*, **97**, 103665. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103665

62. Tang, H., Cheng, J., Liang, Y., Wang, Y. (2020). Discovery of a chiral fluorinated azetidin-2-one as a tubulin polymerisation inhibitor with potent antitumour efficacy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **197**, 112323. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112323
63. Mirzaei, S., Eisvand, F., Hadizadeh, F., Mosaffa, F., Ghasemi, A., Ghodsi, R. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of novel 5,6,7-trimethoxy-N-aryl-2-styrylquinolin-4-amines as potential anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, **98**, 103711. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103711
64. Li, G., Wang, Y., Li, L., Ren, Y., Deng, X., Liu, J., Wang, W., Luo, M., Liu, S., Chen, J. (2020). Design, synthesis, and bioevaluation of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site with potent anticancer activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **202**, 112519. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112519
65. Poornima, B., Siva, B., Venkanna, A., Shankaraiah, G., Jain, N., Yadav, D. K., Misra, S., Babu, K. S. (2017). Novel gomisin B analogues as potential cytotoxic agents: design, synthesis, biological evaluation and docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **139**, 441–453. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.076
66. Triarico, S., Romano, A., Attinà, G., Capozza, M. A., Maurizi, P., Mastrangelo, S., Ruggiero, A. (2021). Vincristine-induced peripheral neuropathy (vipn) in pediatric tumors: mechanisms, risk factors, strategies of prevention and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, **22** (8), 4112. doi:10.1016/j.bmcl.2018.06.044
67. Maklad, R. M., AbdelHafez, E.-S. M. N., Abdelhamid, D., Aly, O. M. (2020). Tubulin Inhibitors: Discovery of a new scaffold targeting extra-binding residues within the colchicine site through anchoring substituents properly adapted to their pocket by a semi-flexible linker. *Bioorganic Chemistry*, **99**, 103767. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103767
68. Weininger, D. (1988). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **28** (1), 31–36. doi:10.1021/ci00057a005
69. Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE); Chemical Computing Group Inc.: Montreal, QC, Canada, 2020; Available online: <http://www.chemcomp.com> (accessed on 8 January 2021).
70. Van der Maaten, L.; Hinton, G. (2008). Visualizing data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*, **9**, 2579–2605.
71. Medina-Franco, J. L. (2012). Scanning structure–activity relationships with structure–activity similarity and related maps: from consensus activity cliffs to selectivity switches.

- Journal of Chemical Information and Modeling*, **52** (10), 2485–2493. doi:10.1021/ci300362x
72. Rogers, D., Hahn, M. (2010). Extended-connectivity fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **50** (5), 742–754. doi:10.1021/ci100050t
73. Guha, R., Van Drie, J. H. (2008). Structure–activity landscape index: identifying and quantifying activity cliffs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **48** (3), 646–658. doi:10.1021/ci7004093
74. González-Medina, M., Méndez-Lucio, O., Medina-Franco, J. L. (2017). Activity landscape plotter: a web-based application for the analysis of structure–activity relationships. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **57** (3), 397–402. doi:10.1021/acs.jcim.6b00776
75. Bemis, G. W., Murcko, M. A. (1996). The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *Journal of Medicinal Chemistry*, **39** (15), 2887–2893. doi:10.1021/jm9602928
76. Berthold, M. R., Cebron, N., Dill, F., Gabriel, T. R., Kötter, T., Meinl, T., Ohl, P., Thiel, K., Wiswedel, B. (2009). KNIME—the Konstanz information miner. *ACM SIGKDD Explorations Newsletter*, **11** (1), 26–31. doi:10.1145/1656274.1656280
77. Medina-Franco, J. L., Naveja, J. J., López-López, E. (2019). Reaching for the bright StARs in chemical space. *Drug Discovery Today*. **24** (11), 2162–2169. doi:10.1016/j.drudis.2019.09.013
78. Naveja, J. J., Medina-Franco, J. L. (2019). Finding constellations in chemical space through core analysis. *Frontiers in Chemistry*, **7**, 510. doi:10.3389/fchem.2019.00510
79. Kellogg, E. H., Hejab, N. M., Howes, S., Northcote, P., Miller, J. H., Díaz, J. F., Downing, K. H., Nogales, E. (2017). Insights into the distinct mechanisms of action of taxane and non-taxane microtubule stabilizers from Cryo-EM structures. *Journal of Molecular Biology*, **429** (5), 633–646. doi:10.1016/j.jmb.2017.01.001
80. Sánchez-Cruz, N., Medina-Franco, J. L., Mestres, J., Barril, X. (2020). Extended connectivity interaction features: improving binding affinity prediction through chemical description. *Bioinformatics*. **37** (10), 1376–1382. doi:10.1093/bioinformatics/btaa98
81. Bowers, K.J.; Chow, D.E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; *et al.* Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. In Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, FL, USA, 11–17 November 2006.

82. Cob-Calan, N. N., Chi-Uluac, L. A., Ortiz-Chi, F., Cerqueda-García, D., Navarrete-Vázquez, G., Ruiz-Sánchez, E., Hernández-Núñez, E. (2019). Molecular docking and dynamics simulation of protein β -tubulin and antifungal cyclic lipopeptides. *Molecules*, **24** (18), 3387. doi:10.3390/molecules24183387
83. Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, **7**, 42717. doi:10.1038/srep42717
84. Naveja, J. J., Vogt, M., Stumpfe, D., Medina-Franco, J. L., Bajorath, J. (2019). Systematic extraction of analogue series from large compound collections using a new computational compound–core relationship method. *ACS Omega*, **4** (1), 1027–1032. doi:10.1021/acsomega.8b03390
85. Beutler, J. A., Hamel, E., Vlietinck, A. J., Haemers, A., Rajan, P., Roitman, J. N., Cardellina, J. H., Boyd, M. R. (1998). Structure–activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. *Journal of Medicinal Chemistry*, **41** (13), 2333–2338. doi:10.1021/jm970842h
86. Arnst, K. E., Wang, Y., Hwang, D. J., Xue, Y., Costello, T., Hamilton, D., Chen, Q., Yang, J., Park, F., Dalton, J. T., Miller, D. D., Li, W. (2017). A potent, metabolically stable tubulin inhibitor targets the colchicine binding site and overcomes taxane resistance. *Cancer Research*, **78** (1), 265–277. doi:10.1158/0008-5472.can-17-0577

11. ANEXOS

Anexo 1. Portada del artículo original derivado de los resultados de este proyecto de investigación.



Article

Tubulin Inhibitors: A Chemoinformatic Analysis Using Cell-Based Data

Edgar López-López ^{1,2}, Carlos M. Cerda-García-Rojas ^{1,*} and José L. Medina-Franco ^{2,*}

¹ Departamento de Química y Programa de Posgrado en Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, Mexico City 07000, Mexico; elopez.lopez@cinvestav.mx

² DIFACQUIM Research Group, Department of Pharmacy, School of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

* Correspondence: ccerda@cinvestav.mx (C.M.C.-G.-R.); medinajl@unam.mx (J.L.M.-F)

Abstract: Inhibiting the tubulin-microtubules (Tub-Mts) system is a classic and rational approach for treating different types of cancers. A large amount of data on inhibitors in the clinic supports Tub-Mts as a validated target. However, most of the inhibitors reported thus far have been developed around common chemical scaffolds covering a narrow region of the chemical space with limited innovation. This manuscript aims to discuss the first activity landscape and scaffold content analysis of an assembled and curated cell-based database of 851 Tub-Mts inhibitors with reported activity against five cancer cell lines and the Tub-Mts system. The structure–bioactivity relationships of the Tub-Mts system inhibitors were further explored using constellations plots. This recently developed methodology enables the rapid but quantitative assessment of analog series enriched with active compounds. The constellations plots identified promising analog series with high average biological activity that could be the starting points of new and more potent Tub-Mts inhibitors.

Keywords: activity landscape; analog series; chemical space; cell-based assays; chemoinformatics; drug discovery; constellation plots; microtubules; scaffold; structure–property relationships



Citation: López-López, E.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Medina-Franco, J.L. Tubulin Inhibitors: A Chemoinformatic Analysis Using Cell-Based Data. *Molecules* **2021**, *26*, 2483. <https://doi.org/10.3390/molecules26092483>

Academic Editor: Martin Vogt

Received: 14 March 2021

Accepted: 20 April 2021

Published: 24 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

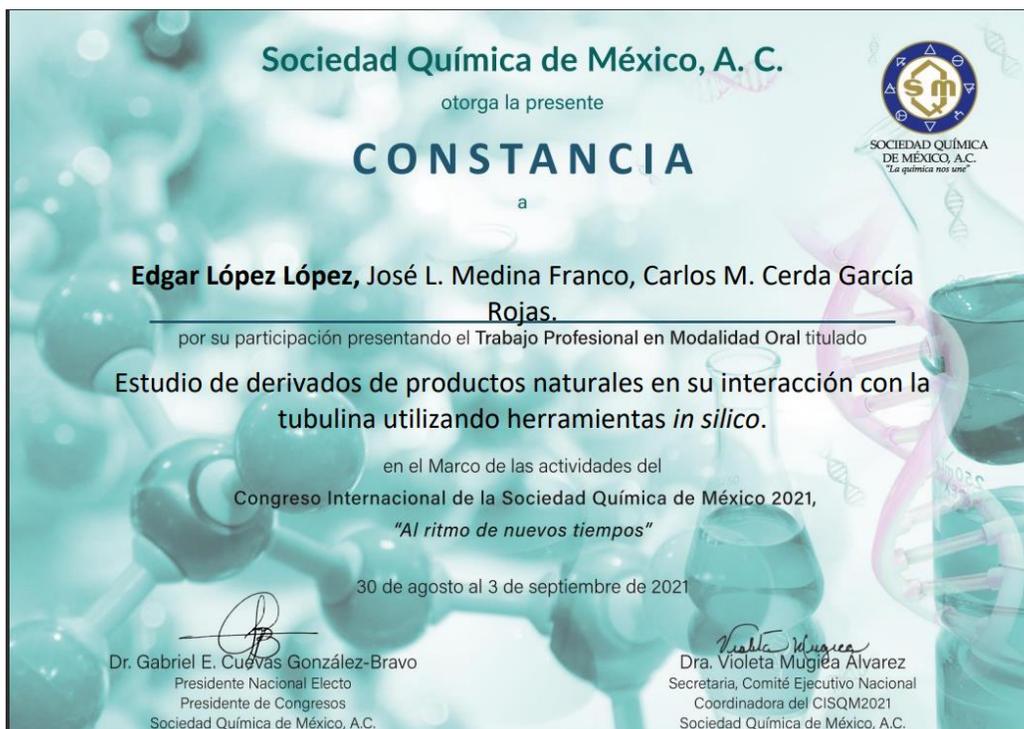


Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

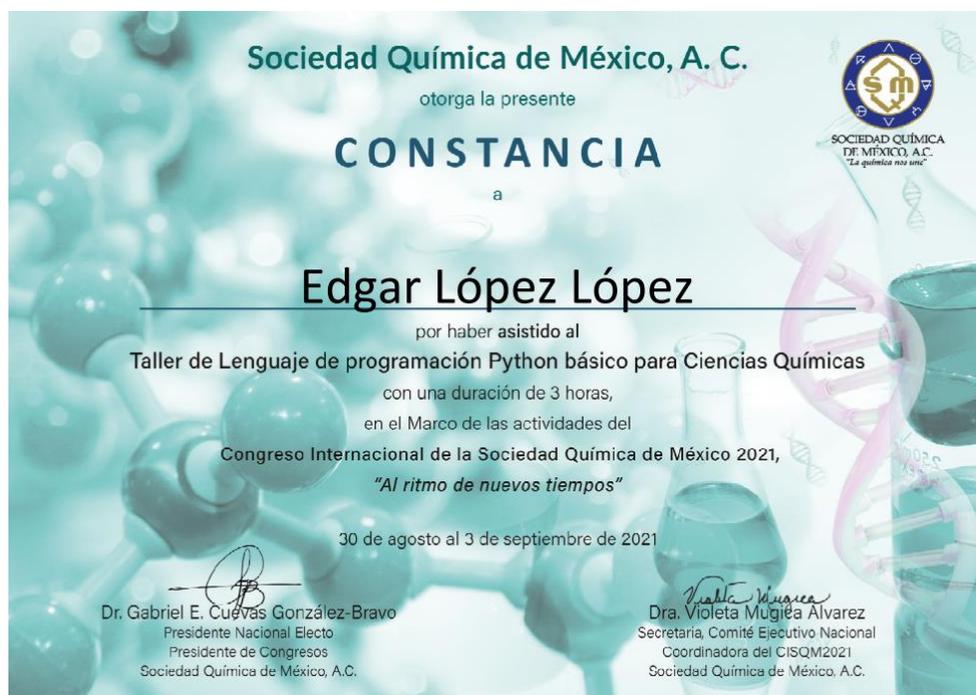
1. Introduction

The α,β -tubulin heterodimer is the basic structural unit of microtubules. It is one of the most studied cancer therapy targets due to its significant role in cellular and tumor proliferation. It actively participates in forming the centrosome, an essential organelle, during the G₂/M phase of the cell cycle [1]. The microtubule's dynamic activity is guided by a polymerization and depolymerization process which can be modified by interaction with small molecules with different binding sites on the Tub-Mts system, e.g., colchicine, taxanes, pironetin, vinca alkaloids, and laulimalide derivatives, as shown in Figure 1. In this way, the modulation of polymerization/depolymerization of the microtubules allows for pharmacological regulation of the cell cycle, which is a crucial event in cancer [2]. According to the U.S. National Institute of Health (www.clinicaltrials.gov, accessed on 23 April 2021), there are several ongoing clinical studies in different phases related to tubulin inhibition: I (1604 studies), II (3771 studies), III (1410 studies), and IV (182 studies), that are analyzing colchicine derivatives (e.g., ombrabulin), taxanes (e.g., docetaxel), vinca alkaloids (e.g., ALB 109564) or laulimalide derivatives (e.g., epothilone D and eribulin). Although currently there are no pironetin analogs in clinical trials, pironetin is the first compound found to have the ability to covalently bind to microtubules, which gives it the capacity to inhibit the growth of cancer cells that are resistant to conventional treatments (derivatives of the vinca or paclitaxel) [3]. The small molecules are of synthetic, semi-synthetic, or natural origin. Figure 1 shows that the main binding sites are distributed along the microtubule. Additionally, the flexibility of microtubules' quaternary structure has limited classical structure-based drug design approaches, such as rigid molecular docking. Several

Anexo 2. Constancia de haber presentado el trabajo derivado de esta tesis de maestría en formato “modalidad oral” dentro del Congreso Internacional de la Sociedad de Química de México A.C.



Anexo 3. Constancia de haber cursado el Taller de Lenguaje de programación Python básico para Ciencias Químicas dentro del Congreso Internacional de la Sociedad de Química de México A.C.



Anexo 4. Constancia de haber cursado el *Workshop* “Introducción a la inteligencia artificial en la química” dentro del 4ta edición del “*International Meeting on Artificial Intelligence and its Applications*”.



Anexo 5. Constancia de haber cursado el *Workshop* “Chemical graph neural networks” dentro del 4ta edición del “*International Meeting on Artificial Intelligence and its Applications*”.



Anexo 6. Constancia de impartición de conferencia "Quimioinformática como una herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos" dentro del 5° Simposio de Ciencias Farmacéuticas – UV.



5° Simposio de Ciencias Farmacéuticas

ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA

LA ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA A.C.

Otorga la presente constancia a:

C.M.C. EDGAR LÓPEZ LÓPEZ

Por su destacada participación como **PONENTE**

Con el tema: "Quimioinformática como una herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos"

Por su destacada participación en el quinto simposio de ciencias farmacéuticas, llevado a cabo de manera virtual del 2 al 4 de septiembre de 2021. Con duración de 9 horas

Rachel Martínez Martínez
Rachel Martínez Martínez
COORDINADOR GENERAL DE LA REAFM XALAPA-VERACRUZ

Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González
Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González
PRESIDENTA DE LA ASOCIACIÓN FARMACÉUTICA MEXICANA

Dr. Eduardo Rivadeneyra Domínguez
Dr. Eduardo Rivadeneyra Domínguez.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE Q.F.B. UNIVERSIDAD VERACRUZANA.

Anexo 7. Constancia de impartición del curso-taller “Herramientas web para analizar el espacio químico y espacios quimiogenómicos” dentro del VII Simposio: Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos – UNAM.



RE: Constancia de impartición de curso

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio de la presente hago constar que el **Q. C. Edgar López López** participó activamente en la enseñanza del curso-taller **Herramientas web para analizar el espacio químico y espacios quimiogenómicos**, que se impartió en forma virtual el 28 y 29 de junio. El curso fue parte de las actividades del VII Simposio: Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos organizado por el Colegio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la UNAM.

Se extiende la presente Constancia para los fines que convengan al interesado.

Atentamente,

‘POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU’

29 de Julio, 2021

Dr. José Luis Medina Franco

Profesor de Carrera “B” de T.C., Definitivo.
Facultad de Química, Edificio F, cubículo 305
Universidad Nacional Autónoma de México
Tel: +52(55)-56223899, ext. 44458
medinajl@unam.mx
www.difacquim.com

Anexo 8. Reconocimiento por impartir la conferencia “La mujer y la niña en la ciencia” – ITSMT.



Anexo 9. Portada de la perspectiva publicada durante el periodo correspondiente al programa de maestría. Esta publicación no se derivó de los resultados principales de esta tesis, sin embargo, surge de la aplicación del conocimiento adquirido (en cursos teóricos, impartidos por los profesores del departamento de Farmacología del CINVESTAV) en otras áreas del conocimiento (p. ej., inteligencia artificial, bioinformática y quimioinformática) además de farmacología y química.

Informatics for Chemistry, Biology, and Biomedical Sciences

Edgar López-López, Jürgen Bajorath,* and José L. Medina-Franco*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01301>

Read Online

ACCESS |

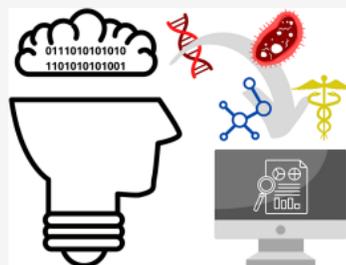
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

Downloaded via Edgar Lopez on January 1, 2021 at 14:30:10 (UTC).
See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.

ABSTRACT: Informatics is growing across disciplines, impacting several areas of chemistry, biology, and biomedical sciences. Besides the well-established bioinformatics discipline, other informatics-based interdisciplinary fields have been evolving over time, such as chemoinformatics and biomedical informatics. Other related research areas such as pharmacoinformatics, food informatics, epinformatics, materials informatics, and neuroinformatics have emerged more recently and continue to develop as independent subdisciplines. The goals and impacts of each of these disciplines have typically been separately reviewed in the literature. Hence, it remains challenging to identify commonalities and key differences. Herein, we discuss in context three major informatics disciplines in the natural and life sciences including bioinformatics, chemoinformatics, and biomedical informatics and briefly comment on related subdisciplines. We focus the discussion on the definitions, historical background, actual impact, main similarities, and differences and evaluate the dissemination and teaching of bioinformatics, chemoinformatics, and biomedical informatics.



INTRODUCTION

Oxford's dictionary¹ defines *informatics* as "the study of processes for storing and obtaining information". Cambridge's dictionary² defines informatics as a discipline that "studies the structure, behavior, and interactions of natural and artificial systems that store, process, and communicate information". Without doubt, computers have played a significant role in storing, processing, and disseminating information. Accordingly, Oxford's dictionary defines information as "data as processed, stored, or transmitted by a computer" in computing. As such, the critical importance of computers to rapidly transform data or facts into information and information into knowledge through inductive learning has been steadily increasing.³

Chemistry, biology, and biomedical sciences rely on data collected in numerous ways, for instance, through experimental observations and measurements, medical observations, or computer simulations, to name a few. Advances in technologies such as high-throughput synthesis and testing, automated, robotic miniaturized sequencing, proteomics, glycomics, lipidomics, and other "-omics" approaches are examples of the main drivers of informatics concerning the massive volumes of data that are generated. With the advent of "big data" across many fields, the amount of information and its complexity are growing exponentially, accompanied by increasing demands for advancements in informatics in terms of computational power and information networking infrastructure to precisely store, process, disseminate, model, analyze, and predict such information. For instance, from 2006 to 2018, data related to investigational drugs available in

the DrugBank database increased by almost 300%, drug–drug interactions data by nearly 600%, and the number of single nucleotide polymorphisms (SNP)-associated drug effects increased by more than 3000%.⁴ Close relationships between chemistry, biology, and medicine (and more confined or specialized areas such as food chemistry, material, and polymer sciences, or neurobiology) with informatics have prompted the development of specific research disciplines that interface informatics with other fields. Relationships between such research fields are illustrated schematically in Figure 1. For our discussion, we organize the major research fields associated with informatics into three predominant areas: bioinformatics, chemoinformatics, and biomedical informatics. There are other informatics-related subdisciplines evolving around the three main fields (Figure 1) that are also discussed in the following sections. Additional relationships could be established that would further extend and complicate the picture presented in Figure 1.

Historically, bioinformatics evolved as an informatics discipline in the life sciences during the 1960s as a natural consequence of using informatics in healthcare that already began in the 1950s (*vide infra*). In addition, chemical information (science) and chemoinformatics (cheminfor-

Received: November 9, 2020

Anexo 10. Portada de perspectiva publicada durante el periodo correspondiente al programa de maestría. Esta publicación no se derivó de los resultados principales de esta tesis, sin embargo, surge de la aplicación de las habilidades técnicas que he desarrollado durante la elaboración de esta tesis (p. ej., el estudio del espacio químico de inhibidores del sistema tubulina-MTs).

Journal of Computer-Aided Molecular Design
https://doi.org/10.1007/s10822-021-00399-1

PERSPECTIVE



Progress on open chemoinformatic tools for expanding and exploring the chemical space

José L. Medina-Franco¹ · Norberto Sánchez-Cruz¹ · Edgar López-López^{1,2} · Bárbara I. Díaz-Eufracio¹

Received: 10 May 2021 / Accepted: 14 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

The concept of chemical space is a cornerstone in chemoinformatics, and it has broad conceptual and practical applicability in many areas of chemistry, including drug design and discovery. One of the most considerable impacts is in the study of structure–property relationships where the property can be a biological activity or any other characteristic of interest to a particular chemistry discipline. The chemical space is highly dependent on the molecular representation that is also a cornerstone concept in computational chemistry. Herein, we discuss the recent progress on chemoinformatic tools developed to expand and characterize the chemical space of compound data sets using different types of molecular representations, generate visual representations of such spaces, and explore structure–property relationships in the context of chemical spaces. We emphasize the development of methods and freely available tools focusing on drug discovery applications. We also comment on the general advantages and shortcomings of using freely available and easy-to-use tools and discuss the value of using such open resources for research, education, and scientific dissemination.

Keywords Chemoinformatics · Drug discovery · Molecular representation · Open-source · Structure–activity relationships · Webserver

Introduction

Chemical space is a cornerstone concept in chemoinformatics. It serves as a framework to study the chemical compounds that populate or might do so, the "chemical universe" i.e., all compounds that can exist. Although it seems a straightforward idea (in particular, if one associates the idea of the chemical space with the chemical universe), it is not easy to define uniquely. Other subjective and general notions frequently used in chemoinformatics are "similarity" [1], or "diversity," "molecular or structural complexity" [2], "chemical beauty" [3], "descriptors' usefulness", to name a few examples.

The notion of chemical space has numerous practical applications. In drug discovery, chemical space has provided a solid conceptual framework to guide diversity analysis, structure classification, library design, compound selection, and assessment of structure–property and structure–activity relationships (SPR, SAR or SP(A)R) that is a fundamental practice in drug discovery [4]. As commented hereunder, the notion of chemical space is also related to computational chemogenomics, where one aims to predict (and then validate experimentally) the intersection between the chemical and biologically relevant space. Indeed, in the early '60 s, the quantitative analysis of the SAR marked a significant milestone in the history of chemoinformatics and computer-aided drug design [5].

This Perspective aims to discuss advances in the development of chemoinformatic resources to characterize the chemical space of compound data sets using different types of molecular representations, generate visual representations of such spaces, and explore SP(A)R in the context of chemical spaces. In addition to analyzing the currently known chemical space, we comment on recent trends to augment the number of molecules that could be made. We emphasize the development of open tools focused on applications relevant

✉ José L. Medina-Franco
medinajl@unam.mx; jose.medina.franco@gmail.com

¹ DIFACQUIM Research Group, Department of Pharmacy, School of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

² Departamento de Química y Programa de Posgrado en Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, 07000 Mexico City, Mexico

Anexo 11. Portada de artículo original publicado durante el periodo correspondiente al programa de maestría. Esta publicación no se derivó de los resultados principales de esta tesis, sin embargo, surge de la aplicación de las habilidades técnicas que he desarrollado durante la elaboración de esta tesis (p. ej., el estudio del acoplamiento molecular de inhibidores del sistema tubulina-MTs).

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, xxx, xx, 1-9

1

RESEARCH ARTICLE

Monosubstituted Coumarins Inhibit Epinephrine-induced Platelet Aggregation Antiplatelet Effect of Monosubstituted Coumarins

Fausto Alejandro Jiménez-Orozco^{1,*}, Sergio Galicia-Zapatero¹, Edgar López-López^{2,3}, José L. Medina-Franco², Fernando León Cedeño⁴, Mirthala Flores-García⁵, Ana María Mejía-Domínguez⁶ and Aurora de la Peña-Díaz^{1,5}

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, CDMX, México; ²Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, CDMX, México; ³Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), CDMX, México; ⁴Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, CDMX, México; ⁵Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan 14080, CDMX, México; ⁶Banco de Sangre, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan 14080, CDMX, México

Abstract: *Aim:* The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of coumarin and 15 monosubstituted derivatives on the inhibition of human platelet aggregation induced by various pro-aggregatory agonists, particularly by epinephrine.

Background: The emergence of residual platelet reactivity during the use of conventional antiplatelet agents (acetylsalicylic acid and clopidogrel) is one of the main causes of double therapy's therapeutic failure. Platelet adrenoceptors participate in residual platelet reactivity. Therefore, it is necessary to develop new antiplatelet agents that inhibit epinephrine-induced platelet aggregation as a new therapeutic strategy. Information on the antiplatelet activity of coumarins in inhibiting epinephrine-induced aggregation is limited.

ARTICLE HISTORY

Received: October 10, 2020
Revised: March 15, 2021
Accepted: March 29, 2021

DOI:
10.2174/1871525719666210427132808

Objective: The objective of this study was to establish the structure-activity relationship (SAR) of coumarin derivatives with hydroxy, methoxy, and acetoxy groups in different positions of the coumarin nucleus to identify the most active molecules. Moreover, this study aimed to use *in silico* studies to suggest potential drug targets to which the molecules bind to produce antiplatelet effects.

Methods: The platelet aggregation was performed using a Lumi-aggregometer; the inhibitory activity of 16 compounds were evaluated by inducing the aggregation of human platelets ($250 \times 10^3/\mu\text{l}$) with epinephrine (10 μM), collagen (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or ADP (10 μM). The aggregation of control platelets was considered 100% of the response for each pro-aggregatory agonist.

Results: Eleven molecules inhibited epinephrine-induced aggregation, with 3-acetoxycoumarin and 7-methoxycoumarin being the most active. Only coumarin inhibited collagen-induced platelet aggregation, but no molecule showed activity when using ADP as an inducer.

Conclusions: *In silico* studies suggest that most active molecules might have antagonistic interactions in the α_1 and β_2 adrenoceptors. The antiplatelet actions of these coumarins have the potential to reduce residual platelet reactivity and thus contribute to the development of future treatments for patients who do not respond adequately to conventional agents.

Keywords: Antiplatelet agents, residual coumarin derivatives, epinephrine, molecular docking, platelet reactivity, SAR.

1. INTRODUCTION

The inhibition of platelet activity is an important therapeutic strategy for the prevention of arterial thrombosis, my-

ocardial infarction, and strokes. The administration of acetylsalicylic acid combined with clopidogrel, also known as Dual Antiplatelet Therapy (DAT), reduces the incidence of cardiovascular events both in acute coronary syndrome and after percutaneous coronary intervention with coronary stent implantation [1]. However, during such treatment, a significant number of patients develop residual platelet reactivity, which is one of the main causes of therapeutic failure [2]. It has been suggested that α_2 adrenoceptors participate in residual platelet reactivity, and authors have proposed that their

* Address correspondence to this author at the Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 70-297 Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, CDMX, México; Tel +525556232164; E-mail: alejandrojimenezorozco@gmail.com