



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Preparación de ésteres aromáticos de sesquiterpenos y su influencia en la
polimerización de la tubulina**

T E S I S

Que presenta

I.Q. Mitzi Teresa Almeraya Sánchez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Farmacología

Director de la Tesis: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

Esta tesis se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas dentro del Programa de Posgrado en Farmacología con una beca de inversión en el conocimiento otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías con número de registro 1229528.

“Estudio el pasado para intuir el futuro.”

Confucio.

“El conocimiento empieza en el asombro.”

“Solo existe un bien: el conocimiento. Solo hay un mal: la ignorancia.”

Sócrates.

Agradezco y dedico este trabajo a:

Dios y la Virgen María por darme salud, fuerza y motivación para llegar hasta donde me encuentro hoy.

*Mi querida madre, **Emilia Sánchez Osorio**, por ser la luz que guía mi camino, por su amor incondicional, apoyo constante y confianza. Gracias por estar a mi lado, en cada paso de este viaje.*

*Mi hermano **Luis Roberto Almeraya Sánchez**, por sus sabios consejos, apoyo, su amor inquebrantable y sobre todo por creer en mi con todo su corazón. Eres mi mayor orgullo y un ejemplo que siempre seguiré.*

***Héctor Sánchez Moreno**, el hermano que Dios me envió, por su compañía, sus consejos y el cariño con el que siempre me ha brindado. Gracias por ser un pilar fundamental en mi vida y por tu apoyo incondicional.*

*Mi amado **Cristian Guzmán Domínguez**, por ser mi cómplice, mi confidente y mi mayor fan. Gracias por tu amor, apoyo, confianza y por siempre estar presente en cada uno de mis logros. Eres mi guardián y mi compañero inseparable en este camino que recorreremos juntos, te amo.*

Agradecimientos:

*Con mucha admiración y respeto agradezco al **Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas** por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su tutela y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Aprecio enormemente su comprensión, sus valiosos consejos y la atención que siempre me ha ofrecido.*

*A la **Dra. Nury Pérez Hernández** y al **Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo** por sus valiosas aportaciones durante la realización de la presente tesis.*

*A la **Dra. Cecilia Ruiz Ferrer**, por su valiosa amistad, sus sabios consejos, su comprensión y constante asesoramiento durante toda mi estancia en el laboratorio, los cuales fueron fundamentales para la realización de esta tesis.*

*Al **M. en C. Edgar López López**, por sus acertados consejos y valiosas aportaciones durante mi estancia en el laboratorio, las cuales fueron fundamentales y enriquecedoras para la elaboración de este trabajo.*

*A la **Q.F.B. Verónica Reyes Olivares**, la **M. en C. Ma Alvina Bucio Vásquez**, la **Q.F.B. Elvia Celina Álvarez Cisneros** y al **Dr. Julio César Pardo Novoa** por su apoyo incondicional, sus valiosas aportaciones y sabios consejos.*

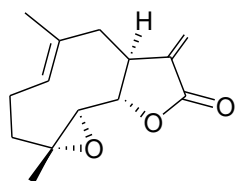
*Al **Dr. Gelacio Martínez Gudiño**, por su amistad, su valiosa guía, aportaciones y sus acertados consejos en la elaboración del presente proyecto.*

*A mis compañeros de la Maestría en Farmacología generación 2023 por caminar juntos en esta travesía de dos años y medio. Especialmente a mi querido amigo **Isaí Jonatan Perales Carrillo** por siempre estar a mi lado y compartirme sus sabios conocimientos, por su inigualable amistad, cariño y confianza, y a mi preciada amiga **Aleydis Dyveke Hernández Terrazas**, por sus consejos, apoyo, comprensión y cariño*

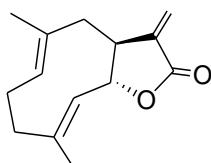
ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	6
RESUMEN DE ESTRUCTURAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 El desarrollo de los productos naturales en la investigación farmacológica.	12
1.2. Productos naturales con propiedades anticancerígenas: Compuestos térpenicos ...	13
1.3 El cáncer.....	15
1.4 La tubulina y los microtúbulos como diana terapéutica.	20
1.5 Productos naturales que interactúan con el heterodímero alfa beta tubulina.	23
1.6 Fármacos naturales: Limitaciones en solubilidad y eficacia.....	26
1.7Análisis de reconocimiento molecular proteína-ligando (<i>docking</i>).	28
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 General	29
4.2 Específicos	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. Obtención y caracterización de los sesquiterpenos funcionalizados.	30
5.2. Determinación de la actividad estabilizante de microtúbulos <i>in vitro</i>	34
5.3. Estudios de reconocimiento molecular <i>in silico</i>	36
5.4. Determinación teórica del log <i>P</i>	43
6. RESUMEN DE RESULTADOS	44
7. CONCLUSIONES.....	44
8. PERSPECTIVAS	45

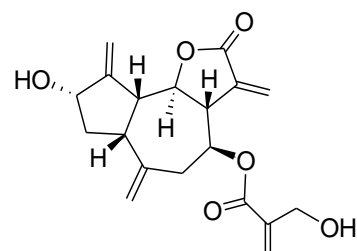
9.	PARTE EXPERIMENTAL (MATERIALES Y MÉTODOS).....	45
9.1	Procedimientos generales para la purificación de compuestos.....	45
9.1.1	Cromatografía.....	45
9.2	Información general para la identificación y caracterización estructural	45
9.2.1	Punto de fusión	45
9.2.2	Rotación específica.....	46
9.2.3	Espectroscopía de infrarrojo (IR).	46
9.2.4	Espectroscopía de ultravioleta (UV).....	46
9.2.5	Espectrometría de masas (EM).....	46
9.2.6	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	46
9.3	Obtención de precursores para los nuevos derivados de longipinano.	47
9.3.1	Obtención de rasteviona (13).....	47
9.3.2	Obtención de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (14)	47
9.3.3	Obtención de 7,8,9-triacetato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (16)	47
9.3.4	Obtención de 7,8,9-triacetato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (17)	48
9.3.5	Obtención de longipinan-1,7,8,9-tetraol (18)	48
9.3.6	Obtención de 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (9)	48
9.3.7	Obtención del 7,8,9-tricinamato de longipinan-7,8,9-1-ona (10).....	49
9.4	Síntesis y caracterización espectroscópica de nuevos derivados funcionalizados ..	49
9.4.1	Obtención de 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (11)	49
9.4.2	Obtención del 7,8,9-tricinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (12).....	50
9.5.	Evaluación <i>in vitro</i> de la polimerización de α,β -tubulina.....	51
9.6.	Estudios de reconocimiento molecular <i>in silico</i>	52
9.7.	Cálculos de $\log P$	52
10.	REFERENCIAS	53
11.	APÉNDICE A. Espectros de RMN de ^1H de 9-12 , 17 y 18	60

RESUMEN DE ESTRUCTURAS

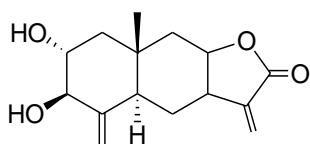
1



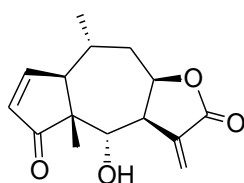
2



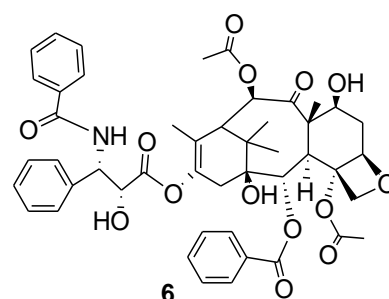
3



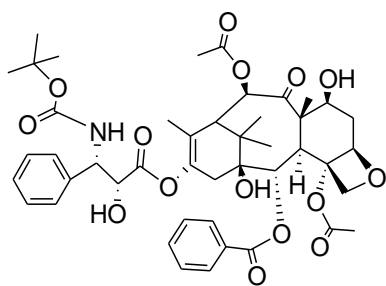
4



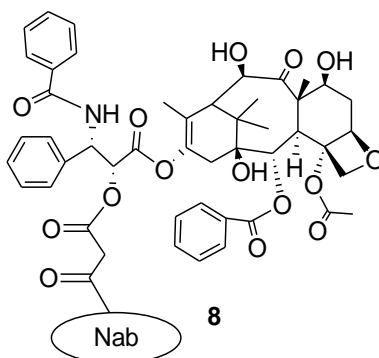
5



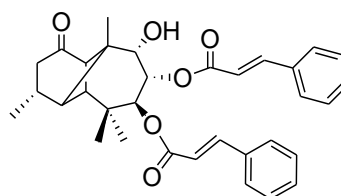
6



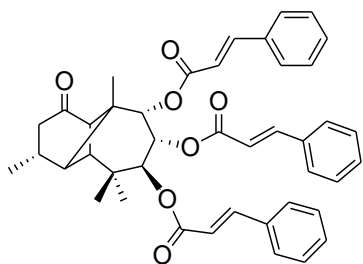
7



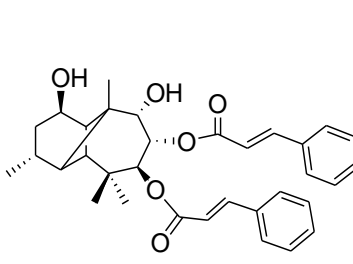
8



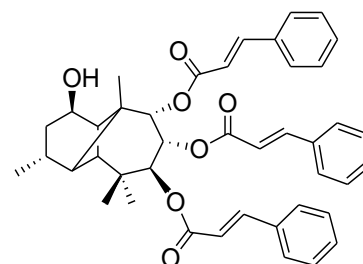
9



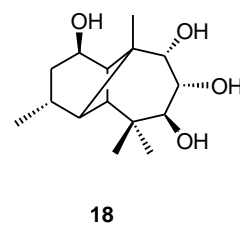
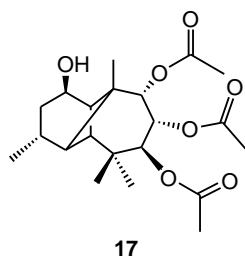
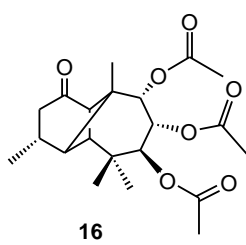
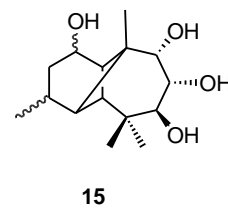
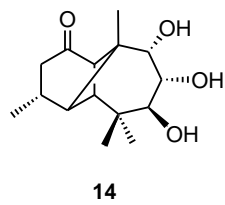
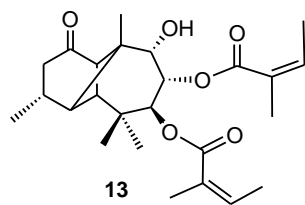
10



11



12



RESUMEN

El desarrollo de productos naturales en la investigación farmacológica ha sido muy importante para el tratamiento de diversas enfermedades desde hace miles años. Una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial que se ha mantenido en constante estudio es el cáncer. Los investigadores, con el objetivo de lograr combatir dicho padecimiento, día tras día continúan con la búsqueda de nuevos fármacos y también con la modificación química de estructuras ya estudiadas que permitan obtener fármacos más eficaces.

En este trabajo se exploró la modificación química de compuestos derivados de sesquiterpenos de tipo longipinano, que ya habían presentado actividad importante en su interacción con la tubulina en ensayos de polimerización *in vitro*. En este caso, se generaron nuevas moléculas con un cambio estructural de un carbonilo a un hidroxilo en la posición C-1 de dichos sesquiterpenos. Dicha exploración se hizo a partir de los productos naturales del género *Stevia*, tales como la rasteviona (**13**) que se aísla en alto rendimiento de las raíces de *Stevia serrata* Cav. La hidrólisis alcalina de **13** generó el sesquiterpeno denominado longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**14**). Por otro lado, el compuesto **14** se esterificó con ácido cinámico en presencia de dicitclohexilcarbodiimida y 4-dimetilaminopiridina en diclorometano para obtener los sesquiterpenos cinamoilados **9** y **10**. La reducción de estos dos compuestos con borohidruro de sodio en metanol permitió la obtención de los nuevos derivados del longipinano **11** y **12**.

Los estudios de acoplamiento molecular (*docking*) de la serie de compuestos **9-12** indicaron que el derivado de longipinano **11** fue el compuesto que tuvo una notable mejoría en la energía de interacción ($E_{\text{Dock}} = -9.2$ kcal/mol). Además, los cálculos de solubilidad, representados por $\log P$ indicaron que en este parámetro también hubo una mejoría al pasar del compuesto **9** ($\log P = 6.43$) al compuesto **11** ($\log P = 4.51$), quedando la solubilidad de **11** dentro de un rango adecuado, ya que el valor sugerido para un buen fármaco es $\log P < 5.20$. De manera preliminar, en los experimentos llevados a cabo con el sistema de tubulina microtúbulos mostraron que el cambio del grupo carbonilo de **9** al grupo hidroxilo en el compuesto **11** conservó esencialmente el efecto en la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina.

ABSTRACT

The development of natural products in pharmacological research has been very important for the treatment of various diseases for thousands of years. One of the diseases with the highest mortality rate worldwide that has been constantly studied is cancer. Researchers, with the aim of combating this disease, continue day after day with the search for new drugs, as well as with chemical modifications of studied structures that allow to obtain more effective drugs.

In this work, it was explored the chemical modification of compounds derived from sesquiterpenes of the longipinane type that had already shown important activity in their interaction with tubulin *in vitro* polymerization assays. In this case, new molecules were produced with a structural change from a carbonyl group to a hydroxyl group at the C-1 position. Such exploration was done starting from natural products of the genus *Stevia*, like rastevione (**13**), which can be isolated in high yield from the roots of *Stevia serrata* Cav. The alkaline hydrolysis of **13** yielded the sesquiterpene named longipinan-7,8,9-triol-1-one (**14**). On the other hand, compound **14** was esterified with cinnamic acid, in the presence of dicyclohexylcarbodiimide and 4-dimethylaminopyridine in dichloromethane to obtain the cinnamoylated sesquiterpenes **9** and **10**. Reduction of both compounds with sodium borohydride in methanol allowed to obtain the new longipinane derivatives **11** and **12**.

Molecular docking studies carried out in compounds **9-12** indicated that the longipinane derivative **11** had a substantial improvement in the interaction energy ($E_{\text{Dock}} = -9.2$ kcal/mol). Furthermore, solubility calculations represented by $\log P$ indicated that there was also an improvement in this parameter when going from compound **9** ($\log P = 6.43$) to compound **11** ($\log P = 4.51$). The predicted solubility for **11** now falls within an adequate range since the suggested value for an optimized drug is $\log P < 5.2$. Preliminary experiments carried out with the tubulin-microtubule system showed that replacing the carbonyl group of **9** for a hydroxyl group in **11** essentially preserved the increased effect on the polymerization of the α,β -tubulin heterodimers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El desarrollo de los productos naturales en la investigación farmacológica.

Los productos naturales son regalos preciosos de la naturaleza y provienen de organismos vivos como bacterias, plantas o animales [1]. Estos productos pueden clasificarse como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios están encargados de realizar funciones celulares básicas, tal es el caso de los aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y lípidos, mientras que los metabolitos secundarios, de estructuras especializadas, ejercen funciones de supervivencia y adaptación [2,3]. Por otro lado, desde el inicio de la vida, el ser humano se ha visto con la necesidad de sobrevivir y adaptarse al entorno que lo rodea, lo que lo ha llevado a adquirir conocimientos empíricos fundamentados en la observación de la naturaleza permitiéndole recurrir a plantas, animales, minerales y otros recursos naturales para el tratamiento de enfermedades. Actualmente, existen registros desde los años 2100 a.C. del uso de medicina oriental china, registros egipcios de 800 recetas herbolarias con 700 medicamentos en el tratado de papiro de Ebers y registros de la medicina herbolaria mesoamericana con la estructuración del código de la Cruz-Badiano en 1552 d.C. [2,4].

Los productos naturales durante miles de años han tenido un fuerte impacto en la preservación de la salud humana y a medida que ha transcurrido el tiempo, se ha llevado a la síntesis de medicamentos a partir de dichos productos, convirtiéndose en un campo de constante estudio y evolución. Este campo combina la tradición de utilizar compuestos naturales con los avances en la química, biología e ingeniería, teniendo como principales premisas: la identificación y aislamiento de compuestos activos, la comprensión de sus mecanismos de acción y modificaciones de estructuras químicas con propiedades farmacológicas para desarrollar opciones terapéuticas más efectivas para el tratamiento de enfermedades complejas, como el cáncer [2,3].

En los últimos estudios se ha determinado que el 30% de los fármacos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) pertenecen a la familia de productos naturales y sus derivados [5]. El 65% de dicho porcentaje corresponde a tratamientos oncológicos (de 321 medicamentos aprobados, 199 están enfocados para el tratamiento contra el cáncer) [6].

1.2. Productos naturales con propiedades anticancerígenas: Compuestos térpenicos

Los terpenos son metabolitos secundarios constituidos químicamente por la unión de dos o más estructuras de cinco átomos de carbono conocidas como unidades de isopreno (**Figura 1**) [7,8]. Los terpenos se clasifican como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos, de acuerdo al número de unidades de isopreno que los conforman, como se muestra en la **Tabla 1** [9]. Estos compuestos han mostrado propiedades importantes para el tratamiento de distintas enfermedades, actuando como antimicrobianos, antioxidantes, antialérgicos y como agentes anticancerígenos [10].

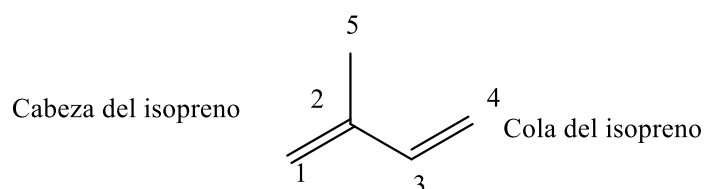


Figura 1. Estructura del isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

Tabla 1. Clasificación de los terpenos de acuerdo con el número de unidades de isopreno

Nombre	Número de unidades de isopreno	Número de átomos de carbono
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesterterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40
Politerpenos	n>8	n>40

Los sesquiterpenos pueden encontrarse en una gran variedad de especies vegetales como: la manzanilla, la menta, el romero, la canela y el laurel que pertenecen específicamente a las familias *Asteraceae*, *Lamiaceae* y *Lauraceae*. Existen más de 200 tipos de estructuras

distintas, entre las cuales destacan las lactonas sesquiterpénicas por sus propiedades citotóxicas que les otorgan un alto potencial terapéutico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Algunos ejemplos de lactonas sesquiterpénicas que han sido estudiadas por sus propiedades terapéuticas son la partenólida (**1**), la costunólida (**2**), la cinaropictina (**3**), la helenalina (**4**), la gaillardina (**5**) y sus derivados (**Figura 2**) [11].

La partenólida (**1**) está presente en la planta *Tanacetum parthenium* y tiene la capacidad de inducir apoptosis selectiva en células de cáncer debido a su capacidad de inhibir vías de señalización críticas en la progresión de esta enfermedad que engloban diversos complejos proteicos, como la tubulina carboxipeptidasa (TPC), la tiorredoxina reductasa (TrxR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) [12,13]. Las investigaciones de esta lactona continúan y se ha encontrado que puede inhibir la progresión de otros tipos de cáncer en líneas celulares de pulmón, cuello uterino, páncreas, vesícula biliar, hígado y colorrectal, entre otros [14-18].

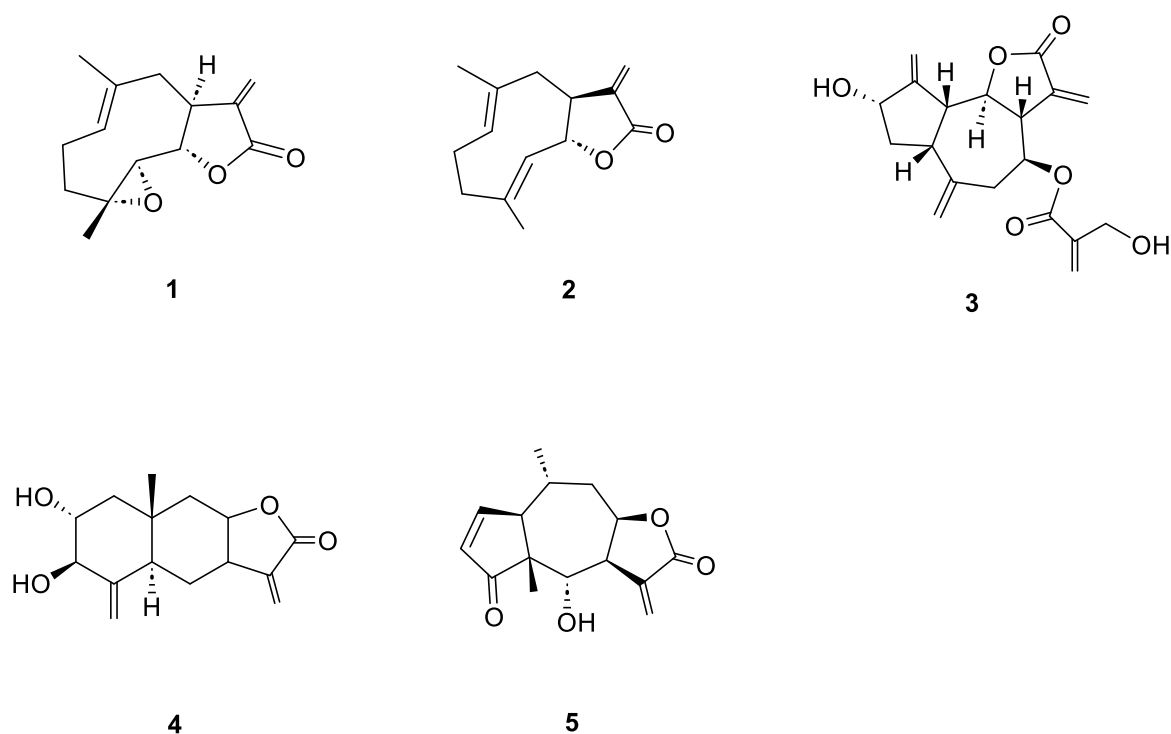


Figura 2. Lactonas sesquiterpénicas con propiedades antiproliferativas: la partenólida (**1**), la costunólida (**2**), la cinaropictina (**3**), la gaillardina (**4**) y la helenalina (**5**).

La costunólida (**2**) es un compuesto extraído de *Saussurea lappa* Clarke y *Laurus nobilis* L. que puede inducir apoptosis en células cancerosas mediante la generación de especies reactivas (ROS). Actualmente, este producto natural ha demostrado tener actividad anti-proliferativa en diversas líneas celulares de cáncer de mama [19], pulmón [20], colorrectal [21], gástrico [22] y de colon [23].

La cinaropicrina (**3**) inhibe la invasión, migración y metástasis de células tumorales por su habilidad de bloquear la actividad de las proteínas quinasas PKC, la tiorredoxina reductasa (TrxR) y la transcripción del factor nuclear NF-kB, además de suprimir la señalización de STAT3, lo que potencia su actividad biológica [24]. Recientemente, dos nuevos estudios han evaluado su impacto en la proliferación y apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama y de colon [25,26].

La gaillardina (**4**), extraída de *Inula oculus-christi*, ha mostrado inducir apoptosis en células MCF-7 de cáncer de mama por la inhibición de la vía de señalización JAK/STAT [27]. De manera similar, otras lactonas sesquiterpénicas, como la helenalina (**5**), obtenida de *Arnica montana*, la eudesmanólida de *Spilanthes acmella* y *Taraxacum officinale*, así como la melampodina A de *Melampodium spp.*, han demostrado poseer una notable actividad anticancerígena [24].

1.3 El cáncer

El cáncer puede originarse en cualquier parte del cuerpo y en cualquier etapa de la vida, afectando tanto a hombres como a mujeres de todas las edades. Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer fue la principal causa de muerte antes de los 70 años en 112 países. En 2020, el Observatorio Mundial del Cáncer (GLOBOCAN) informó que se registraron 10 millones de muertes por cáncer a nivel mundial y 19 millones de nuevos casos, mientras que en 2022 esta enfermedad aumentó a 20 millones de nuevos casos y 9.7 millones de muertes [28,29]. Se proyecta que para el 2045, la incidencia aumentará a 32.6 millones de casos y las muertes alcanzarán los 16.8 millones. Considerando ambos sexos, los cánceres más frecuentes son los de mama, pulmón, colorrectal, próstata y estómago [28,30].

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales que pueden invadir tejidos circundantes. Surge debido a alteraciones dinámicas en el genoma en diversos puntos, a través de mutaciones que activan oncogenes, acelerando el funcionamiento celular y afectando genes supresores de tumores con la pérdida de su función de manera recesiva. [31,32] Este proceso comienza con la mutación de una célula normal, que avanza hacia lesiones precancerosas y finalmente da lugar a tumores malignos. Además, la enfermedad puede verse agravada por una combinación de factores ambientales, inmunológicos, hormonales, metabólicos, infecciosos, así como por estímulos físicos y químicos. Estos factores generan un microambiente propicio para el desarrollo del cáncer [31].

Los investigadores del siglo XX informaron que las células cancerosas pueden presentar alteraciones fisiológicas comunes que favorecen el crecimiento maligno, agrupadas en seis características adquiridas. Éstas incluyen la capacidad de generar señales de crecimiento autosuficientes, lo que les permite pasar de un estado inactivo a uno proliferativo. Además, son insensibles a las señales que normalmente restringen el crecimiento descontrolado, afectando la homeostasis tisular. Sorprendentemente, las células cancerosas evitan la apoptosis (muerte celular programada) mediante mutaciones en los sensores y efectores de este proceso, y poseen un potencial de replicación ilimitado, lo que les permite reproducirse indefinidamente sin envejecer. También desarrollan la capacidad de suministrar oxígeno y nutrientes a través de una angiogénesis sostenida y pueden generar células pioneras que se desplazan e invaden tejidos circundantes, lo que eventualmente puede conducir a la metástasis [31]. Once años después, varios investigadores de este campo ampliaron la lista de características del cáncer, añadiendo dos rasgos emergentes y facilitadores. Uno de los rasgos emergentes es la capacidad de las células tumorales para acumular alteraciones genéticas recurrentes, que generan mutaciones clave en la patogénesis de los tumores. Un rasgo facilitador es la capacidad de promover la inflamación, que a su vez impulsa la formación de tumores a través de la infiltración de células del sistema inmunológico, algo que puede observarse en las primeras etapas de progresión neoplásica en ciertos tipos de cáncer. Además, las células cancerosas pueden reprogramar sus rutas metabólicas, alterando el metabolismo de la glucosa y favoreciendo la producción de energía mediante la glucólisis aeróbica, un fenotipo impulsado por oncogenes que promueve la proliferación y ayuda a

evadir el sistema inmune. En contraste, las células no neoplásicas cuentan con mecanismos de vigilancia inmunitaria, encargados de identificar y eliminar las células neoplásicas, especialmente en cánceres relacionados con infecciones virales.[33]. No obstante, la complejidad de la patogénesis del cáncer no se puede explicar completamente con lo anteriormente descrito. Por ello, en 2022 se introdujeron nuevas características facilitadoras. Entre ellas, el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, que permite a las células cancerosas modificar su comportamiento y adaptarse a nuevas condiciones, favoreciendo su proliferación, como se ha observado en cánceres de colon, páncreas, hígado y próstata. Asimismo, se ha descubierto la capacidad de alterar la expresión génica sin modificar la secuencia del ADN, lo que afecta la activación o inhibición de genes y altera el comportamiento celular sin causar mutaciones. Además, en cánceres como el de estómago, mama y pulmón, se ha identificado la presencia de microbiomas polimórficos, es decir, una variedad de microorganismos (bacterias, virus, hongos, etc.) que interactúan con las células malignas y pueden influir en la progresión de la enfermedad. Finalmente, las células senescentes cancerosas contribuyen a la proliferación al evitar la apoptosis, inducir la angiogénesis y estimular la invasión y metástasis, además de suprimir la respuesta inmune antitumoral (**Figura 3**) [34].

Desde hace mucho tiempo, más allá de las características abordadas se ha denotado que la relación entre la epigenética y el cáncer abarca aún más que los cambios en las densidades nucleares y las apariencias alteradas de la cromatina que pronostican el comportamiento del cáncer. Algunos de los primeros estudios que involucran a la epigenética en el cáncer se centran en cambios en los niveles de metilación del ADN en tumores de roedores y de humanos. Unos de los principales pioneros, Feinberg y Vogelstein, demostraron que en los tumores humanos había cambios en la metilación de ADN y también se ha considerado a la hipermetilación como una característica de células cancerosas. Actualmente, cambios en la metilación del ADN se observa en todos los tumores humanos estudiados, lo que destaca su influencia en la tumorigénesis.

La metilación del DNA es una marca epigenética esencial para el desarrollo de los mamíferos, se lleva a cabo en la posición 5 del nucleótido histona, con la adición de grupos metilos (CH₃) en regiones de dinucleótidos de citosina y guanina CPG, influenciado la expresión genética sin repercutir en la secuencia del ADN. Este proceso tiene la capacidad

de silenciar los genes evitando que se dé la transcripción a través enzimas metiltransferasas como DNMT y enzimas que eliminan los grupos metilo como la proteína de traslocación diez-once (TET).

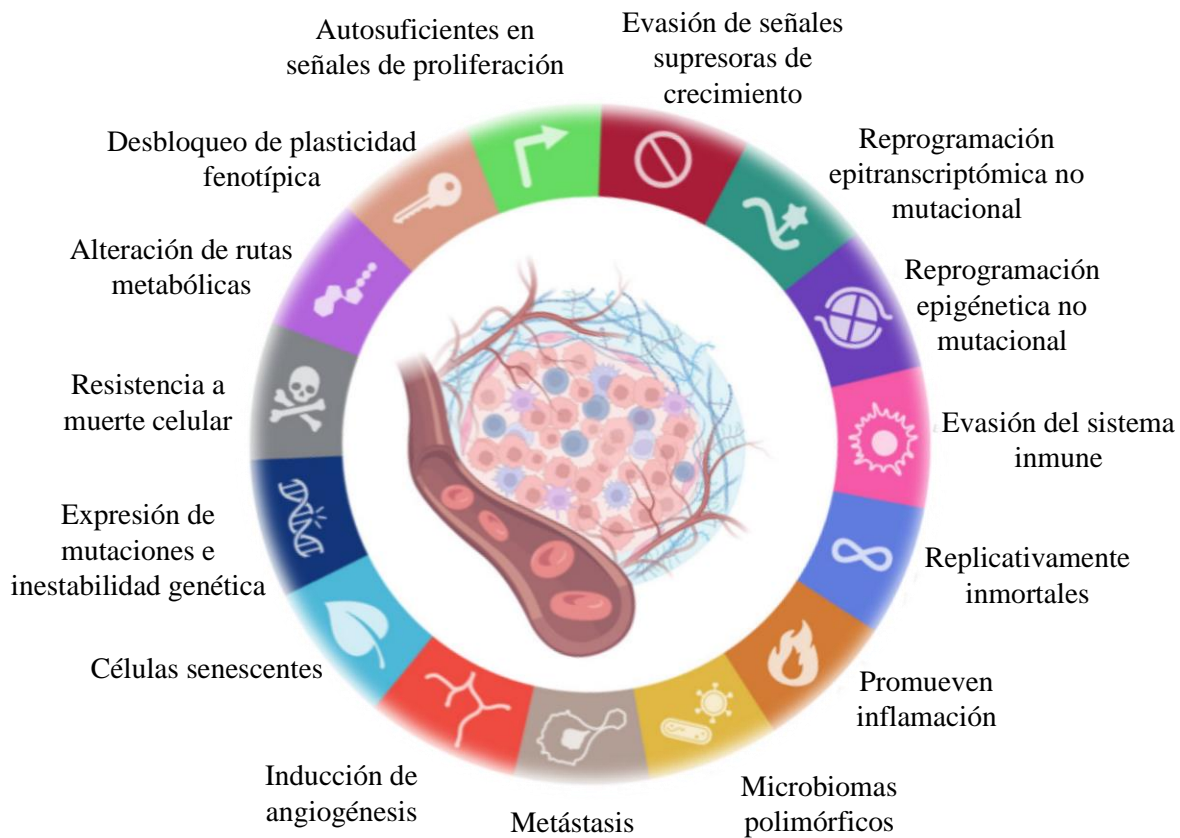


Figura 3. Características de células cancerosas [34] y ejemplos del silenciamiento de genes asociados a la hipermetilación de la isla CpG [35].

En un estudio actual se propusieron seis características epigenéticas distintivas del cáncer que engloban la metilación de ADN, modificaciones de las histonas y la remodelación de la cromatina. Las características epigenéticas distinguidas son: “Hipermetilación dirigida del ADN de las regiones reguladoras de genes” que está asociado principalmente al silenciamiento de los mismos evitando su expresión, lo que puede contribuir al desarrollo del cáncer si se trata del silenciamiento de genes supresores de tumores, “Eventos de hipometilación de ADN a nivel de genoma global”, referente a una disminución de la metilación, lo que permite inducir la reactivación de genes específicos, “Cambios de los

patrones de modificación de histonas”, mediante acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, “Adquisición de una nueva arquitectura de cromatina 3D” en células cancerosas, “Naturaleza flexible del entorno epigenético” la flexibilidad que permite que las células cancerosas creen resistencia a los medicamentos, considerando que tienen un alto índice de sobrevivencia por el entorno epigenético y que la metilación de ADN ocasiona que la célula se adapte y se transforme para generar circuitos que superan el microambiente hipóxico inmunitario, fomentando la progresión y metástasis. Finalmente, “Un impacto bidireccional de la epigenética y genética” referente a mutaciones cancerígenas inducidas por el epigenoma, el daño y reparación de ADN y defectos genéticos en las histonas y la remodelación de la cromatina (**Figura 4**) [35].

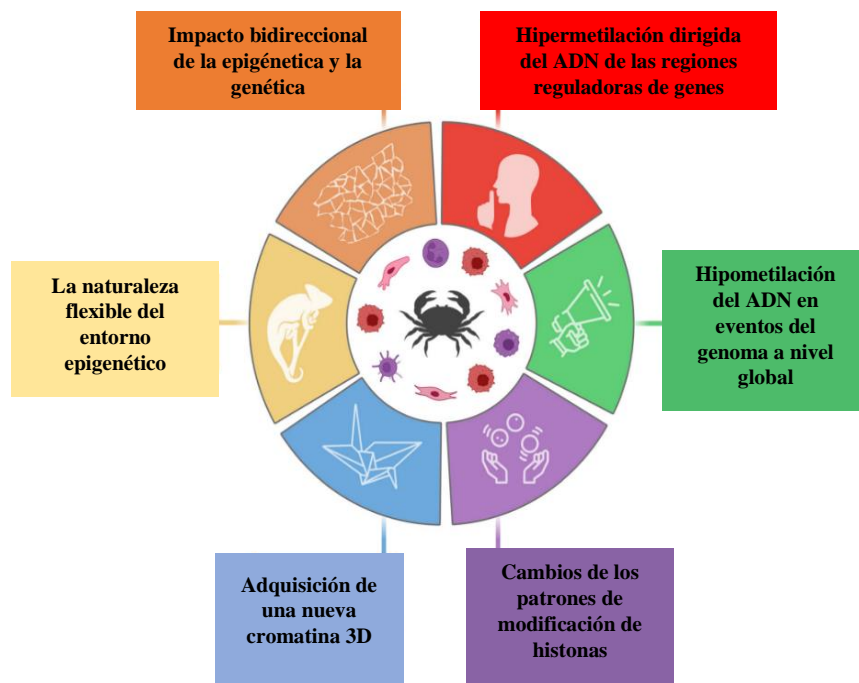


Figura 4. Características epigenéticas del cáncer [35].

Debido a la complejidad de esta enfermedad, se han desarrollado diversas alternativas terapéuticas, entre las que se incluyen la cirugía, la inmunoterapia, la quimioterapia, el uso de biomarcadores, las terapias dirigidas, la terapia fotodinámica, la hipertermia, la terapia hormonal y los trasplantes de células madre [36]. Entre estas opciones, los tratamientos más comunes son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía [37]. En particular, la quimioterapia

emplea cocteles de compuestos químicos cuyos fármacos son reconocidos por su acción citotóxica, afectando distintas fases del ciclo celular. Según sus propiedades bioquímicas, estos fármacos se pueden clasificar en agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa y fármacos modificadores de tubulina [38]. Estos últimos tienen como blanco terapéutico a la tubulina, una proteína estructural clave en los microtúbulos, debido a su papel esencial en la proliferación celular.

1.4 La tubulina y los microtúbulos como diana terapéutica.

Los microtúbulos forman parte de los tres principales filamentos (microfilamentos y filamentos intermedios) que le dan soporte estructural al citoesqueleto de las células eucariotas y en algunas células procariotas [39, 40]. Estas estructuras son fundamentales en la biología celular, ya que desempeñan múltiples funciones clave, como el soporte mecánico, el transporte intracelular, la señalización, la migración y la división celular. Los microtúbulos participan en la formación del huso mitótico el cual está encargado del adecuado empaquetamiento de cromosomas en dos células hijas durante la mitosis. Además, forman parte integral de los cilios y flagelos, y actúan como vías para el transporte de vesículas y orgánulos mediante la acción de proteínas motoras como la dineína y la kinesina [40-44].

Los microtúbulos son estructuras rígidas compuestas por dímeros de tubulina, una proteína globular formada por dos subunidades α -tubulina y β -tubulina. Cada una de estas subunidades posee un sitio de unión al trifosfato de guanosina (GTP), en donde se lleva a cabo su hidrólisis a GDP. En la α -tubulina, este sitio se conoce como no intercambiable (*N-site*), mientras que en la β -tubulina se denomina intercambiable (*E-site*). La energía liberada durante la hidrólisis facilita la formación del heterodímero de α,β -tubulina, lo que permite la polimerización para formar los protofilamentos (**Figura 5**) [40, 45, 46].

Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos dispuestos lateralmente en paralelo, los cuales se organizan en torno a un eje central para formar el cilindro hueco con un diámetro de 25 nm y una longitud que puede variar desde 1 μ m hasta más de 100 μ m. Esta disposición otorga a los microtúbulos una polaridad estructural clave para su funcionamiento, presentando un extremo "negativo", asociado a la α -tubulina, que crece de forma lenta, y un extremo "positivo", asociado a la β -tubulina, donde se produce un crecimiento más rápido, en el cual se añaden los dímeros de tubulina con mayor facilidad.

La presencia de GTP al extremo + en el dímero terminal estabiliza el microtúbulo y promueve su elongación [40,47,53], mientras que la hidrólisis de GTP a GDP lo desestabiliza, favoreciendo su desintegración o despolimerización. Este fenómeno contribuye a que los microtúbulos sean estructuras dinámicas [54,55]

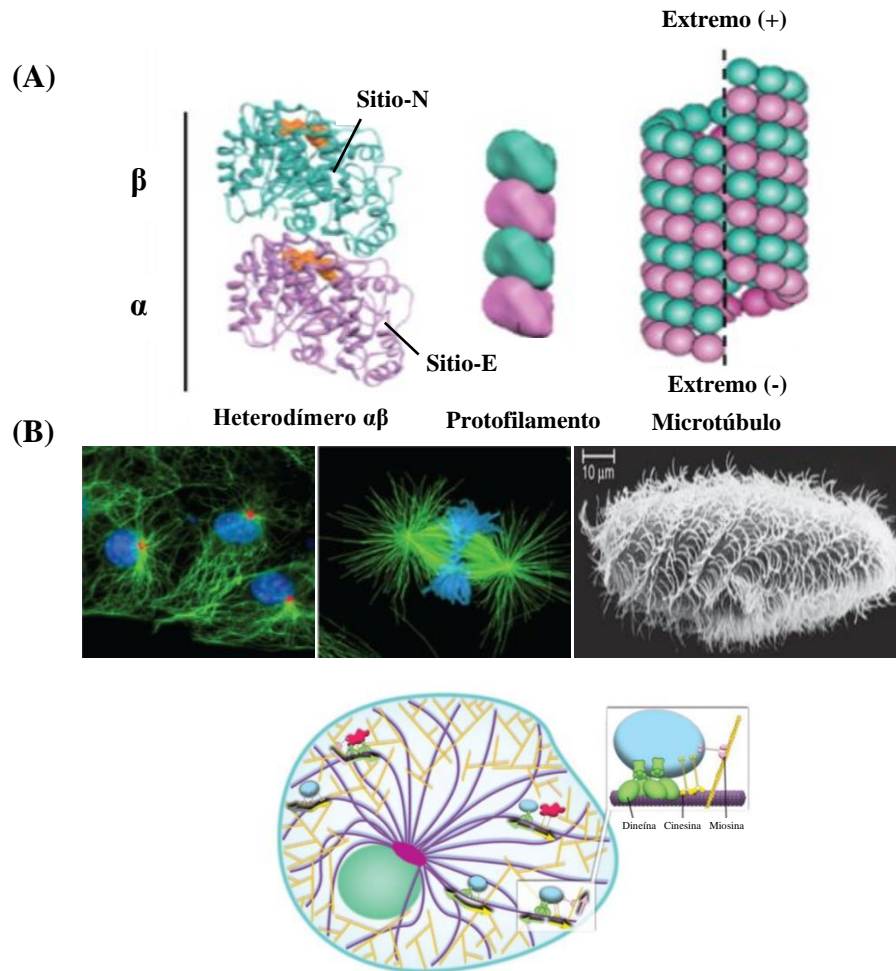


Figura 5. (A) Estructura del heterodímero α,β -tubulina que indica los sitios de unión al GTP [11]. Formación del protofilamento mediante el heterodímero de α,β -tubulina y formación del microtúbulo mediante los protofilamentos. (B) Disposición radial de microtúbulos en células en interfase. Microtúbulos (verde), ADN (azul), centro organizador de microtúbulos (rojo). Huso mitótico de células animales. Microtúbulos (verde) y ADN (azul). Micrografía electrónica de barrido de los cilios coordinados de *Paramecium* sp. Transporte de vesículas y organelos con ayuda de proteínas motoras como la dineína y la cinesina [40,44].

La inestabilidad dinámica (**Figura 6**) es un proceso característico de los microtúbulos que consiste en crecer (polimerizar) y acortarse (despolimerizar) de forma rápida y controlada. Este proceso está ligado a la hidrólisis de GTP de manera constante, cuya inestabilidad depende de la velocidad de crecimiento del microtúbulo, velocidad de acortamiento del microtúbulo, frecuencia de transición de un estado de crecimiento o pausa a un estado de acortamiento (catástrofe) y la frecuencia de transición de un estado de acortamiento a un estado de crecimiento o pausa (rescate) [48-51,54].

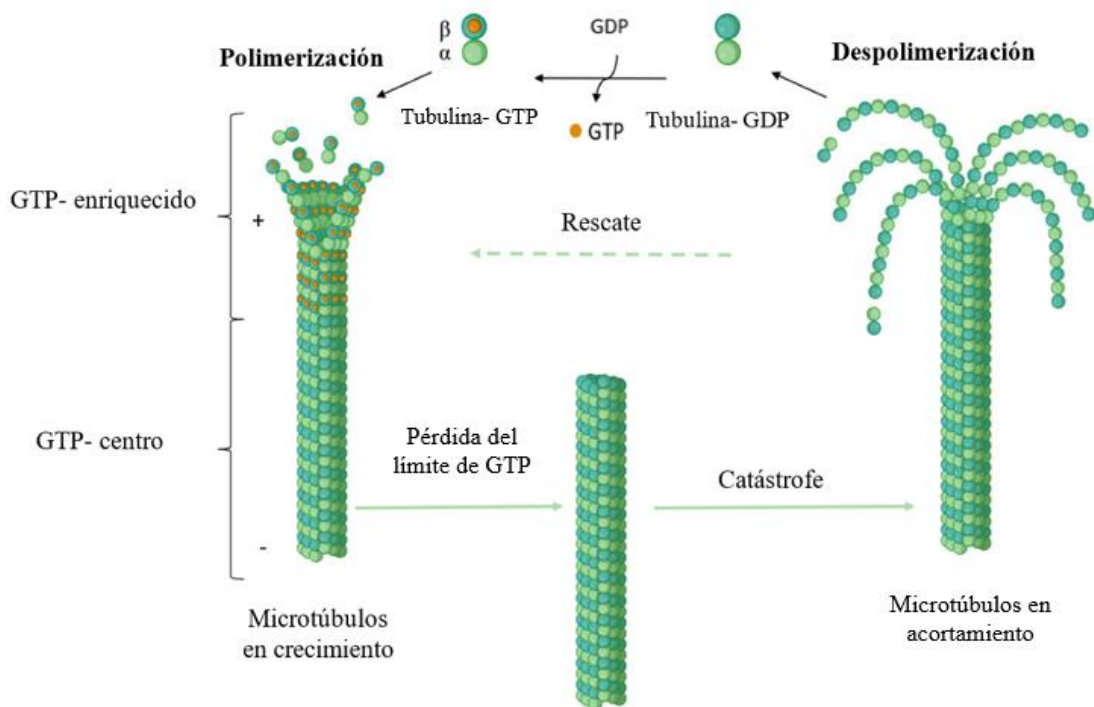


Figura 6. Dinámica de los microtúbulos y sus diferentes fases de polimerización y despolimerización [56].

La dinámica de los microtúbulos depende de factores fisicoquímicos como la temperatura, la presión, la concentración de iones calcio y el pH. Con base en esta observación, se han desarrollado varios métodos *in vitro* para analizar el impacto de posibles fármacos que tienen como objetivo a los microtúbulos. Uno de los enfoques más utilizados es una modificación del método descrito originalmente por Shelanski [52], que emplea tubulina extraída de

cerebro de bovino o porcino disuelta en un buffer específico, una solución de GTP y los compuestos de prueba disueltos en DMSO. Esta mezcla, que incluye la proteína, el GTP y el compuesto en estudio, se incuba a 37 °C durante 60 min para permitir la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina. El método aprovecha la capacidad de los microtúbulos para dispersar la luz, una característica directamente relacionada con la concentración de los polímeros en la solución. Durante el proceso de incubación, se mide la absorbancia a 340 nm, ya que la densidad óptica aumenta a medida que se forman los polímeros. Posteriormente, la despolimerización se desencadena mediante un estímulo, que puede ser la adición de una solución de CaCl_2 o la disminución de la temperatura de incubación [53].

1.5 Productos naturales que interactúan con el heterodímero α,β -tubulina.

El heterodímero α,β -tubulina se ha convertido en uno de los objetivos más estudiados en la terapia contra el cáncer, gracias al papel fundamental de los microtúbulos en la división celular, especialmente durante la fase G2/M [57, 58]. Los agentes que alteran la dinámica de los microtúbulos se clasifican en dos grandes grupos: agentes estabilizadores que inhiben la despolimerización de los microtúbulos y agentes desestabilizadores que inhiben la polimerización de los microtúbulos [59, 60]. La inhibición de esta polimerización puede detener la proliferación de células cancerosas y desencadenar su apoptosis, contribuyendo a frenar la progresión del cáncer.

En la tubulina se han identificado diversos sitios de unión para estos agentes (**Figura 7**), destacando el sitio de unión a la colchicina, los sitios de unión de los alcaloides de la vinca, el sitio de unión de los taxanos, así como los sitios de unión para la pironetina, la maitansina y los derivados de la laulimalida. [57, 58, 60]. A los sitios de unión de los taxanos y laulimalida se unen a agentes estabilizadores mientras que los sitios de la vinca, colchicina, maitansina y pironetina se unen a agentes desestabilizadores [61].

Sitios de unión de taxanos: Los agentes estabilizadores se unen al lumen de la subunidad β -tubulina, específicamente en la posición Ser277, que se localiza entre el dominio intermedio y el dominio *N*-terminal. Este sitio es crucial para las interacciones laterales entre los protofilamentos. Cuando el GTP se une y se hidroliza, se forma una estructura de protofilamentos, y estos agentes estabilizadores se acoplan para favorecer la polimerización.

Entre los ejemplos de agentes que interactúan en este sitio y promueven la polimerización, encontramos los taxanos, como el paclitaxel, así como el taccalonolide y las epotilonas, como la ixabepilona y la sagopilona.

Sitios de unión de derivados de laulimalida/pelorúsida: Este sitio de unión se descubrió por estudios que mostraron que la laulimalida actúa de manera similar a los taxanos al promover la estabilización de los microtúbulos, sin embargo, su acción ocurre en la subunidad β -tubulina pero en una región independiente del sitio donde se acoplan los taxanos.

Sitios de unión de colchicina: Este dominio se encuentra entre la subunidad α y β . Los análogos que se añaden a este dominio provocan arresto celular y apoptosis al inhibir la elongación de los microtúbulos. La colchicina, un alcaloide derivado del azafrán de pradera (*Colchicum autumnale*), fue el primer agente descubierto en este grupo de inhibidores de la tubulina. Este compuesto interactúa con el residuo Cys241 y su unión provoca un desplazamiento del bucle M interfiriendo con la formación de protofilamentos [59, 60, 62].

La actividad desestabilizadora de estos agentes es dependiente de la concentración. A bajas concentraciones, suprimen la dinámica de la tubulina, mientras que a concentraciones más altas inducen la desestabilización de los microtúbulos. Esto resalta la importancia de la dosis en la eficacia de estos inhibidores [60, 62]. Algunos ejemplos de análogos de origen natural que se unen a este sitio de unión son la podofilotoxina, la combretastatina, la desmosdumotina y la noscapine [59].

Sitios de unión de alcaloides de la vinca: Los compuestos se unen entre dos dímeros de tubulina, interactuando con la subunidad alfa de uno y la beta del otro. Esta interacción impide la hidrólisis del GTP y el intercambio de GDP, lo que favorece la polimerización de los microtúbulos [63, 64].

Los agentes que se acoplan a este dominio incluyen los alcaloides de la vinca, que son productos naturales o derivados semisintéticos extraídos de la planta *Catharanthus roseus*. Los principales alcaloides de la vinca que están actualmente aprobados para uso clínico por la FDA son la vinblastina y la vincristina. En Europa, también se encuentran aprobados para uso clínico la vindesina y la vinflunina [60, 63, 65].

Sitios de unión de pironetina: El sitio de unión de la pironetina se localiza directamente en la α -tubulina, interfiriendo en el ensamblaje de los microtúbulos [61]. La pironetina, aislada de *Streptomyces sp.*, es el primer compuesto que se une covalentemente a los microtúbulos a través del residuo Cys316 e interactúa además con el residuo Lys352, lo que desestabiliza los microtúbulos e inhibe el crecimiento de células cancerosas resistentes a tratamientos convencionales [58, 64, 66, 67]. La α -tubulina es un objetivo clave en el diseño de fármacos anticancerígenos, por lo que se continúa investigando para desarrollar derivados o análogos de pironetina que se unan a este sitio. Estudios recientes han demostrado que compuestos como las dihidropironas y las criptoconcatonas pueden dirigirse eficazmente al sitio de unión de la pironetina en la α -tubulina [68].

Recientemente, se han identificado tres nuevos sitios de unión que bloquean el ensamblaje de microtúbulos (**Figura 7**) [56]. **El sitio de la maitansina**, que se une a un área expuesta de la β -tubulina. **El sitio de la gatorbulina**, aislada de cianobacterias marinas, que se une a un sitio adyacente al de la colchicina. **El sitio del todalam**, que se localiza entre los sitios de unión de la maitansina y la pironetina.

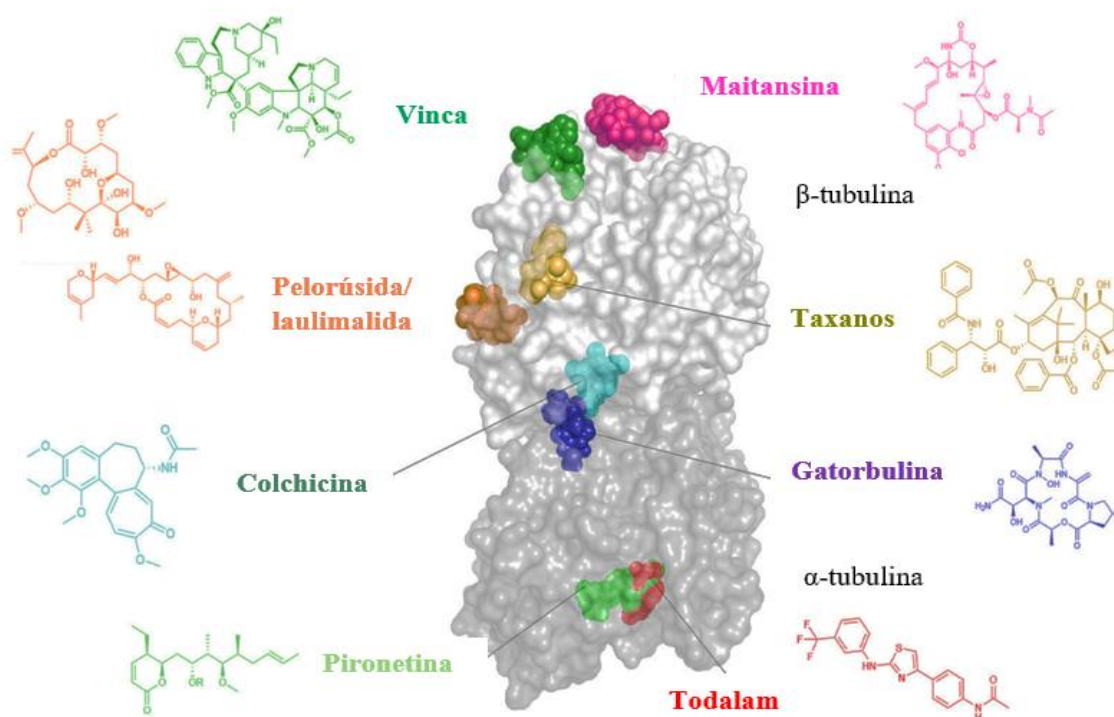


Figura 7. Sitios de unión de la tubulina en los microtúbulos y estructuras químicas de agentes estabilizadores y desestabilizadores [56].

1.6 Fármacos Naturales: Limitaciones en Solubilidad y Eficacia

Los productos naturales se han considerado como una alternativa que supera los tratamientos sintéticos por su intervención en diferentes vías de señalización asociadas a características clave de células neoplásicas, como la proliferación, la apoptosis, la migración, la angiogénesis y la metástasis [69]. Así mismo, los productos naturales se distinguen por ser difíciles de replicar de manera sintética debido a su diversidad química, al ser estructuras complejas y únicas que cuentan con múltiples centros quirales así como con sistemas policíclicos con grupos funcionales diversos como cetonas, alcoholes o ésteres [70].

La complejidad estructural ocasiona limitaciones farmacológicas que pueden disminuir la eficacia de los fármacos naturales por presentar baja solubilidad, reduciendo la biodisponibilidad en el sitio de acción [71,72]. Un ejemplo de un fármaco derivado natural utilizado actualmente para el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario y mamá es el paclitaxel o taxol (**Figura 8**) un diterpeno aislado de *Taxus brevifolia* por los investigadores Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani en 1967 [58, 73, 74]. Sin embargo, a pesar de sus beneficios anticancerígenos, el taxol ha presentado una serie de problemas relacionados con su polaridad, que pueden tener implicaciones importantes en la farmacocinética y efectividad clínica por el tipo de vehículos en los que se administra, así como en la unión a proteínas plasmáticas reduciendo así la disponibilidad en el sitio del tumor. En atención a esta problemática, una de las estrategias más importantes ha consistido en preparar nuevos derivados y así realizar modificaciones en la estructura química que permitan optimizar la eficacia terapéutica. En este caso, en la polaridad de los compuestos [75]. Un ejemplo de esto es el docetaxel (**7**), un análogo del paclitaxel (**6**) que presenta mejoras en su solubilidad gracias a cambios estructurales en las posiciones 3 y 10 de su molécula (**Figura 8**) [58]. Otro derivado que mejora la solubilidad y biodisponibilidad es el Nab-paclitaxel (**9**) siendo una molécula que ha surgido en respuesta del diseño de formulaciones basadas en nanotecnología que utiliza una nanopartícula de albúmina como vehículo para transportar el paclitaxel (**6**) de manera más eficiente en torrente sanguíneo hacia la diana terapéutica [73].

En este trabajo se prepararon compuestos nuevos tales como el dicinamato diol (**11**) y tricinamato diol (**12**) con el fin de mejorar la solubilidad de los derivados del longipinano con ésteres de cinamato en su estructura. El dicinamato **9** y el tricinamato **10** (**Figura 9**) son sesquiterpenos de tipo longipinano que mostraron una notable actividad en la polimerización

de la tubulina y la estabilización de microtúbulos, siendo el dicinamato **9** el más activo [76]. En este trabajo, un cambio estructural de carbonilo a hidroxilo nos ha permitido evaluar cómo cambia la actividad y la solubilidad de la molécula.

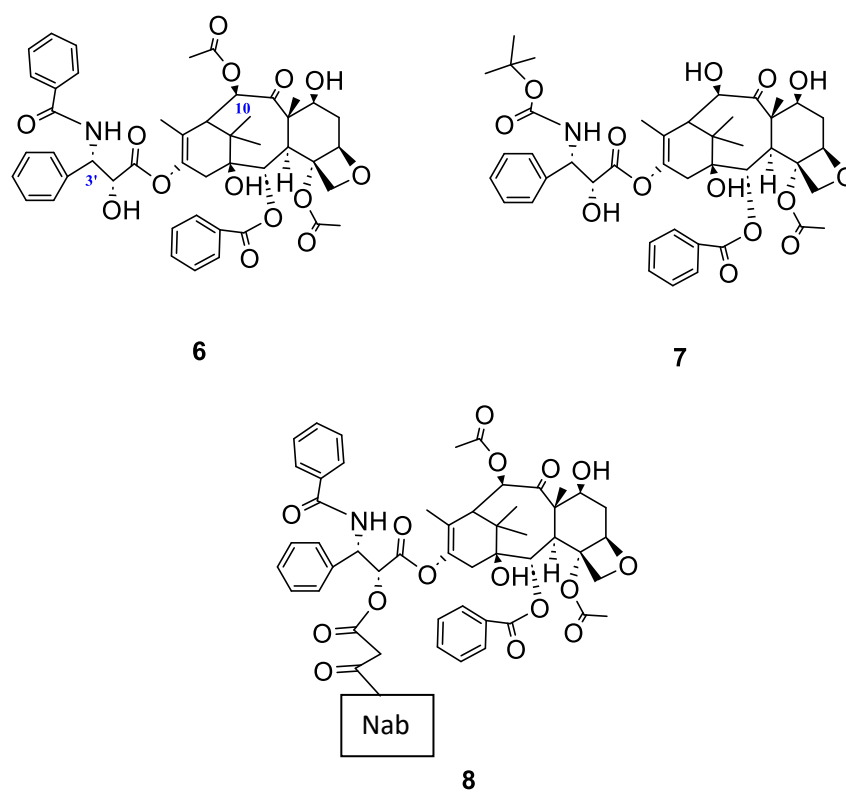


Figura 8. Estructuras del paclitaxel (**6**) y sus análogos el docetaxel (**7**) y *nanoparticle albumin-bound* paclitaxel (**8**) (Nab-paclitaxel) [58,75].

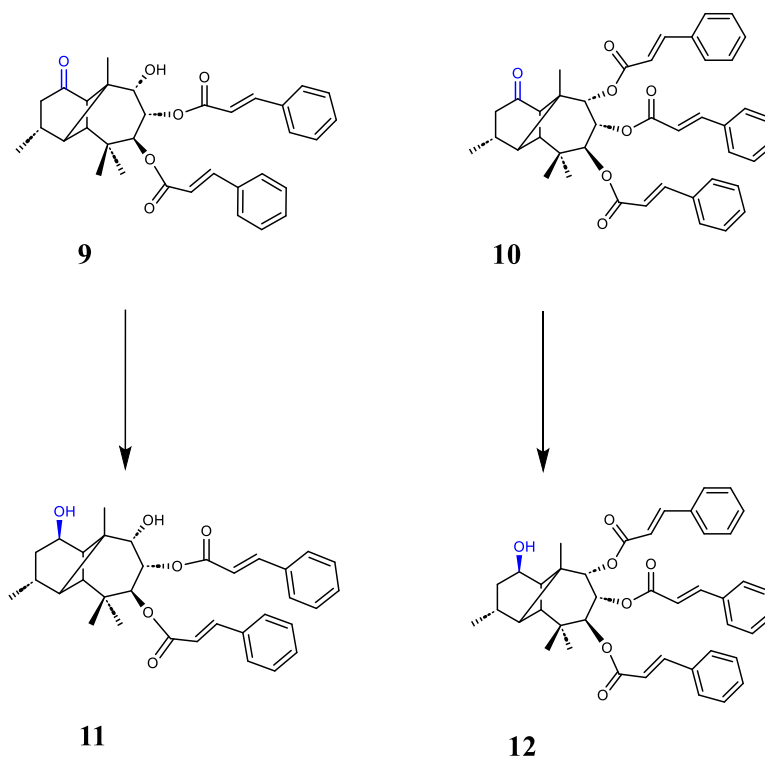


Figura 9. Estructuras químicas del dicinamato **9** y tricinamato **10** con propiedades en la tubulina [76]. Estructuras del dicinamato diol **11** y tricinamato diol **12**, con un cambio estructural de carbonilo a hidroxilo (en azul).

1.7 Análisis de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*).

El desarrollo de moléculas nuevas, eficaces y económicas como posibles candidatos a fármacos es uno de los principales objetivos de los investigadores. El reconocimiento molecular entre proteínas y ligandos, conocido como *docking*, es un método asistido por computadora que permite el diseño de fármacos basado en estructuras químicas. Esta técnica facilita la selección de moléculas activas de bibliotecas bioquímicas con potencial farmacológico y optimiza las propiedades de los compuestos antes de llevar a cabo ensayos experimentales.

El acoplamiento molecular entre proteínas y ligandos muestra la unión más probable entre el ligando y el receptor en un espacio conformacional tridimensional. Esta interacción se determina por la orientación y posición específicas en el sitio de unión, las cuales se identifican mediante la minimización estructural y la evaluación de la energía de interacción

[55]. Cabe señalar que el *Protein Data Bank* es una base de datos global que cuenta con estructuras tridimensionales de proteínas siendo una plataforma de libre acceso para obtener la estructura de los receptores deseados para diversos estudios [77].

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad, por lo que buscar opciones terapéuticas para su tratamiento es fundamental. La tubulina y los microtúbulos juegan un papel esencial en la división celular, lo que les confiere ser buenos blancos farmacológicos, de tal manera que resulta muy importante continuar obteniendo nuevos compuestos que no solo logren intervenir en la polimerización y despolimerización de la tubulina, sino que además se obtengan mejores compuestos desde el punto de vista de su administración. Generar compuestos más manejables en cuanto a la solubilidad, tomando como referencia la problemática que presentó el paclitaxel, ayudará en un futuro a contar con alternativas estructurales más útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales dirigidos a la tubulina como blanco farmacológico.

3. HIPÓTESIS

La incorporación de ésteres aromáticos al esqueleto del longipinano en combinación con la presencia de grupos hidroxilo mejorará la solubilidad de dichos compuestos incrementando la actividad estabilizadora de los microtúbulos.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Obtener nuevos sesquiterpenos funcionalizados con ésteres aromáticos que sean más solubles y que interactúen con la tubulina interviniendo en la estructuración de microtúbulos.

4.2 Específicos

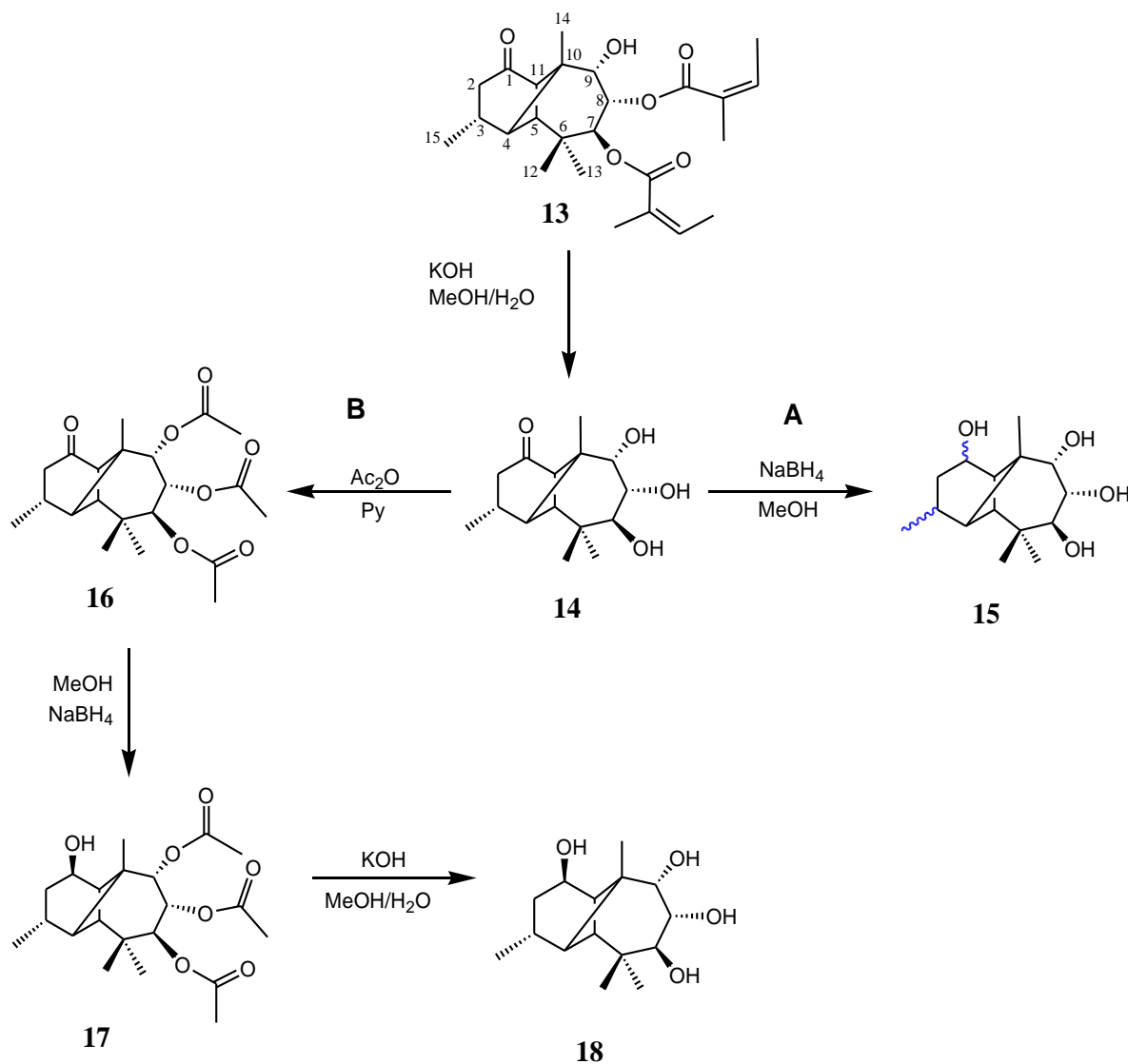
- 4.2.1 Obtener los derivados polihidroxiados de longipinano **14** y **18** a partir del producto natural **13** aislado de las raíces de *Stevia serrata*.
- 4.2.2 Efectuar reacciones de esterificación en estos compuestos para obtener los sesquiterpenos esterificados **9**, **10**, **11** y **12**.
- 4.2.3 Evaluar el efecto de los derivados sesquiterpénicos polifuncionalizados (**11** y **12**) en la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina.
- 4.2.4 Realizar el cálculo de coeficiente de partición ($\log P$), para comprobar la solubilidad del compuesto.
- 4.2.5 Realizar cálculos de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*) entre el heterodímero de α,β -tubulina y los compuestos que presenten interacción con dicha proteína.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención y caracterización de los sesquiterpenos funcionalizados.

El producto natural rasteviona (**13**), aislado de las raíces de *Stevia serrata* Cav. mediante reflujo con hexano, fue el producto natural de partida para obtener los sesquiterpenos derivados del longipinano **14-18**. En el **Esquema 1** se ilustra la secuencia de reacciones utilizada en la que la triolona **14** se obtuvo mediante la hidrólisis alcalina de rasteviona (**13**) con hidróxido de potasio en metanol lo que indujo la remoción de los grupos angelato con un alto rendimiento (89%). El compuesto **14** se trató con borohidruro de sodio en metanol dando lugar inesperadamente a una mezcla epimérica en la posición C-1 ó C-3 representada por **15**. Como uno de los objetivos era la obtención del tetraol **18**, se probó una ruta de síntesis alterna (ruta **B**) que partió de la acetilación total del compuesto **14**, seguido de una reducción con borohidruro de sodio en metanol del carbonilo en la posición C-1 dando lugar al compuesto (**17**). En su espectro de RMN de ^1H sobresalen las señales de los hidrógenos base de acetato H-7, H-8, H-9 en los desplazamientos químicos 5.35, 5.24, 5.20 ppm y la presencia de la nueva señal base de hidroxilo H-1 en 4.30 ppm (**Figura 1A**, **APÉNDICE A**). Posteriormente, se realizó una hidrólisis con hidróxido de potasio en metanol y trazas de agua

para obtener el compuesto deseado (**18**). La ruta **B** generó el hidroxilo en C-1 con una configuración beta y con un rendimiento del 90%. En el espectro de RMN de ^1H sobresalen las señales a frecuencias menores de los hidrógenos base de hidroxilo H-1, H-9, H-8 y H-7 en los desplazamientos 4.28, 3.79, 3.69 y 3.65 ppm respectivamente (**Figura 2A**, **APÉNDICE A**).



Esquema 1. Preparación de los derivados del longipinano **17** y **18** a partir del producto natural **13**.

Continuando con la secuencia de reacciones como se muestra en el Esquema 2, se llevó a cabo la reacción de esterificación de la longipinan-7,8,9-triol-1-ona **14** con el ácido cinámico. Se decidió utilizar el ácido cinámico ya que existen reportes que informan que al adicionar grupos cinamato a compuestos terpénicos, se generan sustancias que pueden actuar como agentes que modifican la polimerización de tubulina y la despolimerización de los microtúbulos uniéndose al mismo sitio del taxol en la tubulina [78].

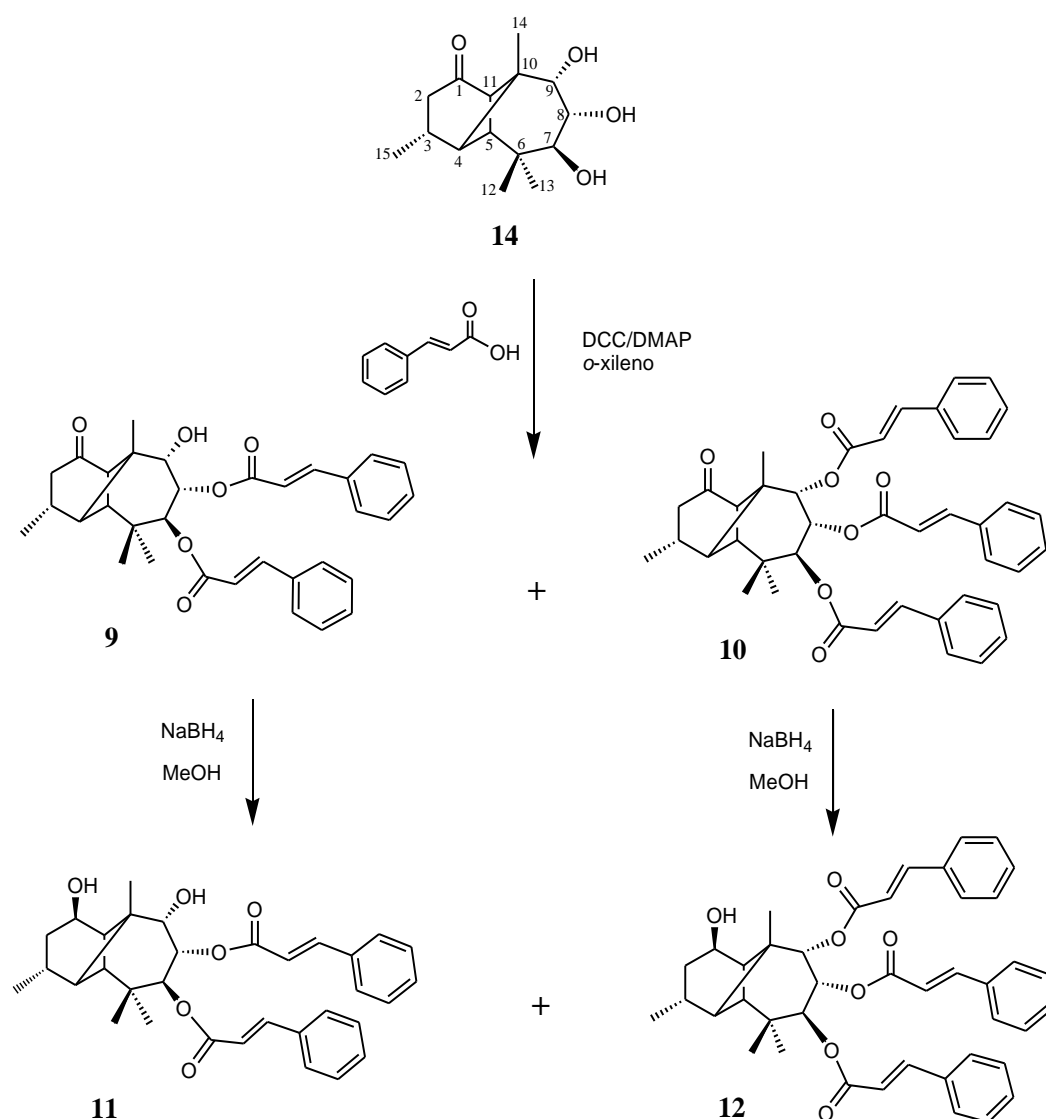
El tratamiento del compuesto **14** con *N,N*-diciclohexilcarbodimida y 4-*N*-dimetilaminopiridina en *o*-xileno a temperatura ambiente durante 72 h generó los sesquiterpenos funcionalizados **9** y **10** preparados en un trabajo anterior [76]. En este trabajo se modificó parte de la metodología implementada en dicho estudio [76] en donde se obtuvo una serie de derivados del longipinano esterificados que presentaron una actividad significativa en el heterodímero α , β -tubulina de los cuales destacaron por su actividad el 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona **9** y el 7,8,9-tricinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona **10**.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **9** se observó la presencia de las señales para los hidrógenos aromáticos y vinílicos de los grupos cinamato en la región de 7.70 a 6.30 ppm. Las señales de las bases de ésteres H-7 y H-8 aparecieron a frecuencias un poco más bajas en 5.59 y 5.56 ppm, respectivamente (**Figura 3A, APÉNDICE A**). Para el compuesto **10**, el espectro RMN de ^1H mostró las señales características de los hidrógenos aromáticos y vinílicos de los cinamatos en la región de 7.90 a 6.15 ppm, mientras que las señales de los hidrógenos base de éster H-7, H-8 y H-9 se observaron en 5.71, 5.65 y 5.52, respectivamente (**Figura 5A, APÉNDICE A**). Los compuestos **9** y **10** se trataron con borohidruro de sodio en metanol durante 2 h a reflujo para reducir el carbonilo en la posición C-1 a hidroxilo dando origen a los sesquiterpenos funcionalizados **11** y **12**. Dado que estos compuestos son nuevos, su caracterización se llevó a cabo mediante espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C , así como experimentos de RMN en dos dimensiones como COSY, NOESY, HSQC y HMBC.

El compuesto **11** se purificó por cromatografía en columna obteniéndose con un rendimiento del 50% en forma de aceite incoloro. En el espectro de RMN de ^1H se observaron las señales de los hidrógenos vinílicos de los grupos cinamato H-18 y H18' 7.59 y 7.63 ppm, seguidos de los hidrógenos aromáticos en el rango de 7.40 a 7.20 ppm y de los hidrógenos vinílicos H-17 y H17' en 6.36 y 6.31 ppm. Las señales que confirman la correcta

cinamoilación son las bases de éster de H-7 y H-8 en 5.59, 5.49 ppm, mientras que la presencia de la nueva señal base de hidroxilo H-1 en 4.38 ppm confirma la reducción del carbonilo a hidroxilo. Finalmente, la señal base de hidroxilo H-9 corrobora que este grupo se encuentra sin esterificar (**FIGURA 4A, APÉNDICE A**).

El compuesto **12** se obtuvo con un rendimiento del 60% en forma de un sólido blanco cuya caracterización se llevó a cabo con base en sus espectros de RMN en una y dos dimensiones mostrando en su espectro de RMN de ^1H las señales de los hidrógenos aromáticos y vinílicos de 7.90 a 6.15 ppm, las bases de éster de H-7, H-8 y H-9 en 5.71, 5.57 y 5.47 ppm y la base de hidroxilo H-1 en 4.38 ppm (**FIGURA 7A, APÉNDICE A**).



Esquema 2. Preparación de los ésteres sesquiterpénicos **9**, **10**, **11** y **12** a partir de la 7,8,9-triol-1-ona **14**.

5.2. Determinación de la actividad estabilizante de microtúbulos *in vitro*

En este trabajo se llevó a cabo una evaluación preliminar de la influencia del dicinamato diol **11** y tricinamato diol **12** sobre la polimerización de la α,β -tubulina durante la formación de los microtúbulos. En este ensayo *in vitro* se empleó paclitaxel (**6**) como control positivo y DMSO como control negativo todo en un buffer de tubulina. Las concentraciones finales que se utilizaron para el ensayo fueron 10, 50 y 100 μM para los sesquiterpenos funcionalizados y de 10 μM para el paclitaxel (**6**). El ensayo consistió en medir el cambio de absorbancia a temperatura controlada de 37° C durante 60 min al igual que como se llevó a cabo en un trabajo previo con los derivados carbonílicos **9** y **10**.

En la Figura 10 se ilustra el comportamiento del 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**) sobre la polimerización de la tubulina para formar los microtúbulos. Este compuesto resultó ser un excelente agente promotor de la polimerización de los microtúbulos siendo el compuesto que mejor actividad presentó en el ensayo de polimerización *in vitro* de la α,β - tubulina ya que se logró apreciar un aumento en la velocidad de polimerización con respecto a la del paclitaxel (**6**). A las concentraciones de 10 y 50 μM se puede observar una mejor actividad comparada a la del paclitaxel a 10 μM . La actividad se disparó sorprendentemente a 100 μM lo que muestra que es un buen agente promotor de la polimerización tomando como referencia al paclitaxel (**6**). Cabe destacar que el compuesto **11** posee una estructura menos compleja que la del paclitaxel.

En la Figura 11 se muestra el comportamiento del 7,8,9-tricinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**12**) sobre la polimerización de los microtúbulos. Este compuesto no resultó ser tan buen promotor de la polimerización ya que a una concentración de 100 μM presenta un comportamiento parecido al del paclitaxel a 10 μM , mientras que a concentraciones de 50 y 10 μM presenta un comportamiento ligeramente superior al del control de DMSO.

Los resultados obtenidos para los sesquiterpenos **11** y **12** concuerdan con los obtenidos para **9** y **10** en un estudio previo [76], ya que la adición de los grupos cinamato demostró ser muy efectiva en la interacción con la proteína de acuerdo con modelo de acoplamiento molecular. Además, los resultados de los compuestos **11** y **12** muestran que el grupo carbonilo en la posición C-1 no es esencial en la actividad de los derivados del longipinano como promotores de la polimerización de la tubulina, pero la presencia del nuevo grupo hidroxilo en C-1 sí mejora su solubilidad en sistemas acuosos.

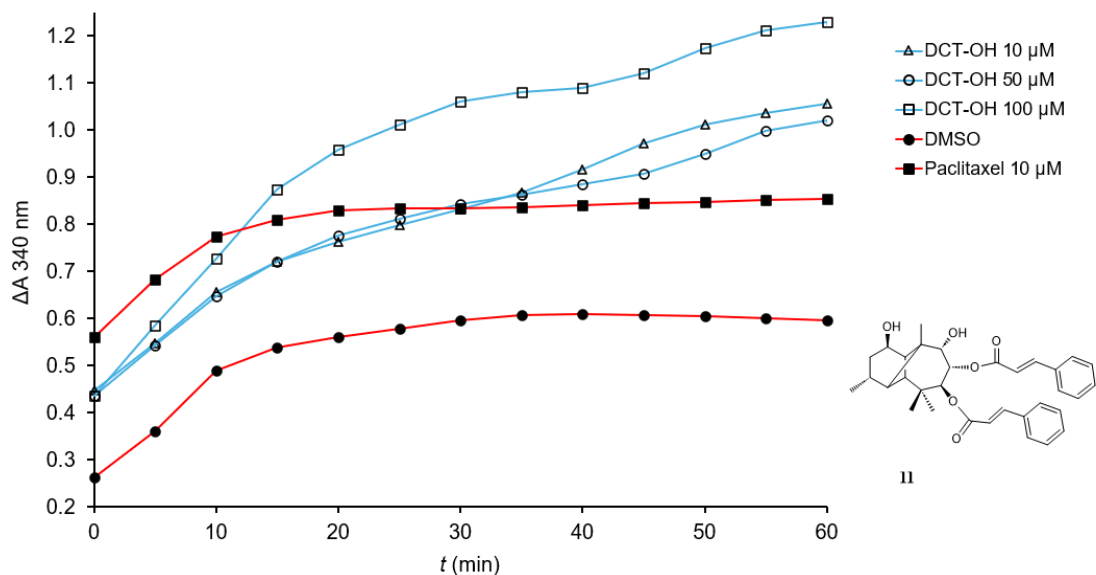


Figura 10. Efecto del 7,8-dicinnamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**) sobre la polimerización de la α,β -tubulina.

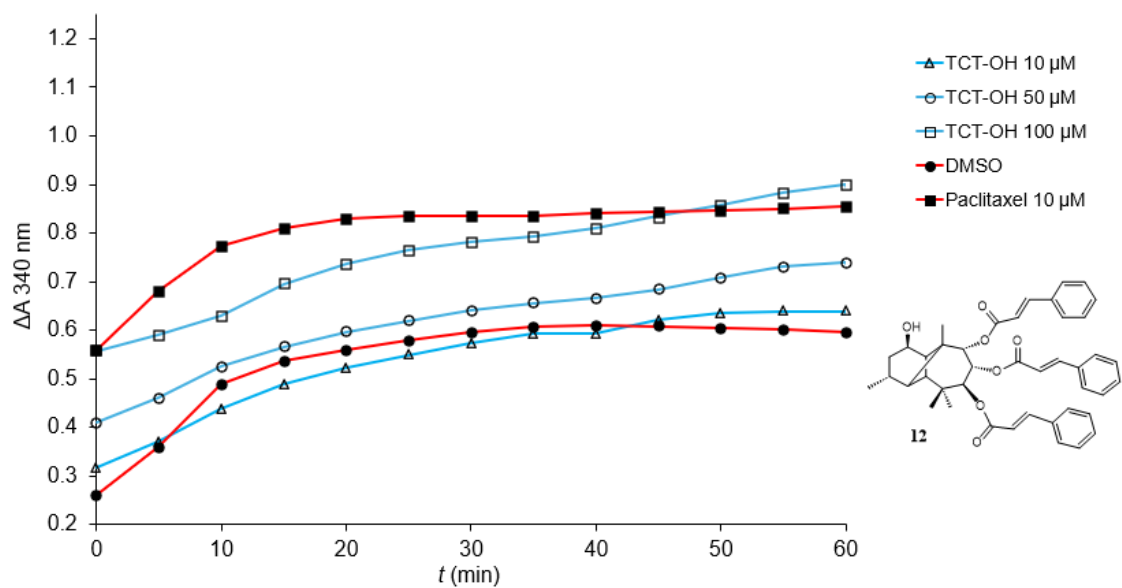


Figura 11. Efecto del 7,8,9-tricinnamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**12**) sobre la polimerización de la α,β -tubulina.

5.3. Estudios de reconocimiento molecular *in silico*

Como ya se mencionó en el apartado 1.7, el reconocimiento molecular es una de las metodologías que permite determinar el sitio de unión de un compuesto a una proteína. Justamente en este trabajo se realizó la identificación de los posibles sitios de unión de los compuestos sintetizados con el heterodímero α,β -tubulina, tomando como referencia el sitio de unión del paclitaxel debido a que estudios previos indicaron que los ésteres cinámicos del longipinano tienen afinidad por dicho sitio, propiciando un incremento en la polimerización de la tubulina y una actividad estabilizadora de los microtúbulos [76, 79, 80].

El ensayo *in silico* se inició con el modelado de los compuestos y con la búsqueda conformacional de cada uno bajo la obtención del mínimo de energía global de la estructura utilizando mecánica molecular con el campo de fuerza Merck (MMFF94) en el programa Chem3D versión 21.0. El mínimo global se sometió a una optimización de la geometría empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) a nivel B3LYP/DGDZVP en el programa Gaussian 09 [81], esto con el fin de obtener un modelado más preciso de los compuestos que fueron utilizados como ligandos en el programa AutoDock Tools. La estructura de la proteína y la del ligando (paclitaxel) se adquirieron del archivo cristalográfico del *RCSB Protein Data Bank* bajo el código 1JFF [77], para ser procesados con el programa AutoDock Tools. El estudio de *docking* se realizó empleando el programa PyRx que viene integrado con AutoDock Tools y AutoDock Vina [82,83] a través de su interfaz UCSF Chimera 1.17.3 [84]. Gracias a que se conocía el sitio de unión del paclitaxel como ligando en la unidad de β -tubulina del cristal 1JFF, se realizó un *docking* dirigido al sitio de unión con un *grid* (Centro 32.7377, 27.9796, 30.4847; Tamaño -1.3688, -17.1842, 13.4366) manteniendo la configuración predeterminada para todos los parámetros. La preparación de la proteína se hizo con la herramienta Dock Prep del programa UCSF Chimera 1.17.3 con la configuración predeterminada y para los ligandos se utilizaron las estructuras optimizadas antes descritas con Chem3D. El programa Discovery Studio 24.1.0 [85] se utilizó para la determinación de las interacciones principales proteína-ligando y los modelos 2D se obtuvieron de los resultados de *docking* generados con Autodock Vina. Debido a que los compuestos presentaron un efecto significativo en la polimerización de la tubulina, los resultados de *docking* se compararon con los del paclitaxel. En la **Figura 12** se ilustra su sitio de unión con una $E_{\text{dock}} = -9.0$ kcal/mol.

La validación del método se llevó a cabo mediante la comparación del resultado del paclitaxel (**6**) con la estructura cristalográfica del heterodímero de α,β -tubulina, **Figura 13a** obtenida del RCSB PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*) con el código IJFF [77]. Se observó que la interacción de *docking* entre una nueva molécula de paclitaxel (**6**) y la tubulina vacía, es decir sin el ligando, se generó en el mismo sitio de unión con una orientación semejante (**Figura 13b**). Adicionalmente, se determinó el RMSD (*Root Mean Square Deviation*) con UCSF Chimera 1.17.3 que resultó de 1.4 Å. Cabe señalar que para que el estudio de *docking* sea válido el RMSD entre la proteína cristalizada con el ligando y la proteína con el nuevo ligando debe ser menor a 2.0 Å.

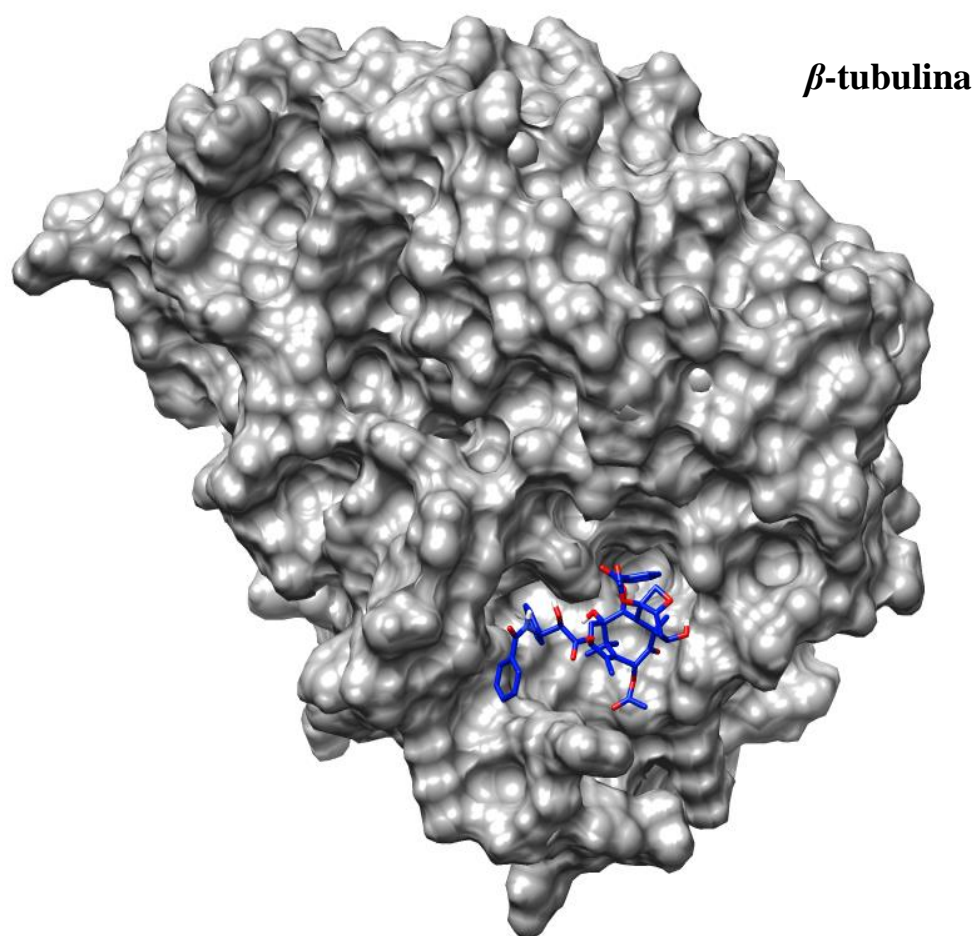


Figura 12. Modo de unión de mayor afinidad del paclitaxel (**6**) en la unidad β -tubulina obtenido por *docking* dirigido, $E_{\text{dock}} = -9.0$ kcal/ mol.

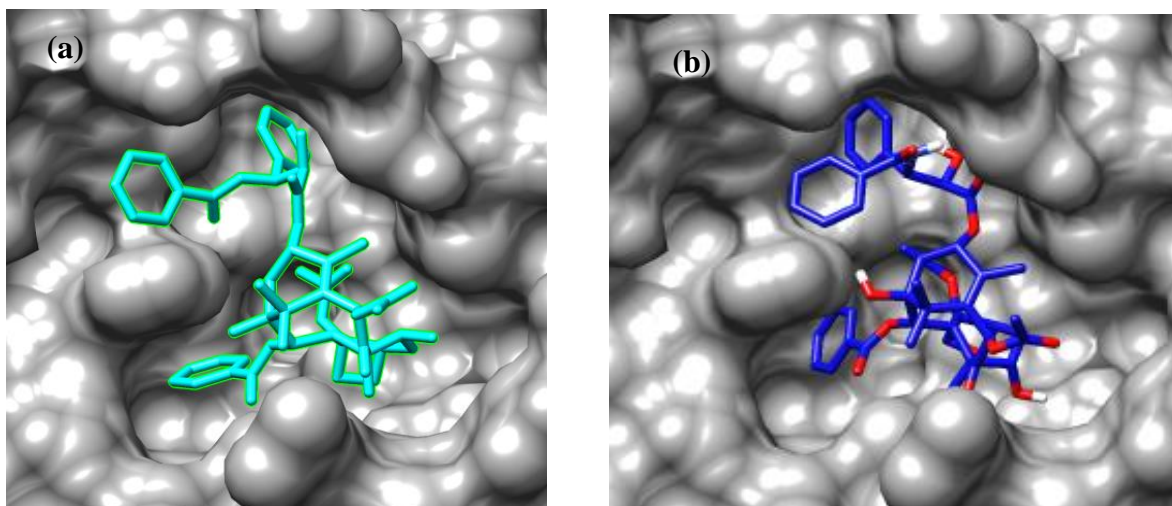


Figura 13. (a) Ampliación del sitio de unión de la estructura cristalográfica del heterodímero α,β -tubulina con paclitaxel (**6**) en color azul turquesa. (b) Modo de unión de paclitaxel obtenido por *docking* dirigido en color azul marino ($E_{\text{dock}} = 9.0$ kcal/mol), tomando como punto de partida la estructura cristalográfica de la tubulina.

Los sesquiterpenos funcionalizados **9**, **10**, **11**, **12**, **14** y **18** se evaluaron con el heterodímero de tubulina mediante un *docking* dirigido con el fin de comprobar el sitio de interacción de los compuestos **9** y **10**, ya reportados específicamente en un bolsillo hidrofóbico profundo que incluye el bucle M de la unidad β , un segmento esencial para la polimerización y para la estabilización de microtúbulos [76]. Todos los compuestos, incluyendo los compuestos nuevos **11** y **12**, mostraron tener una cierta interacción en dicho bolsillo hidrofóbico que es el mismo sitio de interacción del paclitaxel aunque con diferentes energías. En la **Tabla 2** se presentan las energías de afinidad al sitio de unión E_{dock} del *docking* dirigido para cada sustancia. Los compuestos con mejor afinidad resultaron ser los reducidos con un hidroxilo en C-1 con $E_{\text{dock}} = -9.2$ kcal/mol para **11** y $E_{\text{dock}} = -8.6$ kcal/mol para **12**, en comparación con los precursores **9** de $E_{\text{dock}} = -7.3$ kcal/mol y **10** de $E_{\text{dock}} = -8.5$ kcal/mol. Cabe mencionar que los compuestos sin cinamatos presentaron energías de interacción mucho menores, así el compuesto **14** resultó con una $E_{\text{dock}} = -6.3$ kcal/mol y el compuesto **18** con una $E_{\text{dock}} = -6.5$ kcal/mol. Los resultados *in silico* para los nuevos compuestos **11** y **12** concordaron con los

resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* ya que el dicinamato diol **11** mostró tener una muy buena actividad al favorecer la polimerización de la tubulina (**Figura 10**), mientras que el compuesto **12**, con una menor E_{dock} , resultó tener menor actividad en la polimerización de la tubulina que el compuesto **11**. Este resultado es muy interesante ya que reafirma la interacción de los nuevos en el bolsillo hidrofóbico situado en la β -tubulina. Es importante mencionar que estas pruebas, aunque preliminares, nos dan información valiosa, pero aun así habría que considerar qué sucede con la despolimerización de los microtúbulos, así como en algunas otras pruebas de competencia e incluso en estudios con líneas celulares de cáncer.

Tabla 2. Afinidad de unión de los sesquiterpenos funcionalizados **9**, **10**, **11**, **12**, **14**, **18** en comparación con la afinidad del paclitaxel (**6**).

Compuesto	Afinidad de unión (E_{dock} en kcal/mol)
paclitaxel (6)	-9.0
9	-7.3
10	-8.5
11	-9.2
12	-8.6
14	-6.3
18	-6.5

En la **Figura 14** se comparan las interacciones que presentan los sesquiterpenos funcionalizados y el paclitaxel con la tubulina. Se puede observar la disposición de los grupos cinamato, responsables en gran medida de la actividad en la polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos. Como se mencionó anteriormente, el 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**) presentó la mejor afinidad a la β -tubulina con un $E_{\text{dock}} = -9.2$ kcal/mol en comparación con los compuestos **9**, **10**, **12**, **14** y **18** mostrados en la **Tabla 2**. Las interacciones de **11** con los residuos de aminoácidos del sitio activo en la tubulina se compararon con las interacciones del paclitaxel (**6**) (**Figura 16**). El compuesto **11** presentó interacciones hidrofóbicas de tipo π - π entre el grupo cinamato en posición C-7 y los residuos de Leu-219, Asp-226 e His-229 de la β -tubulina.

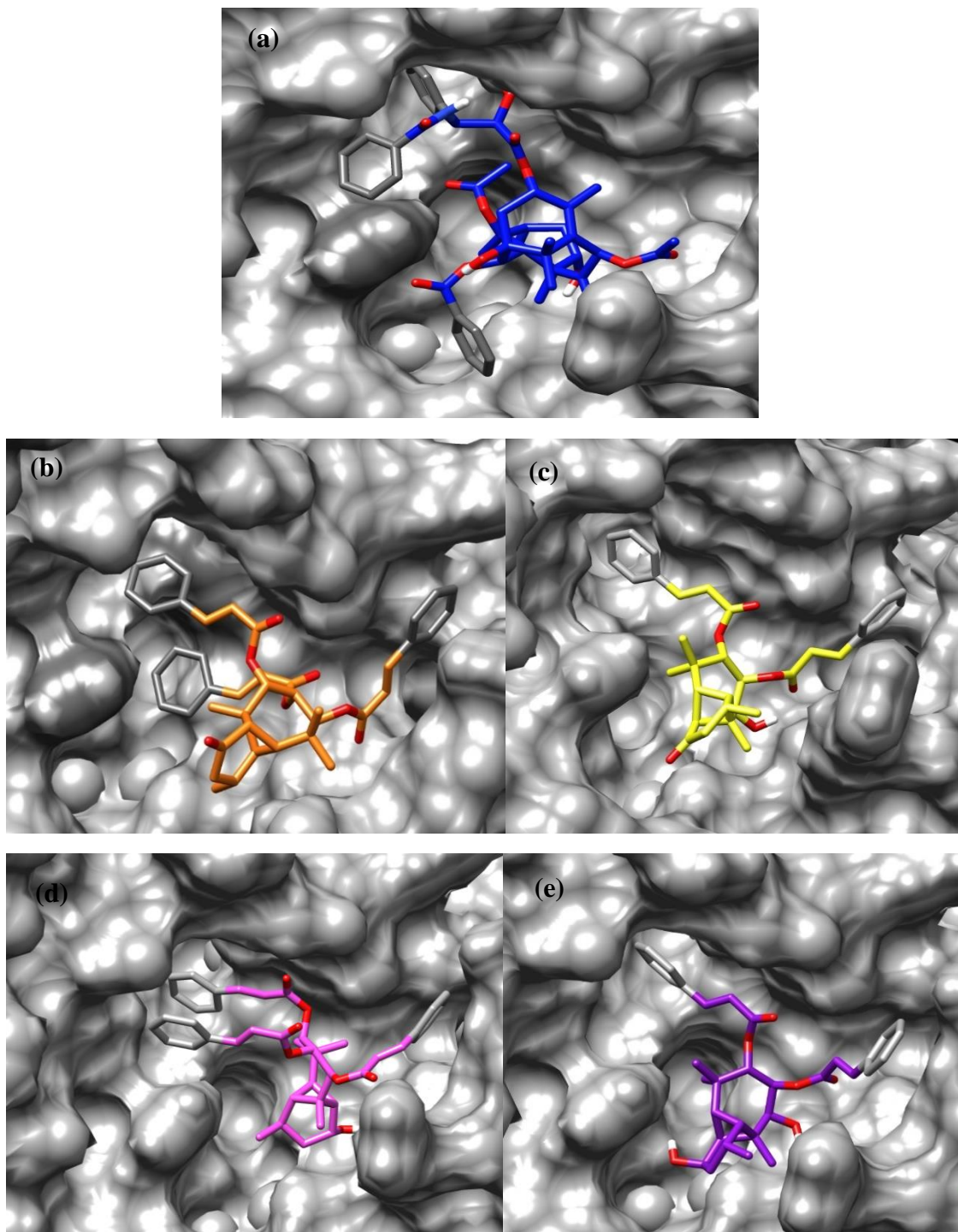


Figura 14. Comparación de las interacciones de los sesquiterpenos funcionalizados con el paclitaxel. (a) Interacción del paclitaxel (**6**) en su sitio activo. (b) Interacción de **9** en el sitio del paclitaxel. (c) Interacción de **10** en el sitio del paclitaxel. (d) Interacción de **11** con el sitio del paclitaxel. (e) Interacción de **12** con el sitio de paclitaxel.

Además, el grupo cinamato en posición C-8 de **11** presentó interacciones hidrofóbicas con los residuos Val-23 y Pro-360 de la β -tubulina. Finalmente, una interacción que resultó interesante fue el puente de hidrógeno que se forma entre el oxígeno del grupo hidroxilo de la posición C-9 de **11** y el hidrógeno del grupo amino del residuo de Pro-274 (**Figura 16**). Este compuesto (**11**) presentó interacciones semejantes en Val-23, Pro-360, Leu-275 y Leu-371 a las del paclitaxel (**6**), lo que comprueba que **6** y **11** se unen en el mismo sitio. El precursor 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**9**) y el dicinamato reducido en C-1 denominado como 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**) presentaron interacciones semejantes en Val-23, Leu-217, His-229, Leu-275 y Leu-371. Las interacciones los compuestos estudiados (**6**, **9**, **10**, **11**, **12**, **14** y **18**) se muestran en la **Tabla 3**.

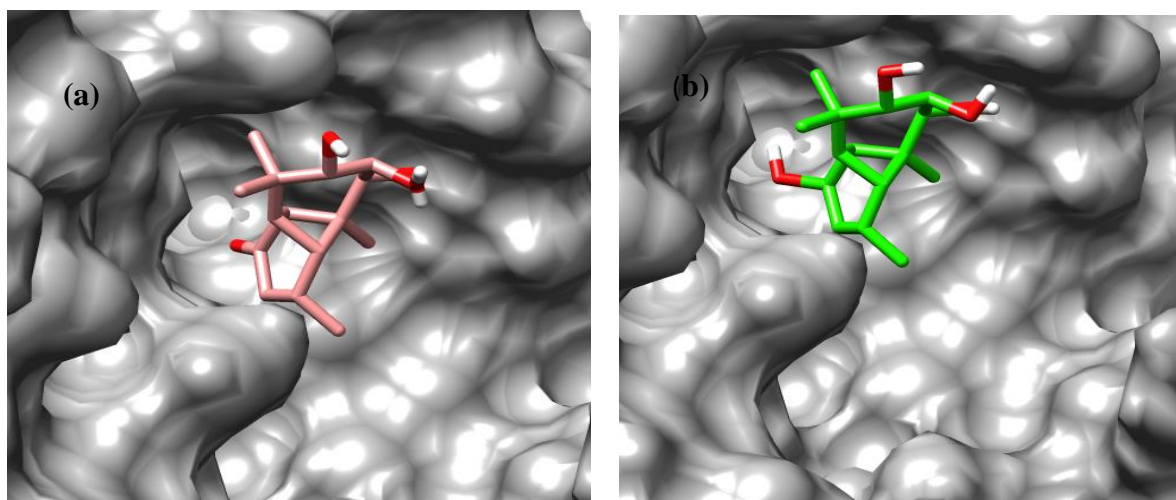


Figura 15. Interacciones de los derivados del longipinano sin esterificar. (a) Interacción de **14** en el sitio del paclitaxel. (b) Interacción de **18** en el sitio del paclitaxel.

Tabla 3. Interacción de los compuestos **6**, **9**, **10**, **11**, **12**, **14** y **18** con residuos de aminoácidos de la β -tubulina.

Compuesto	Interacción con residuos de aminoácidos
Paclitaxel (6)	Val23, Asn26, Leu217, Leu219, His229, Leu230, Ala233, Ser236, Phe272, Pro274, Leu275, Thr276, Ser277, Arg278.
9	Val 23, Leu 217, His 229, Ala 233, Leu 275, Arg 369, Leu 371 (Puente de hidrógeno).
10	Val 23, His 229, Phe 272 (interacción π - π), Pro-274 (Puente de hidrógeno), Leu 275, Gln 282, Pro-360, Arg 369, Gly 370, Leu 371 (puente de hidrógeno),
11	Val23, Leu 217, Leu219, Asp226, His229 (interacción π - π), Leu230, Pro274 (puente de hidrógeno), Leu275, Pro360, Leu 371.
12	Val23, Asn26, Ala233, Leu275, Gly370, Arg369.
14	Val 23, His 229, Phe 272, Pro 360, Arg 369 (Puente de hidrógeno), Leu 371.
18	Val23, His229, Phe272, Ala233, Pro360, Arg369, Leu371.

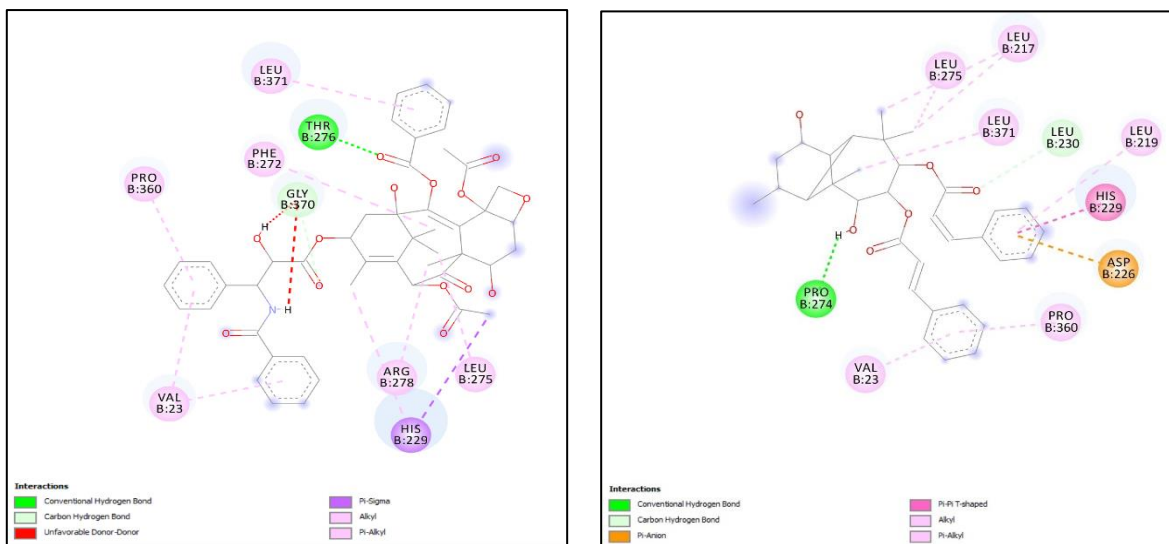


Figura 16. Interacciones del compuesto **11** con mayor afinidad y del paclitaxel (**6**) con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenidas por *docking* dirigido.

5.4. Determinación teórica del log P

La complejidad estructural de los compuestos de origen natural puede, en cierta ocasiones, generar limitaciones farmacológicas cuando ocurre una baja biodisponibilidad en el sitio de acción causada por una solubilidad reducida. Para que una molécula pueda ser considerada candidata a fármaco es deseable que cumpla ciertas características clave, entre ellas una solubilidad adecuada, reflejada en un valor de $\log P < 5.2$ [87]. Los cálculos del coeficiente de partición ($\log P$) se realizaron empleando la teoría de funcionales de densidad (DFT) a nivel B3LYP/6-31G* con el programa Spartan'04 para los compuestos **9**, **10**, **11** y **12** con el objetivo de cuantificar su solubilidad, como se muestra en la **Tabla 4**.

El compuesto **11** presentó un $\log P = 4.51$ que se encuentra dentro del rango aceptable para ser un fármaco potencial en términos de solubilidad en comparación con su precursor, el dicinamato **9**, que mostró un $\log P = 6.43$, fuera del rango deseable. Además, aunque el compuesto **12** también mostró una mejora en su solubilidad con un $\log P = 8.75$, no logró situarse dentro del rango permitido, al igual que su precursor, el compuesto **10** ($\log P = 9.07$). Este análisis comprueba que la reducción del carbonilo a hidroxilo en la posición C-1 de los compuestos **9** y **10** para dar los compuestos **11** y **12**, respectivamente, aumenta la polaridad de la molécula mejorando la solubilidad de los compuestos promotores de la polimerización de la tubulina. Con base en los resultados de los estudios *in vitro*, el compuesto **11** mantiene la actividad promotora de polimerización de los microtúbulos con una mejor solubilidad en comparación con el compuesto **9** previamente estudiado [76].

Tabla 4. Coeficiente de partición ($\log P$) de los compuestos **9**, **10**, **11** y **12**.

Compuesto	Log P	Compuesto	Log P
9	6.43	11	4.51
10	9.07	12	8.75

6. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se prepararon los derivados del longipinano **9** y **10** a partir de la longipinan-7,8,9-triol-1-ona **14**.
- Se prepararon y caracterizaron dos nuevos derivados de longipinano **11** y **12** mediante una secuencia de reacciones a partir de la longipinan-7,8,9-triol-1-ona **14**.
- Se evaluó el efecto de los derivados sesquiterpénicos polifuncionalizados (**11** y **12**) en la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina.
- Los estudios de reconocimiento molecular (*docking*) revelaron que el derivado del longipinano **11** ($E_{\text{dock}} = -9.2$ kcal/ mol) interactúa en el sitio del paclitaxel.
- Los cálculos del coeficiente de partición (P) revelaron que el derivado de longipinano dicinamoylado **11** con un $\log P = 4.51$ es un posible candidato a fármaco con base en el rango permisible para este parámetro ($\log P < 5.2$).

7. CONCLUSIONES

- La incorporación de ésteres aromáticos al esqueleto de longipinano en combinación con la presencia de grupos hidroxilo mejoró la solubilidad de los compuestos, incrementando su actividad promotora de la polimerización de los microtúbulos. Las pruebas *in vitro* y los estudios de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*) comprobaron dicha actividad, mientras que los cálculos teóricos del coeficiente de partición $\log P$ sustentaron los resultados de solubilidad.
- El compuesto que presentó una mayor actividad promotora de la polimerización de la tubulina *in vitro* fue el derivado de longipinano que tiene en su estructura dos grupos cinamoilo y dos grupos hidroxilo en las posiciones C-1 y C-9, cuya estructura corresponde al 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**).
- El compuesto que presentó una mejor solubilidad al situarse en el rango permitido de $\log P$ fue el 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**).

8. PERSPECTIVAS

- Optimizar el rendimiento de reacción del dicinamato **11** ensayando nuevas condiciones de reacción y nuevas rutas de síntesis.
- Continuar con estudios biológicos del compuesto **11** para conocer la concentración mínima inhibitoria en líneas celulares de cáncer y realizar ensayos de apoptosis y citotoxicidad.
- Realizar ensayos adicionales *in vitro* de los compuestos **9**, **10**, **11** y **12**.
- Realizar estudios de RMN de transferencia de saturación en los compuestos **11** y **12**.
- Realizar pruebas del derivado **11** en animales, comenzando por roedores para determinar la dosis letal 50 (DL₅₀).

9. PARTE EXPERIMENTAL (MATERIALES Y MÉTODOS)

9.1 Procedimientos generales para la purificación de compuestos

9.1.1 Cromatografía

Se empleó la técnica de cromatografía en columna abierta para purificar los compuestos sintetizados. Se empacaron columnas de vidrio con gel de sílice de 230-400 mesh como fase estacionaria y se utilizaron mezclas de disolventes como fase móvil para separar cada compuesto según sus características, todo a presión atmosférica.

Para la identificación de los compuestos se utilizó cromatografía en capa fina. Se usaron placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 20 × 20 cm. Se utilizó luz UV de onda corta (254 nm) para la visualización de los compuestos presentes en las placas.

9.2 Información general para la identificación y caracterización estructural de los derivados del longipinano

9.2.1 Punto de fusión

La determinación del punto de fusión se llevó a cabo empleando un aparato Fisher-Johns con placa metálica que se calienta de manera eléctrica en una escala que va de 0 a 300°C.

9.2.2 Rotación específica

Las rotaciones específicas se midieron en CHCl_3 a cinco longitudes de onda (589, 578, 546, 436 y 365 nm) empleando un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341.

9.2.3 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro BioTools dualPEM ChiralIR FT, empleando CHCl_3 como disolvente. Las soluciones se colocaron en una celda de BaF_2 con una longitud de trayectoria de 100 micrómetros. Para cada compuesto se indican las bandas más relevantes con una resolución de 4 cm^{-1} .

9.2.4 Espectroscopía de ultravioleta (UV).

Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo Lambda 12, empleando etanol como disolvente.

9.2.5 Espectrometría de masas (EM)

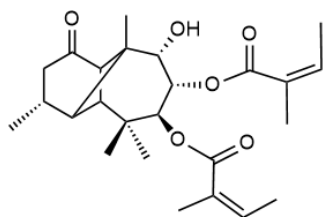
Los espectros de masas se obtuvieron a baja y alta resolución. Los espectros de baja resolución se registraron utilizando un espectrómetro Agilent Technologies 6120 Quadrupole LC/MS mediante ionización por electrospray (ESI), mientras que los de alta resolución se obtuvieron con un espectrómetro Orbitrap Exploris 120 de Thermo Scientific.

9.2.6 Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H se obtuvieron a 300 y 400 MHz y los de ^{13}C a 75.4 y 100 MHz en espectrómetros Varian Mercury 300 y Bruker Avance 400, utilizando CDCl_3 como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Adicionalmente, se realizaron experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC para corroborar las asignaciones. La multiplicidad de las señales se describe con las siguientes abreviaciones como: s (singulete), d (doblete), dd (doblete de dobletes), t (triplete), tt (triplete de tripletes), q (cuarteto) y m (multiplete).

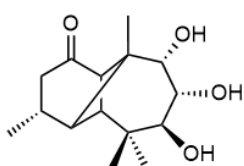
9.3 Obtención de precursores para la funcionalización de derivados de longipinano.

9.3.1 Obtención de rasteviona (13)



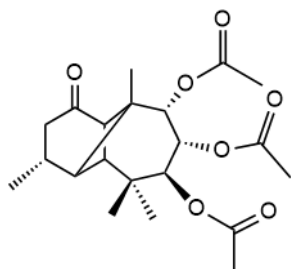
El compuesto natural rasteviona (**13**) fue aislado de *Stevia serrata* Cav. El proceso de extracción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la referencia [86].

9.3.2 Obtención de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (14)



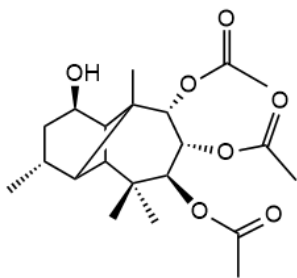
Se preparó una solución de 4 g de cristales de rasteviona (**13**) en 50 mL de metanol, a la mezcla se añadieron 4 g de hidróxido de potasio disuelto en 0.5 mL de agua. La mezcla se sometió a reflujo durante 2 h. Pasado el tiempo de reacción, la mezcla se concentró evaporando el disolvente a temperatura ambiente con agitación. El concentrado se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua hasta obtener un aspecto incoloro, se secó con sulfato de sodio anhidro para después evaporarse en el rotavapor para dar el compuesto **14** con un rendimiento del 89% [86].

9.3.3 Obtención de 7,8,9-triacetato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (16)



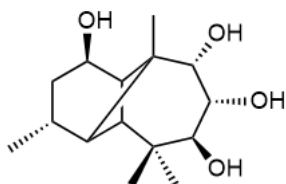
Se preparó una solución de 100 mg de longipinan-7,8,9-triol-1-ona **14** en 2 mL de piridina y 2 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se calentó en baño de vapor durante 3 h. Pasado este tiempo, se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 10%, una vez con agua, tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y tres veces con agua. Finalmente, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor hasta obtener un sólido incoloro que se recristalizó con metanol-hexano para obtener el compuesto **16** como cristales blancos con un punto de fusión de 279-280 °C con un rendimiento del 70% [86].

9.3.4 Obtención de 7,8,9-triacetato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (17)



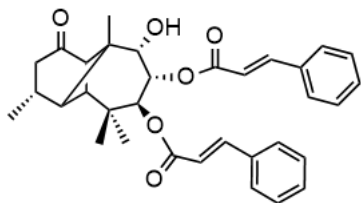
Se preparó una solución de 50 mg de 7,8,9-triacetato de longipinen-1-ona (**16**) disuelta en 1.5 mL de metanol grado espectroscópico. La solución se enfrió sobre hielo 5 minutos en agitación constante, se añadieron 40 mg de borohidruro de sodio y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a temperatura ambiente, el concentrado se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó tres veces con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguida de tres lavados con salmuera y dos con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad obteniéndose **17** como un polvo blanco con un rendimiento del 70% [86].

9.3.5 Obtención de longipinan-1,7,8,9-tetraol (18)



Una solución de 50 mg de 7,8,9-triacetato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**17**) en 1 mL de metanol se trató con una solución de 50 mg de hidróxido de potasio disuelto en la mínima cantidad de agua. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 h y se concentró en rotavapor. El concentrado se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó varias veces con agua hasta mostrar un aspecto incoloro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor. Se obtuvo **18** como un polvo blanco con un rendimiento del 90%.

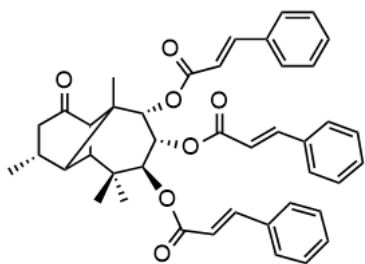
9.3.6 Obtención de 7,8-dicinnamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (9)



Una solución de 50 mg de longipinan-7,8,9-triol-1-ona **14**, 40 mg de ácido cinámico, 40 mg de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida y 5 mg de 4-dimetilaminopiridina en 10 mL de *o*-xileno se dejó reaccionar en agitación a temperatura ambiente durante 72 h. Pasado el tiempo de reacción, se adicionaron 5 mL de agua y se

continuó con la agitación a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se filtró y extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, solución de ácido acético al 5%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad en rotavapor. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de 2 cm empacada en gel de sílice 230-400 mesh, eluyendo con hexano, hexano-acetato de etilo (85:15) y acetato de etilo para dar 10 mg (10%) del compuesto **9** como aceite incoloro. Los desplazamientos químicos del espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **9** resultaron idénticos a los reportados en la referencia [76].

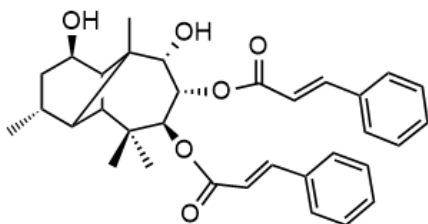
9.3.7 Obtención del 7,8,9-tricinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**10**)



Las fracciones residuales de la cromatografía de la reacción anterior (sección 9.3.6) se recromatografiaron en una columna de 2.5 cm de diámetro empacada con gel de sílice 230-400 mesh, eluyendo con hexano, hexano-diclorometano-acetona (50:49:1) y diclorometano-acetona (99:1). El compuesto **10**, parcialmente purificado, se recromatografió una vez más en gel de sílice eluyendo con hexano-acetato de etilo (85:15) y acetato de etilo. De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo (85:15) se obtuvieron 15 mg (15%) del compuesto **10**. Los desplazamientos químicos del espectro de RMN de ^1H a 300 MHz resultaron idénticos a los descritos en la referencia [76], lo que comprobó la identidad del compuesto.

9.4 Síntesis y caracterización espectroscópica de nuevos derivados funcionalizados

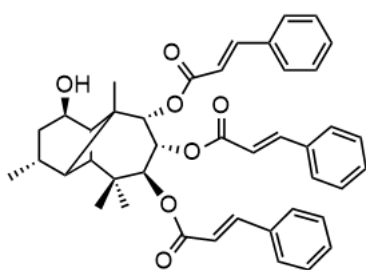
9.4.1 Obtención de 7,8-dicinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**)



Una solución de 10 mg de 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona **9** en 0.3 mL de metanol se enfrió sobre hielo 5 minutos bajo agitación constante. La solución se trató con 8 mg de borohidruro de sodio y se dejó reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con

acetato de etilo. La fase orgánica se lavó tres veces con salmuera y dos veces con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de 1.5 cm empacada en gel de sílice 230-400 mesh eluyendo con hexano, diclorometano y diclorometano-acetona (95:5) para dar 5 mg (50%) del compuesto **11** que mostró $[\alpha]_{589}^{+100}$, $[\alpha]_{578}^{+107}$, $[\alpha]_{546}^{+129}$, $[\alpha]_{436}^{+320}$, $[\alpha]_{365}^{+998}$ (c 1.0, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} 217 (log ϵ 4.23), 223 (log ϵ 4.14), 273 (log ϵ 4.38); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 7.63 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-18'), 7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-18), 7.33 (5H, m, Ar), 7.27 (5H, m, Ar), 6.35 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-17), 6.31 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-17'), 5.59 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-7), 5.49 (1H, dd, $J = 11.1, 2.6$ Hz, H-8), 4.38 (1H, br d, $J = 9.6$ Hz, H-1), 3.88 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-9), 2.64 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-11), 2.45 (1H, dq, $J = 9.2, 5.7$ Hz, H-3), 2.04 (1H, br s, H-5), 2.01 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-4), 1.93 (1H, dd, $J = 10.5, 2.3$ Hz, H-2 β), 1.81 (1H, dd, $J = 9.8, 5.7$ Hz, H-2 α), 1.36 (3H, s, Me-14), 1.10 (3H, s, Me-12) 1.00 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Me-15), 0.98 (3H, s, Me-13); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 166.6 (C-16), 165.7 (C16'), 146 (C-18), 145.3 (C-18'), 134.2 (C-19 y C-19'), 130.2 (C-22'), 130.3 (C-22), 128.7 (C-21, C-21', C-23 y C-23'), 128.1 (C-20' y C-24'), 128.1 (C-20 y C-24), 117.9 (C-17), 117.3 (C-17'), 76.8 (C-9), 73.5 (C-1), 71.4 (C-7), 71.2 (C-8), 49.4 (C-6), 44.6 (C-10), 43.8 (C-4), 41.6 (C-11), 35.2 (C-2), 34.9 (C-5), 30.2 (C-3), 27.4 (C-13), 21.3 (C-14), 21.1 (C-15), 20.0 (C-12); HRESIMS m/z 553.2536 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Calculado por $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_6 + \text{Na}^+$, 553.2561) (FIGURA 9A, APÉNDICE A).

9.4.2 Obtención de 7,8,9 -tricinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (12)



Una solución de 33 mg de 7,8,9-tricinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona **10** en 1 mL de metanol se enfrió sobre hielo durante 5 minutos bajo agitación constante. La solución se trató con 27 mg de borohidruro de sodio y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo.

La fase orgánica se lavó tres veces con salmuera y dos con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en rotavapor. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de 1.5 cm empacada en gel de sílice 230-400 mesh, eluyendo con hexano, diclorometano, diclorometano-acetona (99:1) y acetato de etilo para dar 19 mg (60%) del

compuesto 12 que mostró $[\alpha]_{589}^{+272}$, $[\alpha]_{578}^{+290}$, $[\alpha]_{546}^{+346}$, $[\alpha]_{436}^{+808}$, $[\alpha]_{365}^{+2222}$ (c 1.0, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} 217 (log ϵ 4.58), 223 (log ϵ 4.50), 273 (log ϵ 4.68); RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) 7.85 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-18), 7.57 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-18'), 7.45 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-18''), 7.43-7.10 (15H, m, Ar), 6.63 (1H, d, J = 16.0 Hz, 17), 6.33 (1H, d, J = 16.0 Hz, H17'), 6.16 (1H, d, J = 16.0 Hz, H17''), 5.71 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-7), 5.57 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz, H-8), 5.47 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-9), 4.38 (1H, m, H-1), 2.70 (1H, t, J = 4.7 Hz, H-11), 2.48 (1H, br dq, J = 6.9, 1.9 Hz, H-3), 2.17 (1H, s, H-4), 2.12 (1H, dd, J = 5.6, 2.1 Hz, H-5), 1.91 (1H, dd, J = 9.5, 2.7 Hz, H-2 α), 1.86 (1H, dd, J = 9.5, 5.8 Hz, H-2 β), 1.27 (3H, s, Me-14), 1.13 (3H, s, Me-12), 1.04 (3H, d, J = 6.9 Hz, Me-15), 1.01 (3H, s, Me-13); RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 166.89 (C-16), 166.35 (C16'), 165.67 (C16''), 145.61 (C-18), 145.51 (C-18'), 145.25 (C-18''), 134.65 (C-19''), 134.23 (C-19'), 134.18 (C-19), 130.27 (C-22''), 130.18 (C-22'), 130.04 (C-22), 128.8 (C-21, C-21', C21''), 128.5 (C-23, C-23', C-23''), 128.12 (C-20, C-20', C-20''), 128.03 (C-24, C-24', C-24''), 118.20 (C-17), 117.87 (C-17'), 117.39 (C-17''), 77.1 (C-9), 73.66 (C-1), 72.51 (C-7), 70.04 (C-8), 49.41 (C-6), 44.86 (C-10), 43.74 (C-4), 42.58 (C-11), 35.28 (C-2), 34.85 (C-5), 30.19 (C-3), 27.42 (C-13), 21.05 (C-15), 20.67 (C-14), 19.89 (C-12); HRESIMS m/z 683.2944 [M + Na]⁺ (Calculado por C₄₂ H₄₄ O₇ + Na⁺, 683.2979) (FIGURA 10A, APÉNDICE A).

9.5. Evaluación *in vitro* de la polimerización de α,β -tubulina

Los derivados del longipinano disueltos en DMSO se colocaron en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y media área, en alícuotas de 10 μ L de una concentración tal que permitiese obtener concentraciones finales de 10, 50 y 100 μ M. Se utilizó una solución de tubulina de cerebro bovino de >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E. U. A.) mantenida siempre a 0 °C. Para preparar la solución, la tubulina se descongeló y se disolvió la cantidad necesaria en buffer de tubulina (pH 6.9, sal sesquisódica del ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etansulfónico) 80.0 mM, cloruro de magnesio 2.0 mM, ácido etilenglicol-bis(β aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético 0.5 mM y 5'-trifosfato de guanosina 1.0 mM) para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL. La solución de tubulina se agregó, en alícuotas de 100 μ L, a los pozos con los compuestos. La placa de ELISA mantenida a 0 °C, se transfirió inmediatamente a un lector de placas BioTek precalentado a 37 °C durante 30 minutos. La polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina se monitoreó mediante

el cambio de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 60 minutos con temperatura controlada a 37 °C y con un periodo de mezclado inicial de 5 segundos. Después de 60 minutos de incubación la placa se llevó a una temperatura de -20 °C por 15 minutos. Después de este tiempo, la placa se colocó nuevamente en el lector por 30 minutos más a 37 °C. Los ensayos de polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura se realizaron por triplicado. Los resultados se graficaron en Excel para Windows.

9.6. Estudios de reconocimiento molecular *in silico*

Los estudios de reconocimiento molecular de los derivados del longipinano como agentes estabilizantes de los microtúbulos y el heterodímero α,β -tubulina se efectuaron mediante el software PyRx [82] que viene con AutoDock Tools y AutoDock Vina integrados para Windows [83]. Para la preparación de la proteína y de los modelos moleculares de los longipinanos se utilizó el programa AutoDock Tools para Windows versión 1.5.7. La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante Chimera versión 1.17.3 y el análisis se efectuó empleando el programa Discovery Studio 24.1.0 [85]. Las simulaciones computacionales se llevaron a cabo mediante una computadora personal que cuenta con un procesador 11th Gen Intel(R) Core (TM) i5-1135G7 a 2.42 GHz, 8.00 GB de RAM y una tarjeta de video de Intel(R) Iris (R) Xe Graphics a 4106 MB. El archivo cristalográfico de la proteína se obtuvo del Protein Data Bank RCSB [77], con el código 1JFF y los modelos moleculares de los derivados de longipinano se obtuvieron con el programa Spartan'04 para Windows.

9.7. Cálculos de log P

Los cálculos del coeficiente de partición (log P) se realizaron empleando la teoría de funcionales de densidad (DFT) a nivel B3LYP/6-31G* con el programa Spartan'04 para Windows en la computadora mencionada en la sección anterior.

10. REFERENCIAS

- [1] Naeem, A.; Hu, P.; Yang, M.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhu, W.; Zheng, Q. (2022). Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, 27, 8367 (1-64).
- [2] Foye, W. O. (2012). *Foye's principles of medicinal chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, E.U.A. 2012, 15-23.
- [3] Ravelo, A.; Braun, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España)*, 103, 409-419.
- [4] Fernández, M. (2020). *Códice De la Cruz-Badiano*. Universidades, 71, 241-244.
- [5] Atanasov, A. G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E. H.; Rollinger, J. M.; Schuster, D.; Breuss, J. M.; Bochkov, V.; Mihovilovic, M. D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V. M.; Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnology Advances*, 33, 1582-1614.
- [6] Newman, D. J.; Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83, 770-803.
- [7] Lubinska-Szczygeł, M.; Polkowska, Ż.; Tobolkova, B.; Majchrzak, T.; Polovka, M.; Promchote, P.; Gorinstein, S. (2024). Evaluation of terpene decomposition in kaffir lime juice during storage using gas chromatography–mass spectrometry and proton transfer reaction–mass spectrometry. *Molecules*, 29, 32-41.
- [8] Christmann, M. (2010). Otto Wallach: founder of terpene chemistry and Nobel laureate 1910. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 9580-9586.
- [9] Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357-367.
- [10] Zhao, D.; Jiang, L.; Li, H.; Yan, P.; Zhang, Y. (2016). Chemical components and pharmacological activities of terpene natural products from the genus *Paeonia*. *Molecules*, 21, 1362 (2-14).
- [11] Adekenov, S.; Maslova, O.; Iskakova, Z.; Daskaliyev, A. (2023). Cytotoxicity and antitumor activity of sesquiterpene lactones. Structure, activity. *ScienceRise Pharmaceutical Science*, 6, 53-63.
- [12] Kwok, B. H.; Koh, B.; Ndubuisi, M. I.; Elofsson, M.; Crews, C. M. (2001). The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IκB kinase. *Chemistry & Biology*, 8, 759-766.
- [13] Wu, J.; Wang, X.; Hou, Y.; Gong, P. (2024). Bioactivities and the structural modification of Parthenolide: a review. *Medicinal Chemistry Research*, 33, 221–238.

- [14] Cai, Z.; Gao, L.; Hu, K.; Wang, Q. M. (2024). Parthenolide enhances the metronomic chemotherapy effect of cyclophosphamide in lung cancer by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *World Journal of Clinical Oncology*, 15, 895–907.
- [15] Huang, L.; Liu, F.; Liu, X.; Niu, L.; Sun, L.; Fang, F.; Ma, K.; Hu, P. (2023). Parthenolide inhibits the proliferation and migration of cervical cancer cells via FAK/GSK3 β pathway. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 93, 203-213.
- [16] Denda, Y.; Matsuo, Y.; Sugita, S.; Eguchi, Y.; Nonoyama, K.; Murase, H.; Kato, T.; Imafuji, H.; Saito, K.; Morimoto, M.; Ogawa, R.; Takahashi, H.; Mitsui, A.; Kimura, M.; Takiguchi, S. (2024). The natural product parthenolide inhibits both angiogenesis and invasiveness and improves gemcitabine resistance by suppressing nuclear factor κ B activation in pancreatic cancer cell lines. *Nutrients*, 16, 705 (1-16).
- [17] Obulkasim, H.; Aji, G.; Abudoula, A.; Liu, Y.; Duan, S. (2024). Parthenolide induces gallbladder cancer cell apoptosis via MAPK signalling. *Annals of Medicine & Surgery*, 28, 1956-1966.
- [18] Gehren, A. S.; de Souza, W. F.; Sousa-Squiavinato, A. C. M.; Ramos, D. A. A.; Pires, B. R. B.; Abdelhay, E. S. F. W.; Morgado-Diaz, J. A. (2023). Parthenolide inhibits proliferation and invasion, promotes apoptosis, and reverts the cell–cell adhesion loss through downregulation of NF- κ B pathway TNF- α -activated in colorectal cancer cells. *Cell Biology International*, 47, 1638–1649.
- [19] Choi, Y. J.; Choi, Y. K.; Ko, S. G.; Cheon, C.; Kim, T. Y. (2023). Investigation of molecular mechanisms involved sensitivity to the anti-cancer activity of costunolide in breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 4009 (1-15).
- [20] Alhakamy, N. A.; Badr-Eldin, S. M.; Ahmed, O. A. A.; Aldawsari, H. M.; Okbazghi, S. Z.; Alfaleh, M. A.; Abdulaal, W. H.; Neamatallah, T.; Al-hejaili, O. D.; Fahmy, U. A. (2022). Green nanoemulsion stabilized by in situ self-assembled natural oil/native cyclodextrin complexes: An eco-friendly approach for enhancing anticancer activity of costunolide against lung cancer cells. *Pharmaceutics*, 14, 227(1-15).
- [21] Huang, H.; Park, S.; Zhang, H.; Park, S.; Kwon, W.; Kim, E.; Zhang, X.; Jang, S.; Yoon, D.; Choi, S. K.; Yi, J. K.; Kim, S. H.; Dong, Z.; Lee, M. H.; Ryoo, Z.; Kim, M. O. (2021). Targeting AKT with costunolide suppresses the growth of colorectal cancer cells and induces apoptosis in vitro and in vivo. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40, 114 (2-18).
- [22] Xu, C.; Huang, X.; Lei, X.; Jin, Z.; Wu, M.; Liu, X.; Huang, Y.; Zhao, X.; Xiong, Y.; Sun, J.; Duan, X.; Wang, J. (2021). Costunolide-induced apoptosis via promoting the reactive oxygen species and inhibiting AKT/GSK3 β pathway and activating autophagy in gastric cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 722734 (2-22).
- [23] El-Far, A. H.; Godugu, K.; Noreldin, A. E.; Saddiq, A. A.; Almaghrabi, O. A.; Al Jaouni, S. K.; Mousa, S. A. (2021). Thymoquinone and costunolide induce apoptosis of both

proliferative and doxorubicin-induced-senescent colon and breast cancer cells. *Integrative Cancer Therapies*, 20, 153473542110354 (1-20).

[24] Dhyani, P.; Sati, P.; Sharma, E.; Attri, D. C.; Bahukhandi, A.; Tynybekov, B.; Szopa, A.; Sharifi-Rad, J.; Calina, D.; Suleria, H. A. R.; Cho, W. C. (2022). Sesquiterpenoid lactones as potential anti-cancer agents: an update on molecular mechanisms and recent studies. *Cancer Cell International*, 22, 305 (1-18).

[25] Hjazzi, A.; Alissa, M.; Alqasem, A. A.; Alghamdi, A.; Alghamdi, S. A. (2024). Cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, triggers apoptotic cell death in triple negative breast cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 51, 856.

[26] Wang, L.; Bie, X.; Mickymaray, S.; Alothaim, A. S.; Pei, Y.; Gong, H. (2023). Induction of apoptosis by cynaropicrin in human colon cancer cell line HCT-116 through the mitochondria-mediated apoptotic pathway. *Pharmacognosy Magazine*, 19, 874–884.

[27] Rajabi, S.; Tahmasvand, Z.; Maresca, M.; Hamzeloo-Moghadam, M. (2024). Gaillardin inhibits autophagy and induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by regulating JAK/STAT pathway. *Molecular Biology Reports*, 51,158.

[28] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249.

[29] <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas#:~:text=En%202022%2C%20hubo%2020%20millones,aumentar%C3%A1%20a%2015%2C3%20millones>

[30] Brennan, P.; Davey-Smith, G. (2021). Identifying novel causes of cancers to enhance cancer prevention: new strategies are needed. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 114, 353-360.

[31] Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4, 127-129.

[32] Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

[33] Hanahan, D.; Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.

[34] Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, 12, 31-46.

[35] Esteller, M.; Dawson, M. A.; Kadoch, C.; Rassool, F. V.; Jones, P. A.; Baylin, S. B. (2024). The epigenetic hallmarks of cancer. *Cancer Discovery*, 14, 1783-1809.

[36] Naeem, A.; Hu, P.; Yang, M.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhu, W.; Zheng, Q. (2022). Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, 27, 8367 (1-64).

- [37] Muhammad, N.; Usmani, D.; Tarique, M.; Naz, H.; Ashraf, M.; Raliya, R.; Tabrez, S.; Zughaibi, T. A.; Alsaieedi, A.; Hakeem, I. J.; Suhail, M. (2022). The role of natural products and their multitargeted approach to treat solid cancer. *Cells*, 15, 2209 (2-20).
- [38] Dickens, E.; Ahmed, S. (2018). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 36, 134-138.
- [39] Gittes, F.; Mickey, B.; Nettleton, J. y Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of Cell Biology*, 120, 923-934.
- [40] Goodson, H. V.; Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10, 022608 (2-20).
- [41] Redemann, S.; Furthauer, S.; Shelley, M. y Muller-Reichert, T. (2019). Current approaches for the analysis of spindle organization. *Current Opinion in Structural Biology*, 58, 269-277.
- [42] Prosser, S. L.; Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 187-201.
- [43] Nachury, M. V.; Mick, D. U. (2019). Establishing and regulating the composition of cilia for signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 389-405.
- [44] Barlan, K.; Gelfand, V. I. (2017). Microtubule-based transport and distribution, tethering, and organization of organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9, 025817, 2-13.
- [45] Nogales, E.; Wolf, S.; Downing, K. H. (1998). Structure of the α - β tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391, 199-203.
- [46] Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. (2002). *Cell Biology*, Ed. Saunders/Elsevier, 579.
- [47] Akhmanova, A.; Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 711-726.
- [48] Mitchison, T.; Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312, 15-21.
- [49] Vicente, J. J.; Wordeman, L. (2019). The quantification and regulation of microtubule dynamics in the mitotic spindle. *Current Opinion in Cell Biology*, 60, 6-43.
- [50] Gardner, M., K.; Zanic, M.; Howard, J. (2013). Microtubule catastrophe and rescue. *Current Opinion in Cell Biology*, 25, 14-22.
- [51] Staton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Medicinal Research Reviews*, 31, 443-481.
- [52] Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 765-768.

- [53] Gudimchuk, N. B.; McIntosh, J. R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 777-795.
- [54] Janke, C.; Magiera, M. M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 307-326.
- [55] Zhang, R.; Alushin, G. M.; Brown, A.; Nogales, E. (2015). Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell*, 162, 849-859.
- [56] Pérez-Peña, H.; Abel, A.; Shevelev, M.; Prota, A.; Pieraccini, S.; Horvath, D. (2023). Computational approaches to the rational design of tubulin-targeting agents. *Biomolecules*, 13, 285 (2-35).
- [57] Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. (2012). An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharmaceutical Research*, 29, 43-71.
- [58] López-López, E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Medina-Franco, J. L. (2021). Tubulin inhibitors: a chemoinformatic analysis using cell-based data. *Molecules*, 24, 2483.
- [59] 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, 311-331.
- [60] 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, 1398-1426.
- [61] Coulup, S. K.; Georg, G. I. (2019). Revisiting microtubule targeting agents: α -tubulin and the pironetin binding site as unexplored targets for cancer therapeutics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29, 1865-1873.
- [62] Li, L.; Jiang, S.; Li, X.; Liu, Y.; Su, J.; Chen, J. (2018). Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 482-494.
- [63] Moudi, M.; Go, R.; Yien, C. Y.; Nazre, M. (2013). Alcaloides de la vinca. *International Journal of Preventive Medicine*, 4, 1231-1235.
- [64] Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Medicinal Research Reviews*, 31, 443-481.
- [65] Bates, D.; Eastman, A. (2017). Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83, 255-268.
- [66] Vergoten, G.; Bailly, C. (2023). Molecular docking of cryptoconcatones to α -tubulin and related pironetin analogues. *Plants*, 12, 296 (2-11).

- [67] Yang, J.; Wang, Y.; Wang, T.; Jiang, J.; Botting, C. H.; Liu, H.; Chen, Q.; Yang, J.; Naismith, J. H.; Zhu, X.; Chen, L. (2016). Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nature Communications*, 7, (1-9).
- [68] Usui, T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y.; Kanoh, N.; Kondoh, M.; Asao, T.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa, K.; Kitahara, T.; Osada, H. (2004). The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of α -tubulin. *Chemistry & Biology*, 11, 799-806.
- [69] Adessi, T. G.; Wagner, P. M.; Bisogno, F. R.; Nicotra, V. E.; Guido, M. E.; García, M. E. (2024b). Enhancing structural diversity through chemical engineering of *Ambrosia tenuifolia* extract for novel anti-glioblastoma compounds. *Scientific Reports*, 14, (2-14).
- [70] Mao, X.; Chen, J.; Yao, Y.; Liu, D.; Wang, H.; Chen, Y. (2024). Progress in phosphorylation of natural products. *Molecular Biology Reports*, 51, 697.
- [71] Xiao, Z.; Gu, Y.; Dong, H.; Liu, B.; Jin, W.; Li, J.; Ma, P.; Xu, H.; Hou, W. (2023). Strategic application of CuAAC click chemistry in the modification of natural products for anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 9, 100113 (2-21).
- [72] Pepper, J. W.; Findlay, C. S.; Kassen, R.; Spencer, S. L.; Maley, C. C. (2019). *Cancer research meets evolutionary biology. Evolutionary Applications*, 2, 62-70.
- [73] Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325-2327.
- [74] Ferrer, J. P.; Sánchez-Lamar, A. (2015). Mitotic targets of natural drugs and new strategies for the anti-cancer therapy. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4, 3-15.
- [75] Principe, D. R.; Underwood, P. W.; Korc, M.; Trevino, J. G.; Munshi, H. G.; Rana, A. (2021). The current treatment paradigm for pancreatic ductal adenocarcinoma and barriers to therapeutic efficacy. *Frontiers in Oncology*, 5, 688377 (2-25).
- [76] 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 (1-12).
- [77] <https://www ww pdb.org/>
- [78] Silva-Sánchez, B. (2011). Diseño de un nuevo derivado del *epi*-verticilol con actividad estabilizante de microtúbulos. *Tesis de Maestría*. Cinvestav, México.
- [79] García-Gutiérrez, H. A. (2010). Obtención de nuevos derivados del verticilano estabilizadores de microtúbulos a partir de productos naturales del género *Bursera*, *Tesis doctoral*. Cinvestav, México.
- [80] Yamazaki, Y.; Sumikura, M.; Masuda, Y.; Hayashi, Y.; Yasui, H.; Kiso, Y.; Hayashi, Y. (2012). Synthesis and structure-activity relationships of benzophenone-bearing

diketopiperazine-type anti-microtubule agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *20*, 4279-4289.

[81] Gaussian 09, Revision D.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

[82] Dallakyan, S.; Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. En: *Chemical Biology Methods and Protocols*. Ed. por J. E. Hempel, C. H. Williams, C. C. Hong, Springer Science+Business Media, New York. 1263, 243-50.

[83] Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A.F.; Forli, S. (2021). AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *61*, 3891-3898.

[84] <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

[85] <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer/>

[86] Román, L. U.; del Río, R. E.; Hernández, J. D.; Joseph-Nathan, P.; Zabel, V.; Watson, W. H. (1981). Structure, chemistry and stereochemistry of rastevione, a sesquiterpenoid from the genus *Stevia*. *Tetrahedron*, *37*, 2769-2778.

[87] Hehre, W. J. (1976). Ab initio molecular orbital theory. *Accounts of Chemical Research*, *9*, 399-406.

11. APÉNDICE A. Espectros de RMN de ^1H de **17** y **18**, y espectros de RMN de ^1H y funcionalizados **9-12**.

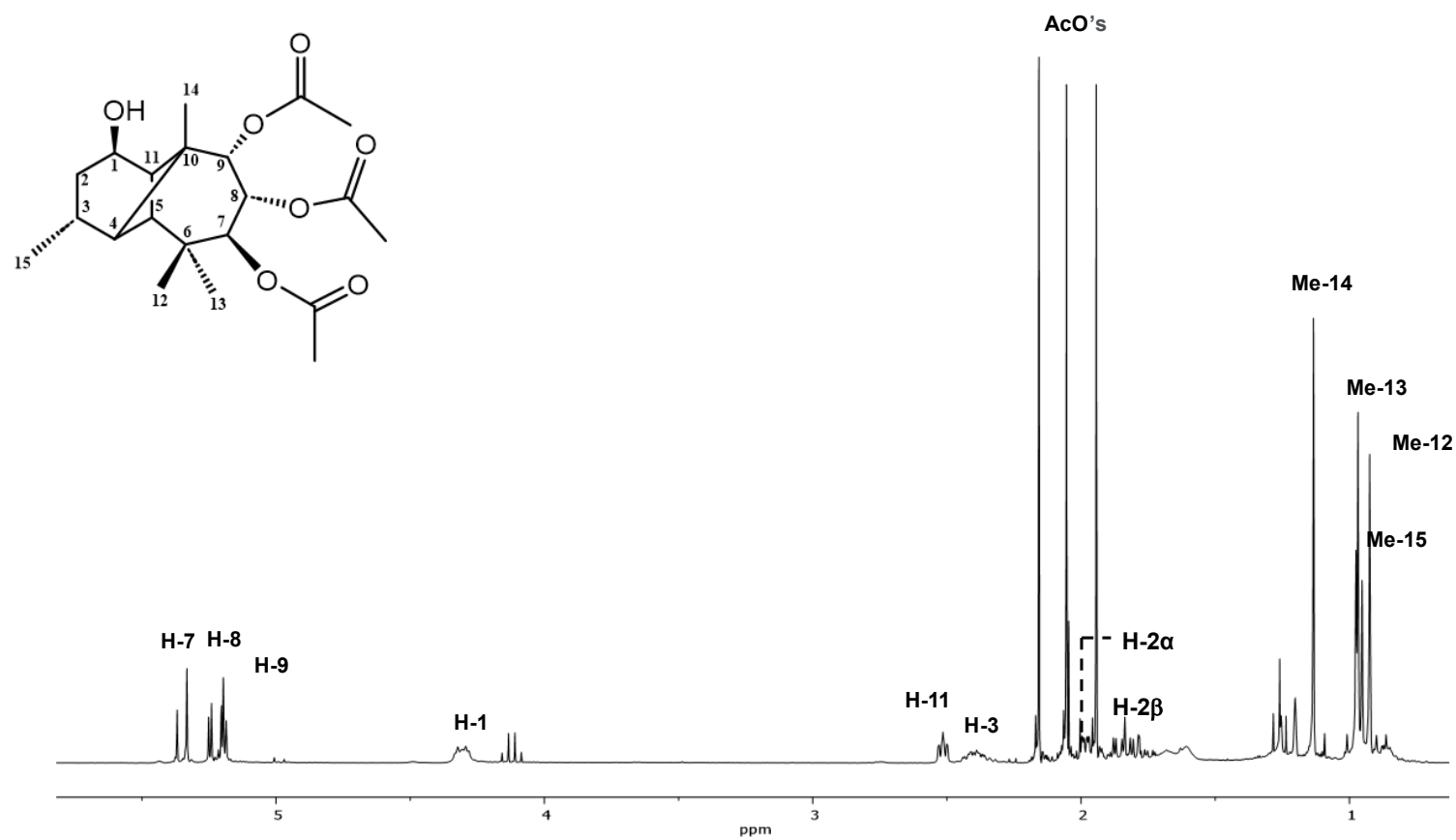


Figura 1A. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del 7,8,9-triacetato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**17**).

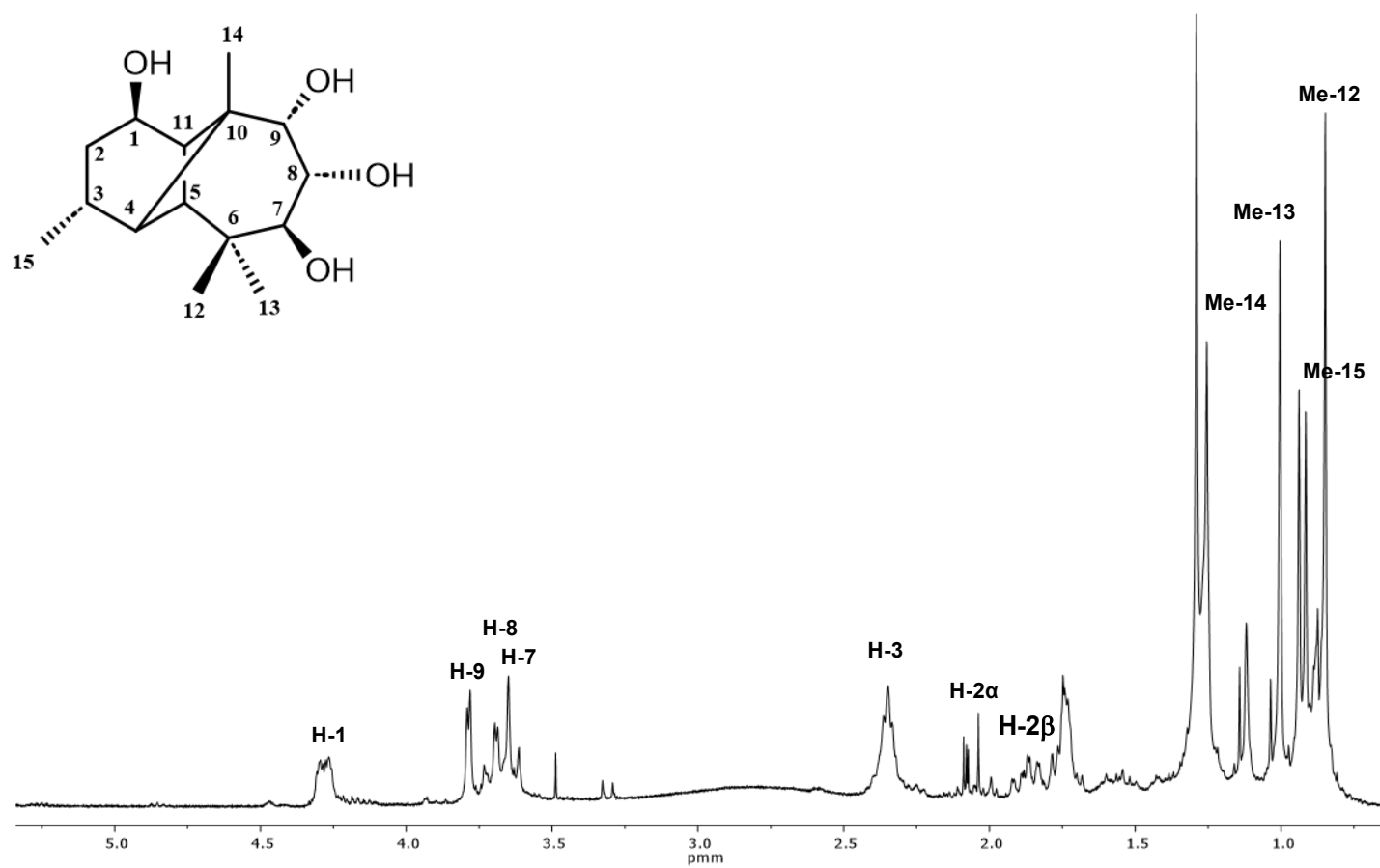


Figura 2A. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del longipinan-1,7,8,9-tetraol (**18**).

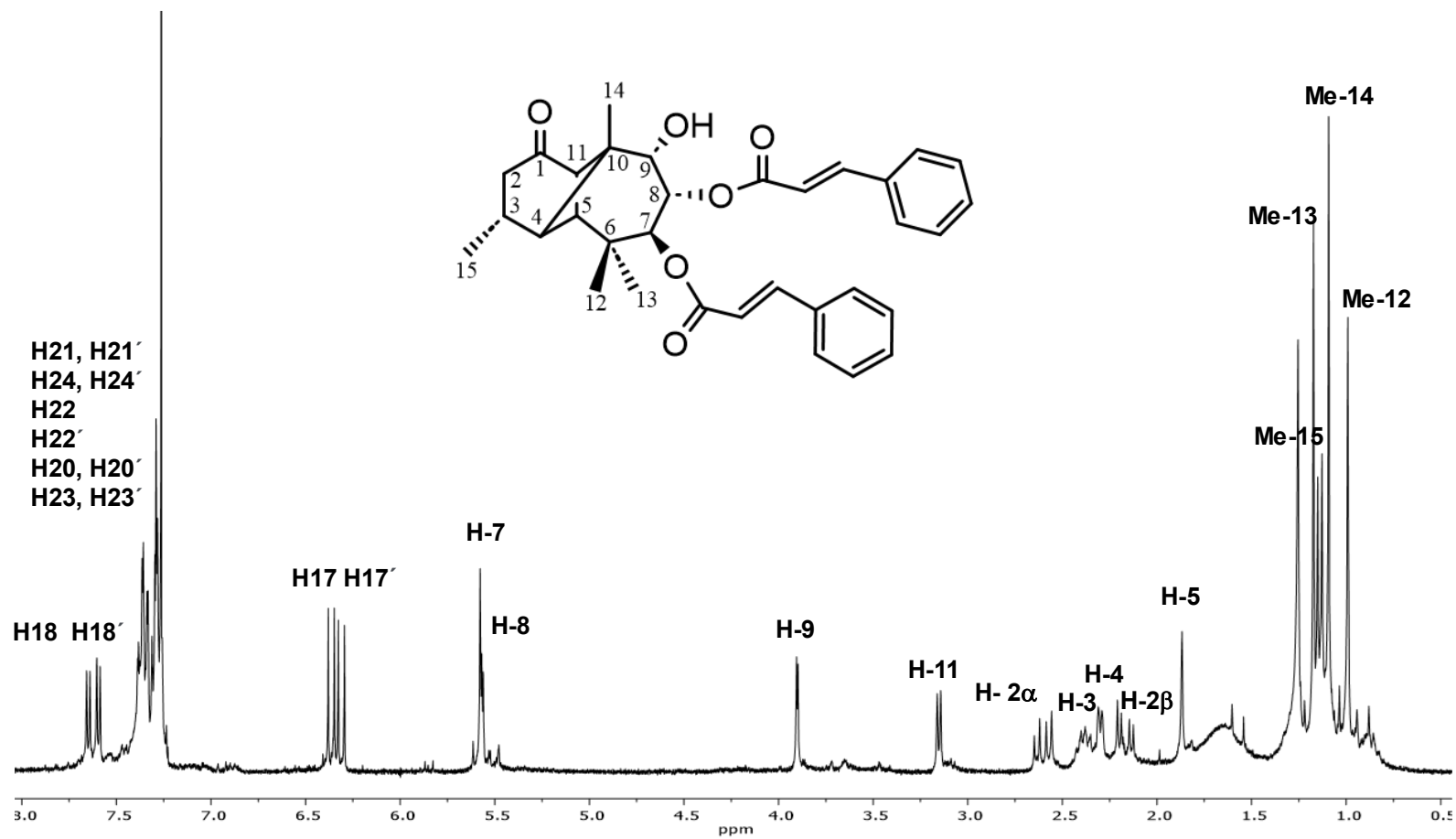


Figura 3A. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del 7,8-dicinato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (9).

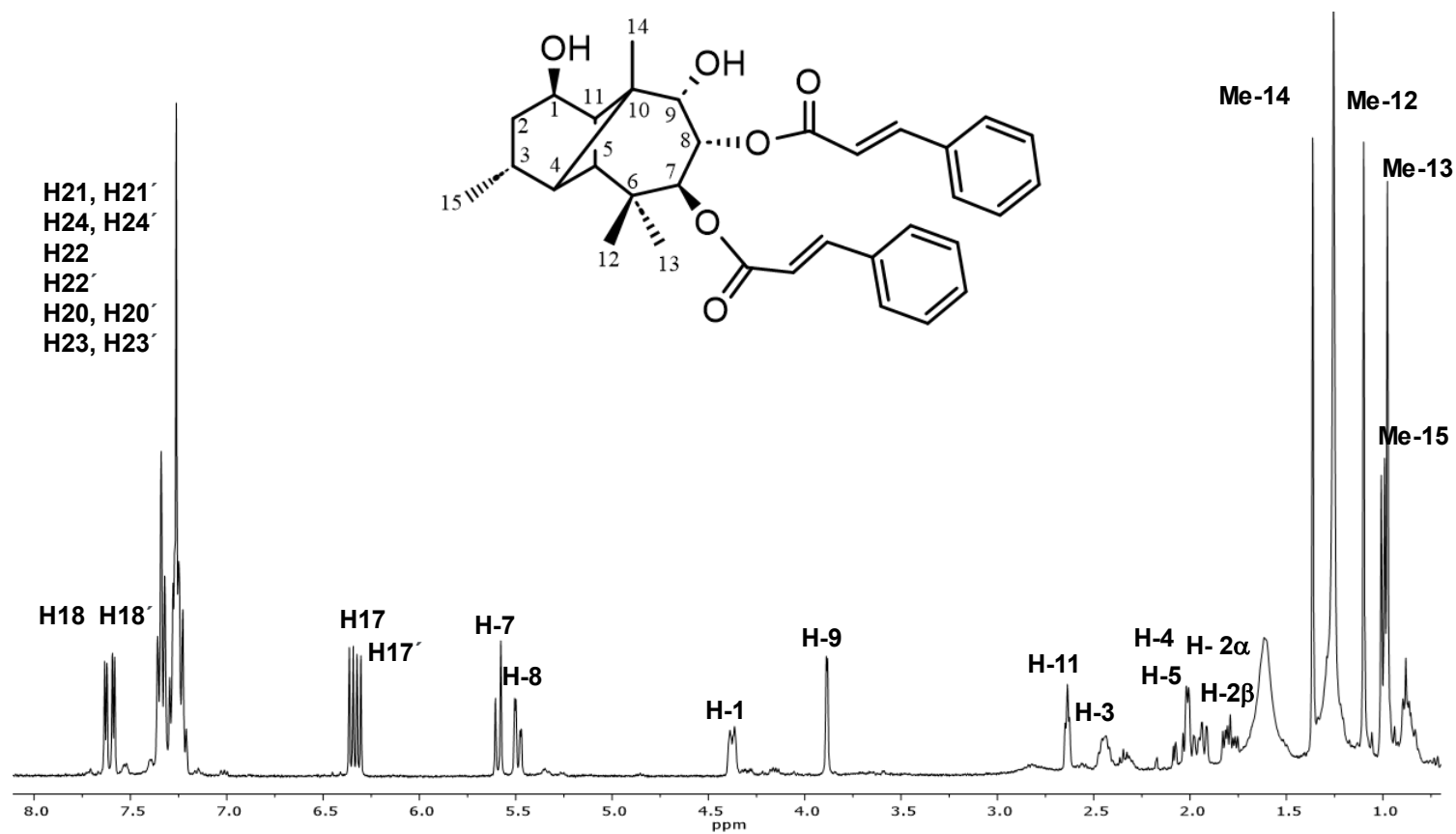


Figura 4A. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del 7,8-dicinato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (11).

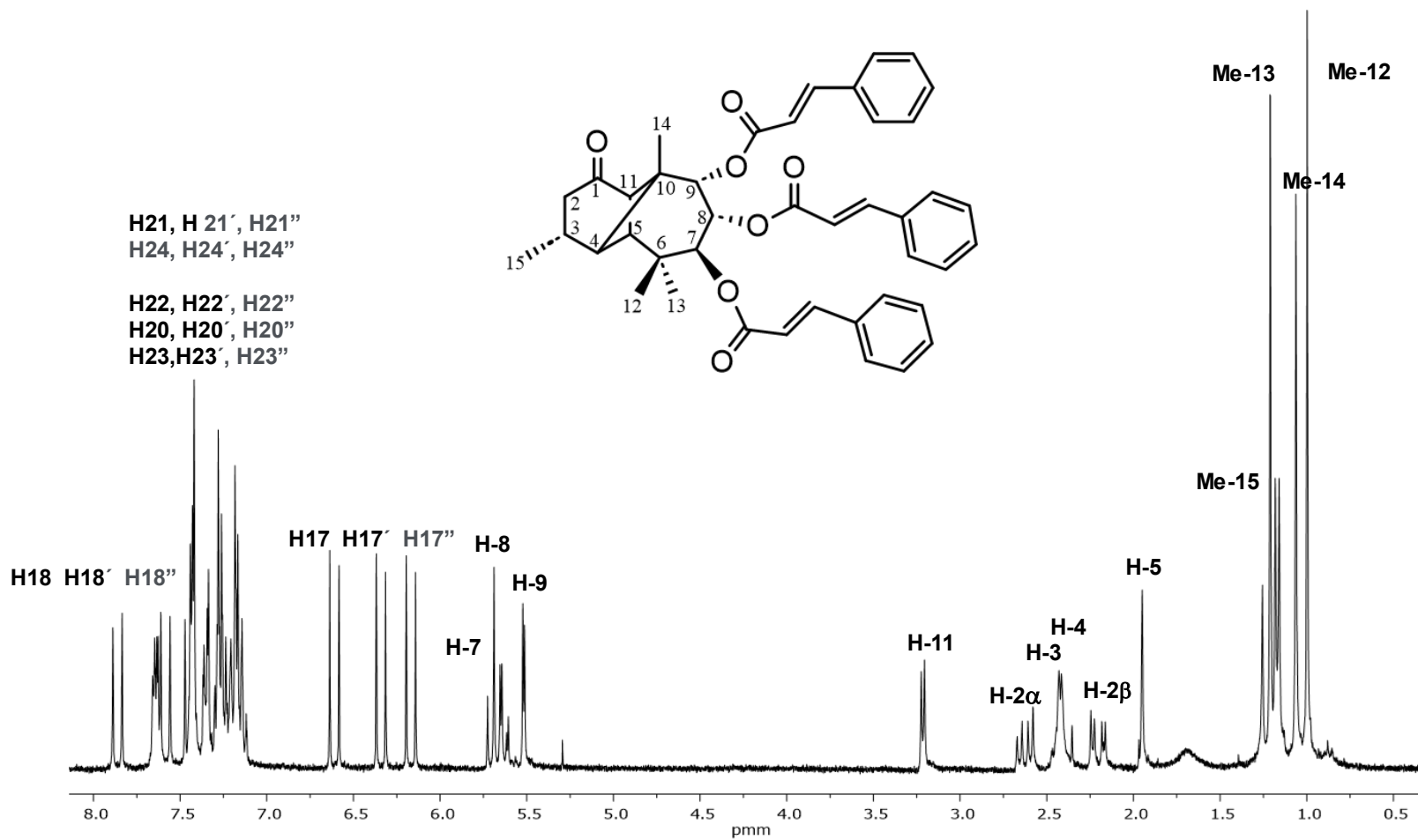


Figura 5A. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del 7,8, 9-tricinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**10**).

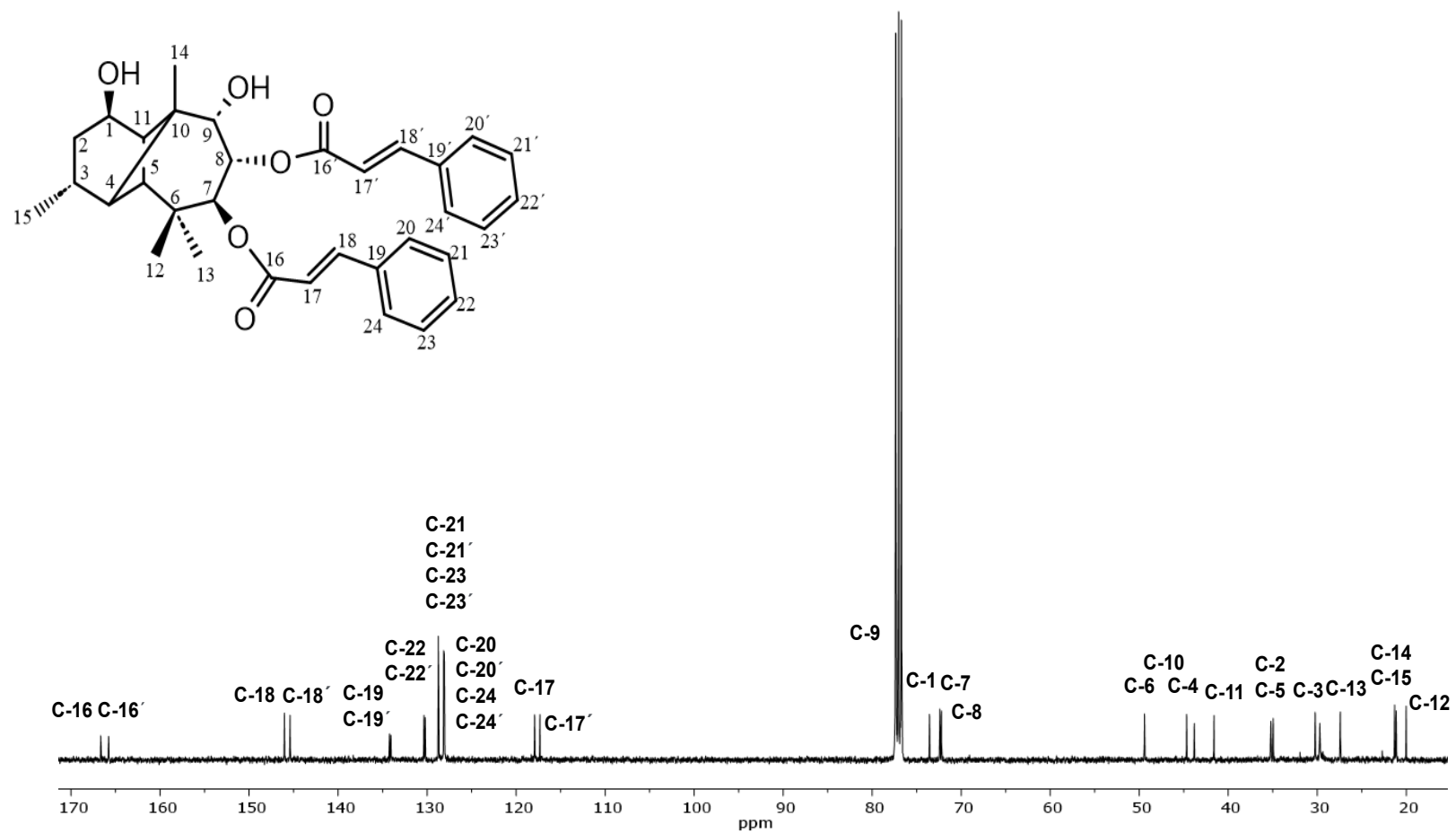


Figura 6A. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 7,8-dicinnamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**11**).

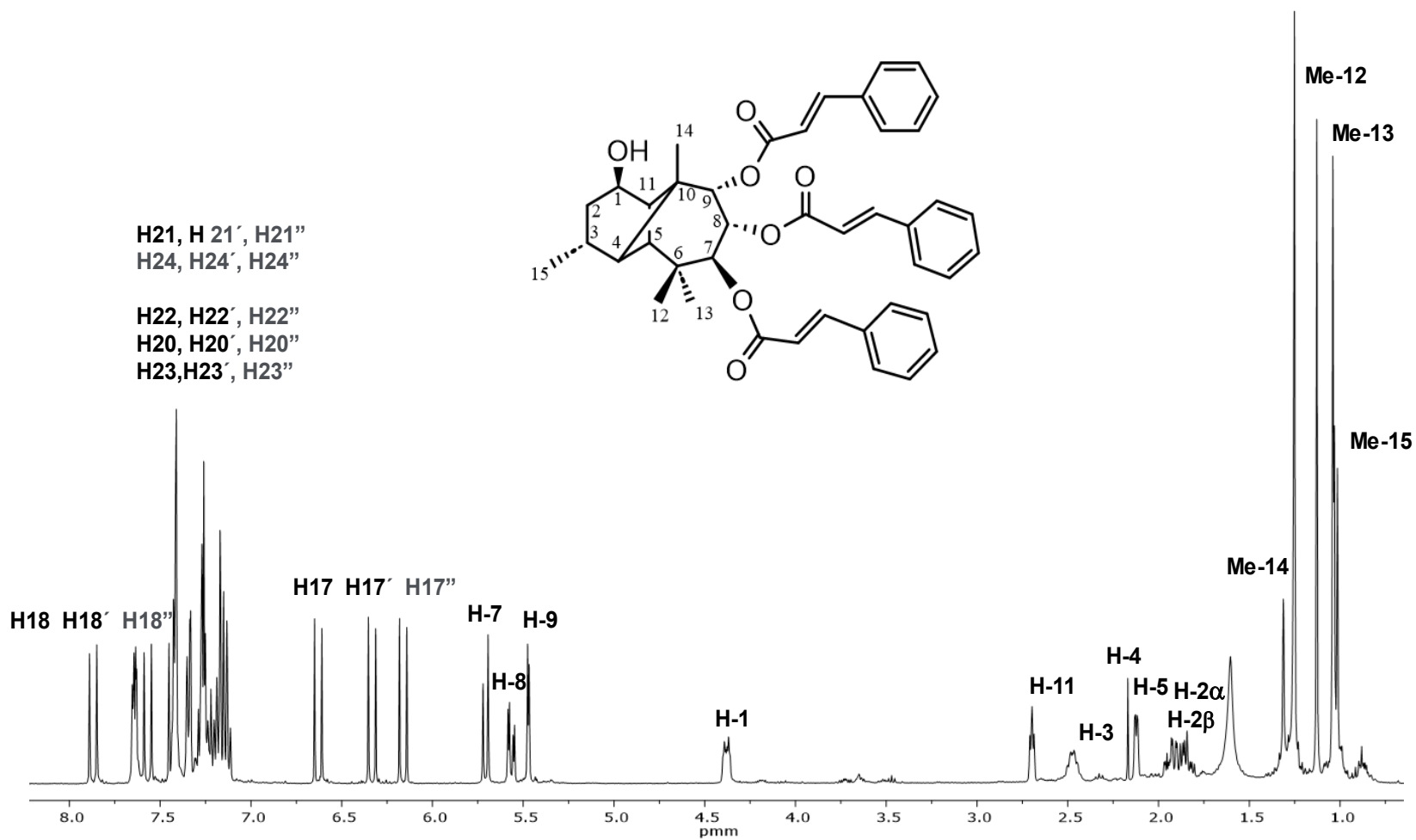


Figura 7A. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del 7,8,9-tricinamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**12**).

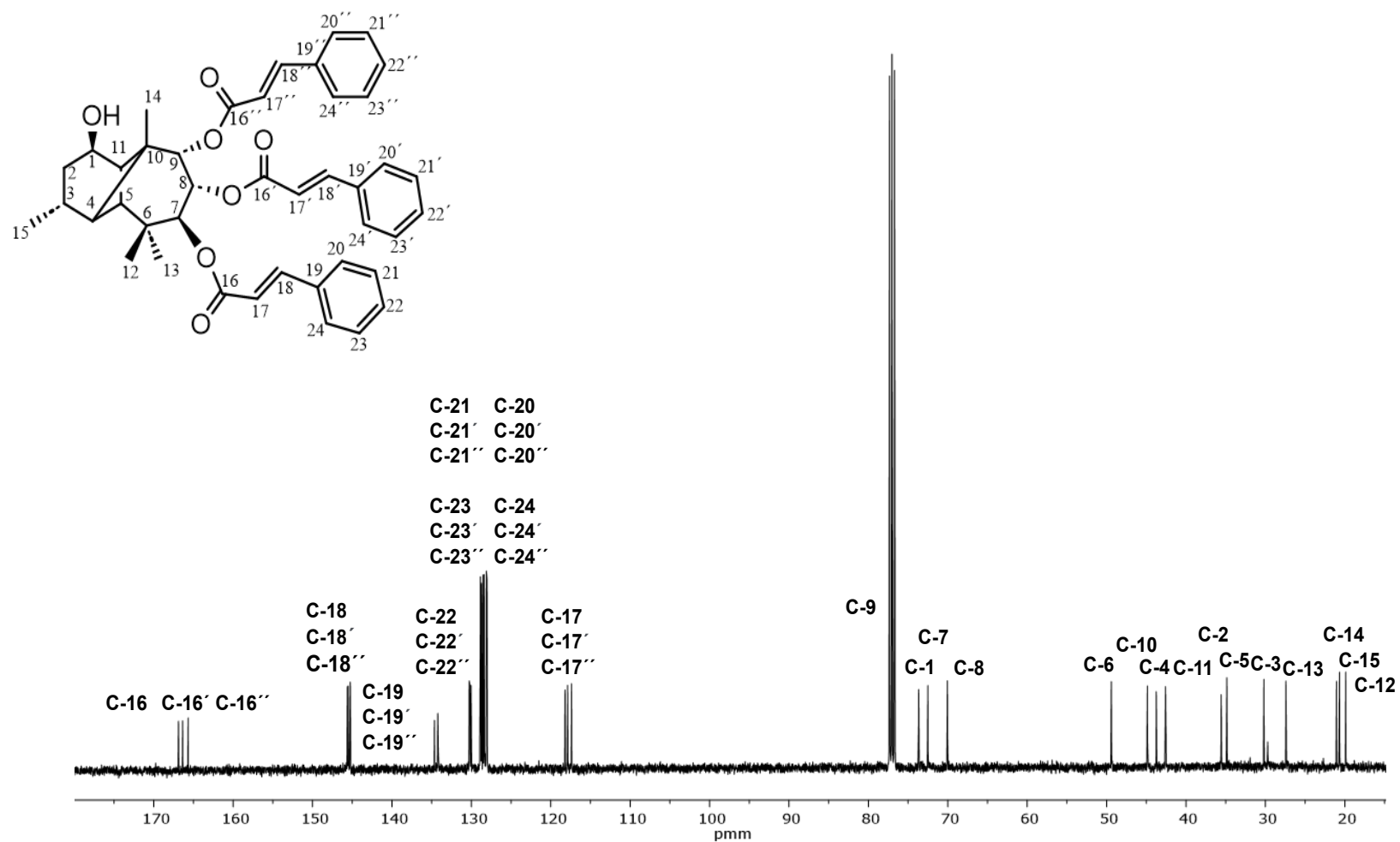


Figura 8A. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 7,8,9-tricinnamato de longipinan-1,7,8,9-tetraol (**12**).

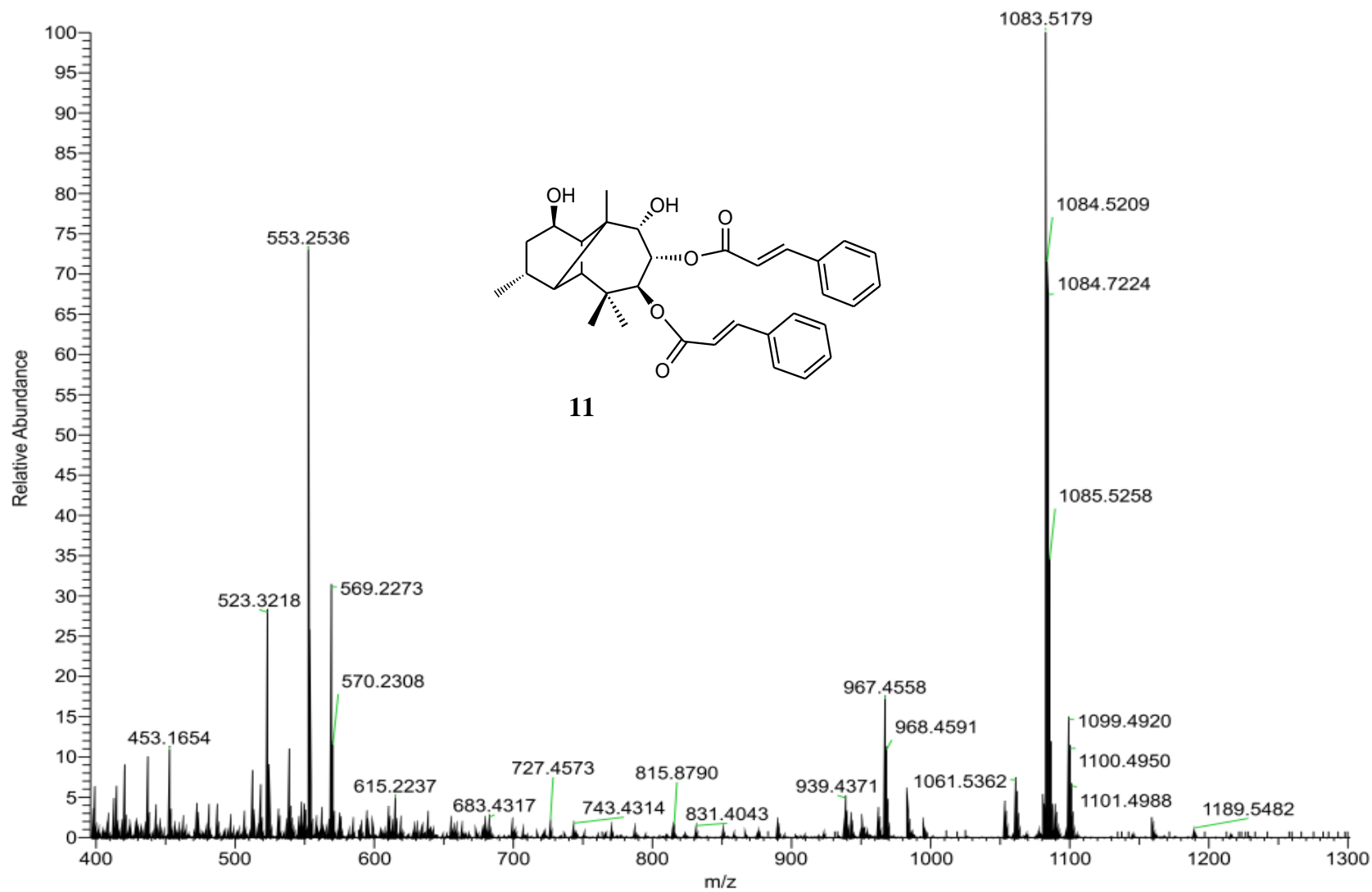


Figura 9A. Espectro de masas de alta resolución obtenido por ionización por electroespray del compuesto **11**.

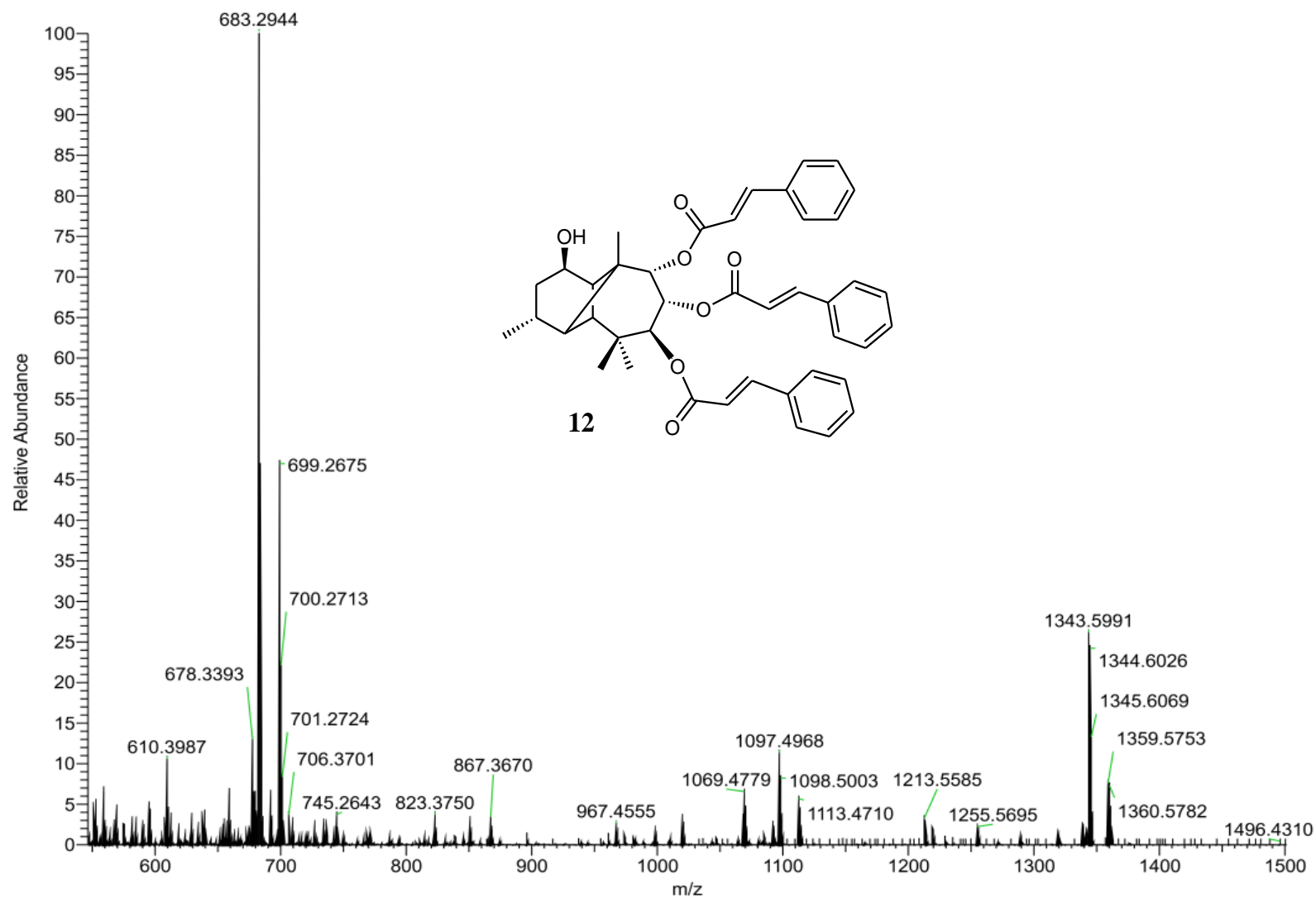


Figura 10A. Espectro de masas de alta resolución obtenido por ionización por electroespray del compuesto **12**.