



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis y evaluación *in silico* de nuevos
carbamatos bencimidazólicos como
inhibidores de la polimerización de la
 β -tubulina**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

LUCIA CANO GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: María Alicia Hernández Campos

VOCAL: Francisco Hernández Luis

SECRETARIO: María de los Ángeles Olvera León

1er. SUPLENTE: Nayeli López Balbiaux

2° SUPLENTE: Norma Castillo Rangel

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 122, Conjunto E, Departamento De Farmacia, Facultad De Química,
Universidad Nacional Autónoma De México

ASESOR DEL TEMA:

María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO:

Miguel Ángel Flores Ramos

SUSTENTANTE:

Lucia Cano González

ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS DE COMPUESTOS.....	iv
ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Cáncer y su tratamiento.....	2
2.2. Microtúbulos.....	3
2.2.1. Dinámica de los microtúbulos.....	5
2.2.2. Agentes antimitóticos.....	7
2.2.2.1. Derivados de carbamatos bencimidazólicos.....	9
2.2.3. Isoformas de β -tubulina.....	11
2.3. Diseño de Fármacos Asistido por Computadora.....	12
2.3.1. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos particulares.....	16
6. METODOLOGÍA.....	18
6.1. Derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo.....	18
6.2. Parte química.....	19
6.2.1. Análisis retrosintético.....	19
6.2.2. Síntesis de los derivados de carbamato de bencimidazol LCG1-LCG6	20
6.3. Parte computacional.....	21
6.3.1. Alineamiento de secuencias y comparación estructural.....	21
6.3.2. Modelado por homología.....	21
6.3.3. Acoplamiento molecular.....	21
6.3.4. Identificación de otros posibles blancos anticancerígenos.....	22
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24

7.1. Derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo.....	24
7.2. Parte química.....	27
7.2.1. Síntesis de las nitroacetanilidas 2a-2f. Reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática.....	28
7.2.2. Síntesis de las nitroanilinas 3a-3f. Reacción de hidrólisis.....	29
7.2.3. Síntesis de las <i>o</i> -fenilendiaminas 4a-4f. Reducción catalítica.....	32
7.2.4. Síntesis de los productos finales (LCG1-LCG6).....	33
7.3. Parte computacional.....	42
7.3.1. Alineamiento de secuencias y comparación estructural.....	42
7.3.2. Modelado por homología.....	48
7.3.3. Acoplamiento molecular.....	51
7.3.4. Identificación de otros posibles blancos anticancerígenos.....	56
8. CONCLUSIONES.....	59
9. PERSPECTIVAS.....	61
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO I. DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL-2-CARBAMATO DE METILO.....	70
ANEXO II. PARTE QUÍMICA.....	72
II.1. Metodología experimental.....	72
II.1.1. Instrumentación.....	72
II.1.2. Reactivos, disolventes y procedimientos generales.....	73
II.1.2.1. Procedimiento general para la Sustitución Nucleofílica Aromática (SNAr).....	73
II.1.2.2. Procedimiento general para la hidrólisis básica.....	74
II.1.2.3. Procedimiento general para la reducción catalítica.....	74
II.1.2.4. Procedimiento general para la ciclocondensación.....	74
II.1.2.5. 5-(Naftilen-1-iloxi)-2-nitroacetanilina (2a).....	75
II.1.2.6. 5-(Naftilen-1-iloxi)-2-nitroanilina (3a).....	75
II.1.2.7. 4-(Naftilen-1-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4a).....	76
II.1.2.8. <i>N</i> -[5-(naftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG1).....	76

II.1.2.9. 5-(Quinolin-8-iloxi)-2-nitroacetanilina (2b).....	77
II.1.2.10. 5-(Quinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (3b).....	77
II.1.2.11. 4-(Quinolin-8-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4b).....	78
II.1.2.12. <i>N</i> -[5-(quinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG2).....	78
II.1.2.13. 5-(2-Metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroacetanilina (2c).....	79
II.1.2.14. 5-(2-Metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (3c).....	79
II.1.2.15. 4-(2-Metilquinolin-8-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4c).....	80
II.1.2.16. <i>N</i> -[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG3).....	80
II.1.2.17. 5-(5-Cloroquinolin-8-iloxi)-2-nitroacetanilina (2d).....	81
II.1.2.18. 5-(5-Cloroquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (3d).....	81
II.1.2.19. 4-(5-Cloroquinolin-8-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4d).....	82
II.1.2.20. <i>N</i> -[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG4).....	82
II.1.2.17. 5-(4-Cloronaftilen-1-iloxi)-2-nitroacetanilina (2e).....	83
II.1.2.18. 5-(4-Cloronaftilen-1-iloxi)-2-nitroanilina (3e).....	83
II.1.2.19. 4-(4-Cloronaftilen-1-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4e).....	84
II.1.2.20. <i>N</i> -[5-(4-cloronaftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5.).....	84
II.1.2.21. 5-(7-Metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroacetanilina (2f).....	85
II.1.2.22. 5-(7-Metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroanilina (3f).....	85
II.1.2.23. 4-(7-Metoxiquinolin-4-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4f).....	86
II.1.2.24. <i>N</i> -[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG6).....	86
II.2. Espectros.....	87
ANEXO II. PARTE COMPUTACIONAL.....	159
III.1. Alineamiento de secuencias.....	159
III.2. Modelado por homología.....	162
III.3. Acoplamiento molecular.....	166

ABREVIATURAS DE COMPUESTOS

ABZ	Albendazol
ABZSO(+)	Sulfóxido de albendazol (+)
ABZSO(-)	Sulfóxido de albendazol (-)
FBZ	Fenbendazol
FBZSO(+)	Sulfóxido de fenbendazol (+)
FBZSO(-)	Sulfóxido de fenbendazol (-)
MBZ	Mebendazol
NZ	Nocodazol
PBZ	Parbendazol
OBZ	Oxibendazol
LBZ	Luxabendazol
WW5a	<i>N</i> -[5-fenoxi-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
LCG1	<i>N</i> -[5-(naftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
LCG2	<i>N</i> -[5-(quinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
LCG3	<i>N</i> -[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
LCG4	<i>N</i> -[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
LCG5	<i>N</i> -[5-(4-cloronaftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
LCG6	<i>N</i> -[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
PBS90	<i>N</i> -[5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	3 letras	1 Letra
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el año 2012 se reportaron 14 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. Debido a lo anterior y al incremento de la población afectada es necesario el desarrollo de nuevas terapias para su tratamiento.

A pesar de los múltiples esfuerzos que se hacen para el desarrollo de terapias anticancerígenas efectivas, todavía hay mucho por hacer; por ejemplo diseñar nuevas moléculas enfocándose a disminuir los efectos adversos y alcanzar una mayor selectividad por células cancerígenas. Para lograrlo, las moléculas tienen que ser más afines a dianas biológicas involucradas estrechamente en procesos celulares desregularizados en las células anormales. Un ejemplo de ellos es la división celular, en este caso uno de los blancos más estudiados es el monómero β de la tubulina que conforma a los microtúbulos.

La subunidad de β -tubulina cuenta con diferentes isoformas, de ellas se encontró que las isoformas HsBT1 y HsBT3 están sobreexpresadas en cáncer de pulmón, ovario y mama, mientras que la isoforma HsBT6 solo en células hematopoyéticas. Adicionalmente se han reportado diversos tipos de compuestos que se unen a este monómero; entre ellos, los derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo, mismos que han demostrado experimentalmente actividad antitumoral.

En este trabajo se sintetizaron seis nuevos derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo previamente diseñados como inhibidores de la polimerización de los microtúbulos, pero con aplicación como antiparasitarios. Empleando esta información, en este proyecto se decidió evaluar el potencial de estos nuevos derivados como posibles anticancerígenos, por lo que se realizó un estudio de acoplamiento molecular de los nuevos derivados sobre las isoformas HsBT1 y HsBT3 de β -tubulina, también se realizó el mismo estudio sobre la HsBT6. Adicionalmente, se evaluaron sus propiedades ADMET por métodos computacionales. Por el momento, la evaluación biológica de los compuestos se encuentra en proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer y su tratamiento

La palabra cáncer se utiliza para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Estas se caracterizan por un crecimiento rápido de células anormales, situación que es transmitida a células hijas, y se manifiesta por un aumento en la proliferación celular y la función celular que se extienden más allá de sus límites habituales.¹

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, entre los principales a nivel mundial se encuentran: pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y cáncer de esófago.¹ En México, en el año 2013, la tercera causa de mortalidad en hombres fueron los tumores malignos de próstata, tráquea, bronquios y pulmón; mientras que en mujeres, también tercera causa de mortalidad, fue cáncer de mama, útero, hígado y de las vías biliares intrahepáticas.² Además de los mencionados, el cáncer de ovario es una de las principales causas de muerte en mujeres.³

El consumo de tabaco y alcohol, una dieta no balanceada y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo. Algunas infecciones crónicas también constituyen factores de riesgo, teniendo una mayor incidencia en los países de ingresos medios y bajos.¹

Por otro lado, existen dos tipos de terapias para el tratamiento del cáncer: la quimioterapia no selectiva, que actúa en contra de todas las células que se dividen, y terapias dirigidas, bloquean rutas bioquímicas esenciales o proteínas mutantes implicadas en el crecimiento y supervivencia de células cancerígenas.⁴ En la actualidad se cuenta con un gran número de fármacos dirigidos a blancos macromoleculares específicos, algunos de los cuales se muestran en la Tabla 2.1.⁵

Tabla 2.1. Fármacos empleados para el tratamiento del cáncer

Fármaco	Mecanismo de acción	Padecimiento
Dasantinib (Sprycel®)	Inhibe la regulación de los receptores de tirosina cinasa	Leucemia linfoblástica
Gefitinib (Iressa®)	Inhibe la actividad de tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico	Cáncer de pulmón
Fulvestrant (Faslodex®)	Inhibe al receptor de estrógeno y promueve su degradación	Cáncer de mama
Vorinostat (Zolinza®)	Inhibe la actividad de la enzima histona desacetilasa	Linfoma cutáneo de células T
Bortezomib (Velcade®)	Inhibe la acción proliferativa del proteosoma	Mieloide múltiple
Azacitidina (Vidaza®)	Inhibe la metilación del DNA al unirse a la DNA metiltransferasa tipo 1	Síndrome mielodisplásico
Paclitaxel (Taxol®)	Estabiliza el microtúbulo polimerizado inhibiendo la segregación cromosómica durante la división celular	Sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, ovario y pulmón
Vinblastina (Velban®)	Inhibe la polimerización de los microtúbulos	Linfoma de Hodgkin, cáncer de mama, pulmón y testicular
Colchicina (Sixol®)	Inhibe la polimerización de los microtúbulos	Antitumoral*

*Se emplea para prevenir la crisis de gota y como tratamiento para la cirrosis biliar, el efecto antitumoral se identificó en estudios recientes.

En esta tabla se reportan algunos de los fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) que se encuentran en el mercado, los cuales presentan diferentes mecanismos de acción para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. El grupo de los antimetabólicos, al cual pertenece el paclitaxel, la vinblastina y la colchicina, es uno de los más importantes en la actualidad debido a su amplio espectro de actividad en células cancerosas.

2.2. Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras proteicas del citoesqueleto en forma de largos y huecos cilindros que se integran a partir de la asociación lateral de protofilamentos, tienen aproximadamente 25 nm de diámetro externo y longitud variada (ver Figura 2.1). Los protofilamentos, a su vez, se conforman de la polimerización de heterodímeros de α - y β -tubulina (proteínas globulares con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa); cada

uno de ellos tiene expuesta una subunidad α en una terminal y una subunidad β en la otra, esos extremos se designan como terminales (-) y (+), respectivamente. ⁶⁻⁸

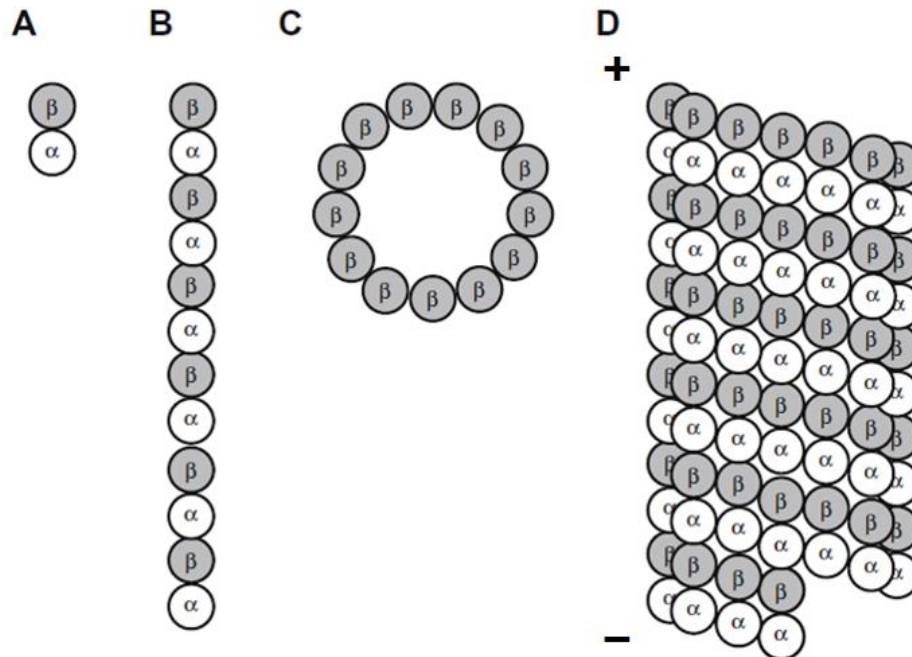


Figura 2.1. Estructura de los microtúbulos. (A) Los heterodímeros están compuestos de las subunidades α y β que se polimerizan para formar (B) protofilamentos. (C y D) Trece protofilamentos forman contacto lateral para crear la estructura de cilindro hueco los microtúbulos con β -tubulina expuesta en la terminal (+) y α -tubulina en la terminal (-).⁸

Cada heterodímero contiene dos sitios de unión a nucleótidos de guanina (GDP/GTP); el primero se localiza en la subunidad α , al cual se une una molécula de GTP de manera irreversible y no hidrolizable, por eso es llamado sustrato no-intercambiable (sitio-N). En la subunidad β se encuentra el segundo sitio, al cual se une libremente GTP que puede ser intercambiado por GDP (sitio-E). Además de los nucleótidos, al heterodímero se encuentra asociado a iones de Mg^{2+} que interactúan con los nucleótidos de guanina.^{6,9}

Los microtúbulos están involucrados en varios procesos celulares tales como mantenimiento de la forma de la célula, motilidad celular, transporte intracelular, división celular, crecimiento celular y mitosis, esto las convierte en estructuras de gran importancia para la supervivencia de la célula.⁷ Debido al papel crucial que juegan los microtúbulos en la división celular y

mitosis, estas estructuras se consideran blancos atractivos para el diseño de fármacos anticancerígenos.⁶

2.2.1. Dinámica de los microtúbulos

La dinámica de los microtúbulos es una función celular importante asociada a la habilidad de estas estructuras a polimerizarse y despolimerizarse.¹⁰ Se ha observado *in vivo* que los microtúbulos muestran dos mecanismos distintos de comportamiento dinámico, inestabilidad dinámica y recambio rotatorio. El primer mecanismo envuelve la adición y pérdida de subunidades de tubulina en la misma terminal del microtúbulo; mientras que el intercambio rotatorio ocurre a través de la ganancia de tubulina en la terminal (+) del microtúbulo y la pérdida de tubulina en la terminal (-).¹¹

La inestabilidad dinámica es dirigida por la unión, hidrólisis e intercambio de la molécula de GTP en el monómero de β -tubulina.¹² La incorporación de unidades en el protofilamento ocurre cuando una molécula de GTP se une a cada uno de los monómeros α (sitio-N) y β (sitio-E). Después de ello, el GTP se hidroliza a GDP en la subunidad de β -tubulina, el cual queda unido a la misma. Como una consecuencia, la terminal (+) es menos estable y tiende a adoptar una conformación curva (forma-D) que favorece la despolimerización (ver Figura 2.2). La hidrólisis del GTP se ve favorecida por la incorporación de un nuevo heterodímero, pero ésta sólo ocurre en la penúltima subunidad adicionada. Por esta razón, se propuso que los microtúbulos tienen una capa β -tubulina-GTP que podría ayudar a estabilizarlos.¹⁰⁻¹²

En la despolimerización se pierde la capa β -tubulina-GTP, siguiendo con la apertura del sitio del GDP y los protofilamentos se abren hacia afuera liberándose los heterodímeros de α/β -tubulina en el citoplasma. El GDP se une a la β -tubulina libre y puede intercambiarse por GTP en el sitio E, iniciando otra vez el ciclo.^{6,10,11}

La dinámica de los microtúbulos puede cambiar dramáticamente, de un rápido crecimiento o acortamiento. Alternativamente pueden alcanzar un estado estable, donde el crecimiento del microtúbulo es balanceado por el acortamiento del mismo. La transición de un repentino cambio en el crecimiento de un microtúbulo a acortamiento se denomina “catástrofe”, mientras que la transición inversa se conoce como “rescate”.^{6,10,13}

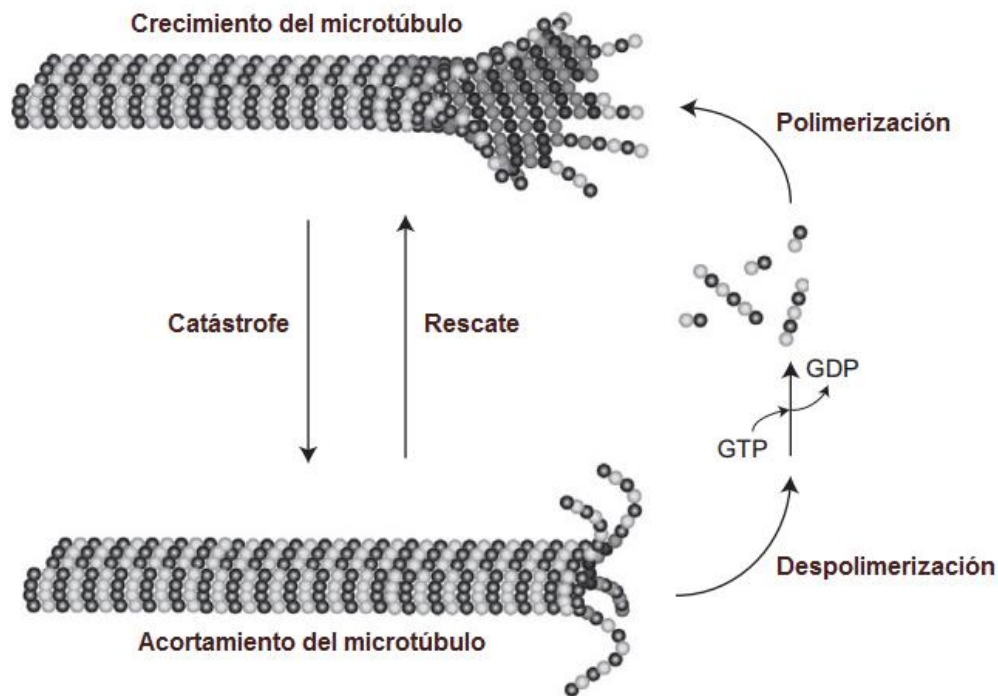


Figura 2.2. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. El GTP-unido a la tubulina se ensambla a la terminal (+) previniendo la despolimerización de los microtúbulos. Cuando el GTP se hidroliza, el microtúbulo se vuelve inestable y se despolimeriza por protofilamentos individuales curvados hacia afuera, los cuales lideran la desestabilización de la estructura de los microtúbulos. Finalmente, el GDP se sustituye por GTP en el desensamble de la subunidad de tubulina, iniciando otra vez el ciclo.¹¹

Los microtúbulos son esenciales para el funcionamiento de la célula, como ya se mencionó participan en varios procesos celulares, tales como formar parte de estructuras de sostén, transporte de vesículas, división celular y en la segregación de los cromosomas.¹⁰ Por ello, la dinámica de polimerización y despolimerización impacta en las funciones de la célula y afectar este proceso podría poner en riesgo su supervivencia. Esto no solo es aplicable para las células normales, en el caso de las células cancerígenas cobra mayor relevancia debido a que se encuentran en constante división celular; por ello, una estrategia prometedora para el desarrollo de nuevas terapias es interferir en la dinámica de los microtúbulos.

2.2.2. Agentes antimitóticos

Los agentes de unión a tubulina (TBAs, por sus siglas en inglés) son potentes antimitóticos que pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a su mecanismo: 1) agentes desestabilizadores de los microtúbulos y 2) agentes estabilizadores de los microtúbulos.^{6,7}

Los agentes pertenecientes al primer grupo reprimen la dinámica de los microtúbulos, inhiben la proliferación celular retrasando o bloqueando la transición de metafase-anafase en la mitosis. En cuanto a los estabilizadores de los microtúbulos, éstos son promotores de la polimerización, estabilizando los microtúbulos e interrumpiendo la despolimerización.⁶ Finalmente, ambos grupos detienen la mitosis y producen muerte celular, siendo las células cancerosas más susceptibles que las células normales.⁷

El mecanismo de acción de los TBAs depende del lugar al que se unan en el heterodímero de tubulina. Experimentalmente se han localizado los sitios de unión a la β -tubulina para seis clases de moléculas: vincas, análogos a la colchicina, rizoxina, taxanos, epotilonas y laulimalida; los primeras tres pertenecen al grupo de agentes desestabilizadores de los microtúbulos, mientras que los tres restantes se encuentran en el grupo de estabilizadores de los microtúbulos. En la Figura 2.3 se esquematizan los sitios de unión y a continuación se hace una breve descripción de cada uno de ellos:

- **El sitio de las vincas (V):** Los alcaloides de la vinca representan un grupo importante de compuestos antitumorales; la vinblastina es el compuesto representativo del grupo, un inhibidor de la formación de microtúbulos durante la división celular. El dominio vinca está formado por elementos estructurales los monómeros α - y β -tubulina de dos diferentes y consecutivos heterodímeros de tubulina, cerca al sitio de intercambio de GDP en la terminal (+).^{8,14}
- **El sitio de la colchicina (C):** La colchicina, otro agente despolimerizante de origen natural, se une a la interfase del heterodímero α/β -tubulina, adyacente al sitio de unión del GTP de la α -tubulina e interactúa principalmente con el monómero de β -tubulina, lo que le confiere la capacidad inhibitoria. La unión de la colchicina y otras moléculas, como combretastatina y esteganacina, causan una conformación curvada del

microtúbulo e interrumpen la polimerización, promoviendo la despolimerización de los mismos por inhibición del contacto lateral entre protofilamentos.^{8,14,15}

- **El sitio de la rizoxina (R):** La rizoxina es un macrólido biosintético, su sitio de unión está adyacente al del nucleótido intercambiable (E) en la β -tubulina, y está conformado por residuos hidrofóbicos y polares. La rizoxina posee dos mecanismos de acción: el primero a bajas concentraciones, donde al unirse al extremo de microtúbulo provoca un cambio conformacional que impide la agregación de más heterodímeros; el segundo a altas concentraciones, acoplándose a los heterodímeros con lo cual impide que se agreguen al microtúbulo. Por otro lado se ha observado experimentalmente que interfiere con la unión de la vinblastina. Esta región de acoplamiento la comparten por maytansina y derivados de la rizoxina.¹⁶
- **El sitio de los taxanos (T):** Los taxanos se unen a los microtúbulos polimerizados dentro del lumen del polímero. Estabilizan el GDP unido a la β -tubulina de los protofilamentos; el sitio se encuentra localizado próximo al asa-M, la cual es una estructura importante encontrada en ambos monómeros que permite la unión del dímero de tubulina con el alfa-hélice de la tubulina lateral, favoreciendo la estabilización de los microtúbulos.^{8,13,14}
- **El sitio de las epotilonas (Ep):** Las epotilonas son estabilizadores de los microtúbulos de origen myxobacteriano. El mecanismo de polimerización de microtúbulos inducido por epotilonas es similar al de los taxanos. Aunque las epotilonas compiten con el paclitaxol por la unión en los microtúbulos, éstos se acoplan a un sitio cercano al de los taxanos en la β -tubulina.^{8,17,18}
- **El sitio de la laulimalida (L):** La laulimalida y pelorusida A, compuestos de origen natural, tienen un modo de unión común en este sitio el cual está localizado en la β -tubulina en la superficie de la parte externa del microtúbulo y es contiguo al de los taxanos. La estabilidad de los microtúbulos se logra por dos efectos: 1) la estabilización del loop M de la β -tubulina y 2) la estructura núcleo de ambas moléculas interacciona con un segundo dímero de tubulina del protofilamento adyacente. Al mismo tiempo, estabilizan el sitio de los taxanos y de esta manera ambos compuestos ejercen un efecto alostérico para favorecer la unión de los taxanos dando como resultado un efecto sinergista entre ambas moléculas.¹⁹

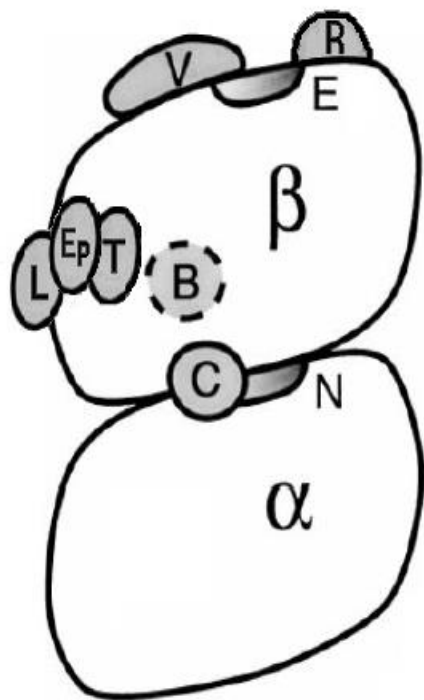


Figura 2.3. Representación de los sitios de unión de las moléculas al heterodímero de α/β -tubulina:

T: Taxol

V: Vinblastina

C: Colchicina

L: Laulimalida

R: Rizoxina F

Ep: Epotilona

[B]: Posible sitio de unión de bencimidazoles

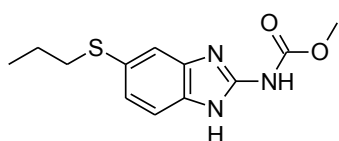
Sitios de unión de Nucleótido Intercambiable (E) y de Nucleótido No Intercambiable (N). Se modificó el esquema de la referencia

Además de los sitios antes mencionados se ha propuesto un posible sitio de unión para los derivados de bencimidazol (B), esto con base en estudios de modelado molecular, reportes de resistencia en parásitos y estudios de inhibición competitiva con la colchicina; este lugar se localiza cerca del sitio de la colchicina en el monómero de la β -tubulina (ver Figura 2.3).^{20,21}

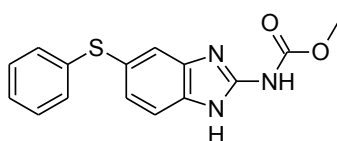
2.2.2.1 Derivados de carbamatos bencimidazólicos

Varios estudios experimentales muestran que el carbendazim (CBZ, 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo) y sus derivados deben su modo de acción a su unión selectiva al monómero de β -tubulina, inhibiendo la polimerización de los microtúbulos, así como también se tiene reporte de que compiten con la colchicina por el sitio de unión.^{21,22} Estos compuestos, carbamatos bencimidazólicos (BzC), son activos como antihelmínticos y fungicidas, comúnmente empleados como fármacos antiparasitarios.^{21,23} Recientemente se ha reportado que estos derivados tienen prometedores efectos antitumorales. Los principales derivados del CBZ (Figura 2.4) con actividad antitumoral reportada son el albendazol (ABZ), mebendazol (MBZ), nocardazol (NZ) y fenbendazol (FBZ).²³⁻²⁹

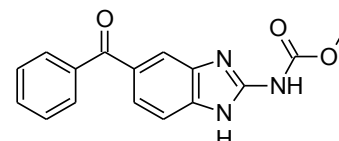
El NZ tiene actividad contra varios tumores y leucemias.^{25,30} Por otra parte, se ha reportado que el ABZ inhibe la proliferación en varios tipos de cáncer, incluyendo hepatocelular y cáncer colorectal, así como una variedad de otras líneas celulares malignas encontradas en humano.²⁷⁻²⁹ Asimismo, el MBZ ha demostrado potentes efectos antitumorales en ambas células de cáncer de pulmón *in vitro* y en evaluaciones *in vivo* utilizando como modelo de estudio ratones.^{24,25} Finalmente, el FBZ mostró actividad contra líneas celulares de cáncer de pulmón.²⁶



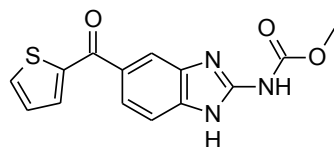
Albendazol



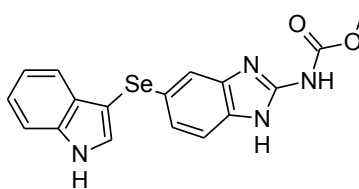
Febendazol



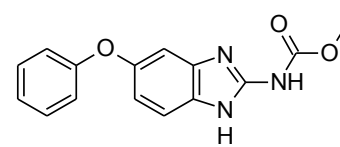
Mebendazol



Nocodazol



QG10a



WW5a

Figura 2.4. Estructuras químicas de compuestos derivados de bencimidazol.

Adicionalmente, en estudios recientes se han reportado nuevos compuestos derivados de carbamatos bencimidazólicos como los compuestos QG10a²⁵ y WW5a²³ (ver Figura 2.4), los cuales inhiben la proliferación de diferentes líneas celulares al unirse a la β -tubulina de los microtúbulos.

El mecanismo de inhibición de la polimerización de los microtúbulos, de estos carbamatos bencimidazólicos, podría ser similar en parásitos y en humanos, ya que estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular revelan un acoplamiento similar en el monómero de β -tubulina de esas especies, además de los datos experimentales antes mencionados.^{21,25}

2.2.4. Isoformas de β -tubulina

Los monómeros de β -tubulina son codificados por una familia de multigenes con un complejo patrón de expresión y, al ser éstos los blancos de los fármacos de unión a microtúbulos, es de vital importancia conocer su distribución en el organismo. En un estudio realizado por Leandro-García y colaboradores se reportó la distribución las isoformas en tejidos normales (Tabla 2.2) y en muestras de tejidos tumorales de varios tipos de cáncer (Tabla 2.3).³¹ Estos datos permiten conocer las diferencias en la expresión de las isoformas de esta proteína y pueden apoyar en la selección de un blanco adecuado para dirigir el tratamiento de un tipo de cáncer en específico.

Tabla 2.2. Isoformas de β tubulina y su distribución en tejidos normales de un adulto³¹

Nombre	Isoforma de BT	Gen	Expresión normal
HsBT1	β I	<i>TUBB</i>	Todo, excepto cerebro y testículos
HsBT2a	β IIa	<i>TUBB2A</i>	Cerebro, riñón, músculo, mama, páncreas, hígado, intestino delgado, colon, amígdala y próstata
HsBT2b	β IIb	<i>TUBB2B</i>	Cerebro e intestino delgado
HsBT3	β III	<i>TUBB3</i>	Cerebro
HsBT4a	β IVa	<i>TUBB4/TUBBB4A</i>	Cerebro, bazo y testículos
HsBT4b	β IVb	<i>TUBB2C/TUBB4B</i>	Todo
HsBT5	β V	<i>TUBB6</i>	Pulmón, mama, intestino delgado y próstata
HsBT6	β VI	<i>TUBB1</i>	Médula ósea y células sanguíneas
HsBT7	β VII	<i>TUBB7P</i>	Pseudogen
HsBT8	β VIII	<i>TUBB8</i>	Desconocido

Tabla 2.3. Cambios en la distribución de isoformas de β tubulina en varios tipos de cáncer³¹

Tipo de cáncer	HsBT1	HsBT2a	HsBT3	HsBT4b	HsBT5
Colon	↑	↓	↓	↓	↓
Ovario	≈	↑	↑	↓	↓
Riñón	↑	↓	≈	↓	↑
Próstata	↓	↑	≈	↑	↓
Mama	↑	↓	↑	≈	↓
Pulmón	↑	↑	↑	↓	↓

Nota: ↑ o ↓ indican un incremento o decremento, respectivamente, en la expresión de mRNA de la isoforma de tubulina en muestras de tejidos tumorales con respecto a tejidos sanos y ≈ indica que no hay cambio en la expresión.

Como se observa en las tablas anteriores, la variación en la expresión de las isoformas de β -tubulina puede emplearse en el diseño de moléculas selectivas en la búsqueda de un tratamiento más específico y menos tóxico para el paciente. Por ejemplo, la expresión de la isoforma HsBT3 se encuentra incrementada en cáncer de ovario, mama y pulmón, mientras que en tejidos normales solo se localiza en el cerebro;³¹ además, se ha asociado a tipos de cáncer más agresivos y con resistencia a fármacos como taxanos y alcaloides de la vinca.^{7,32-37} Esto la hace una diana importante en el diseño de moléculas que se unan específicamente a esta isoforma para el tratamiento a dichos padecimientos. Asimismo, la isoforma HsBT1 es un blanco atractivo debido a su sobreexpresión en cáncer de colon, riñón, mama y pulmón; a pesar de su alta expresión normal en diversos tejidos.¹⁸

Considerando lo antes descrito, resulta interesante el diseño y síntesis de nuevos carbamatos bencimidazólicos que se acoplen con mayor afinidad a las isoformas HsBT1 y HsBT3 de β -tubulina para inhibir la polimerización de microtúbulos. Por otro lado, podría reducirse la hematotoxicidad de un tratamiento evitando que uno de los blancos sea la HsBT6, isoforma que se expresa solamente en células hematopoyéticas.³¹

2.3. Diseño de Fármacos Asistido por Computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) consiste en emplear diversas técnicas, métodos y algoritmos computacionales para relacionar la actividad biológica de un compuesto con su estructura química,³⁸ con los siguientes propósitos principales: descubrir moléculas activas, optimizar moléculas activas ya conocidas y seleccionar, de un grupo dado de estructuras, a los candidatos que tengan mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos. El uso de esta metodología puede ayudar a descubrir y diseñar estructuras químicas que tengan las propiedades adecuadas para entrar en el proceso de desarrollo de un fármaco.^{39,40}

Los métodos computacionales se basan en la idea de que las moléculas bioactivas (ligandos) actúan por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con una macromolécula blanco (receptor) involucrada en un proceso de la enfermedad.⁴¹ Las estrategias del DiFAC se dividen en dos partes:^{42,43}

1) Diseño basado en el ligando. Los métodos que se agrupan en esta área se centran en el estudio de la estructura química de la molécula con actividad biológica, pues no se conoce la estructura del receptor pero se conoce la estructura de una serie de moléculas con la misma actividad biológica, por ejemplo relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés).

2) Diseño basado en el receptor. Los métodos que corresponden a esta estrategia consideran la estructura tridimensional de la macromolécula o biomolécula con la que interactúa el ligando, en este caso sí se conoce la estructura del receptor; dos ejemplos de estos métodos son el acoplamiento molecular (*docking*) y la dinámica molecular.

2.3.1. Acoplamiento molecular (*docking*)

El proceso de *docking* envuelve la predicción de la conformación y orientación (o posicionamiento) de un ligando en el sitio de unión del blanco, es decir, busca encontrar el modo de unión más favorecido de un ligando con el receptor (ver Figura 2.5). En general, son dos los objetivos de los estudios de acoplamiento molecular: modelado estructural preciso y correcta predicción de la actividad biológica.^{44,45}



Figura 2.5. Ejemplificación de la metodología del *docking*. Para una enzima y su inhibidor, el *docking* tiene como objetivo proveer de una correcta predicción de la estructura del complejo enzima-inhibidor.⁴⁴

Se han descrito un gran número de programas para acoplamiento molecular en la literatura;⁴⁶ sin embargo, cada programa de *docking* cuenta con dos componentes complementarios: un método de búsqueda del espacio conformacional del ligando y/o la proteína blanco; y una función de evaluación de los modos de unión propuestos.^{46,47} El algoritmo de búsqueda se refiere a la exploración del espacio conformacional accesible para el ligando dentro del receptor, genera un óptimo número de configuraciones para encontrar la orientación y

conformación del ligando que corresponda al mínimo global de la energía libre de unión.^{47,48} En cuanto a la función de evaluación, ésta se refiere a la asignación de un valor numérico (por ejemplo, la energía libre de unión) a cada una de las configuraciones generadas durante la etapa de búsqueda. Esto permite establecer un orden entre las diferentes posiciones y configuraciones encontradas. Generalmente aquella posición con la mejor evaluación es la que representa el modo de unión más probable.^{46,48}

La predicción o cálculo del modo de unión entre un ligando y su proteína blanco es de fundamental importancia para el diseño de nuevas estructuras, basado en la estructura del receptor y el entendimiento del modo de acción de moléculas con actividad biológica.^{44,47} Otra aplicación del acoplamiento molecular es la búsqueda de moléculas entre una gran cantidad de moléculas organizadas en bibliotecas virtuales.⁴⁵ A pesar de que se deben hacer pruebas experimentales para comprobar las predicciones, los experimentos se realizan con un número reducido de compuestos. De esta manera, el acoplamiento molecular se emplea para hacer más eficiente y reducir los costos de la investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en México y el mundo, además se ha registrado un incremento en su incidencia.¹ A pesar de que existen diversos anticancerígenos disponibles en el mercado, estos no son seguros y en algunos casos son poco eficaces. Debido al aumento de la población afectada y la falta de una terapia adecuada es conveniente el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento del cáncer.

La búsqueda de terapias dirigidas es importante para reducir los efectos no deseados y atacar específicamente al tumor canceroso. Por ello, se han investigado diversos blancos que pertenecen a rutas bioquímicas esenciales o que son proteínas mutantes implicadas en el crecimiento y supervivencia de células cancerígenas. El monómero β -tubulina es una diana recientemente estudiada para el diseño de moléculas con actividad anticancerígena, este monómero forma parte de los microtúbulos, los cuales son esenciales en la división celular.⁴

Experimentalmente se han identificado los sitios de unión en la β -tubulina de diversos tipos de moléculas, algunos de ellos fármacos anticancerígenos como el taxol y la vinblastina. Sin embargo, esta proteína tiene varias isoformas que se expresan dependiendo el tejido o tipo de cáncer.³¹ En el mismo estudio se encontró que las isoformas HsBT1 y HsBT3 están sobreexpresadas en cáncer de pulmón, ovario y mama, mientras que la isoforma HsBT6 solo en células hematopoyéticas.³¹ Debido a ello es importante el diseño de moléculas que presenten mayor afinidad a las primeras dos isoformas de β -tubulina y no a la HsBT6 para evitar posible hematotoxicidad.

Finalmente, otro tipo de compuestos que se unen a la β -tubulina con actividad antitumoral demostrada son los derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo,^{23,25} con los cuales nuestro grupo de investigación ha trabajado desde hace más de una década. Es por todo ello que resulta interesante el desarrollo de nuevos compuestos que ataquen con mayor afinidad a células cancerosas y en este trabajo se estudian moléculas de este tipo y su afinidad por las dianas HsBT1 y HsBT3, asimismo por la isoforma HsBT6.

4. HIPÓTESIS

Derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo diseñados previamente como inhibidores de β -tubulina de parásitos y resultados experimentales de actividad anticancerígena de moléculas de este tipo los compuestos de la serie LCG1-LCG6 tendrán actividad antitumoral. Asimismo, mediante el uso de herramientas computacionales se podrán modelar las isoformas de β -tubulina HsBT1, HsBT3 y HsBT6, las cuales servirán para realizar estudios de acoplamiento molecular de los derivados bencimidazol-2-carbamato de metilo y determinar por cuál isoforma poseen mayor afinidad.

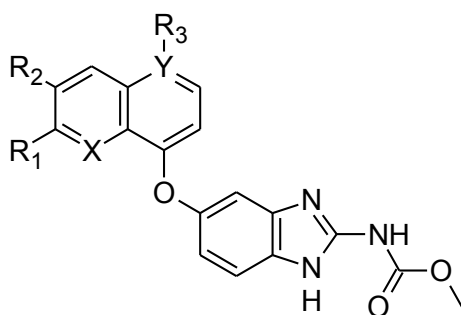
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar *in silico* el potencial anticancerígeno de seis nuevos derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo.

5.2. Objetivos particulares

- Sintetizar la serie de compuestos LCG1-LCG6.



LCG	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃
1	C	C	H	H	H
2	N	C	H	H	H
3	N	C	CH ₃	H	H
4	N	C	H	H	Cl
5	C	C	H	H	Cl
6	C	N	H	OCH ₃	-

- Determinar las constantes físicas (punto de fusión, Rf) y caracterizar la estructura de los compuestos finales mediante técnicas espectroscópicas (RMN, IR) y espectrométricas (EM).
- Realizar estudios de alineamiento de secuencias de β -tubulina.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Estudiar el posible modo de unión de compuestos derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo en las isoformas de β -tubulina mediante estudios de acoplamiento molecular.
- Identificar otros posibles blancos anticancerígenos para la serie de derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo.

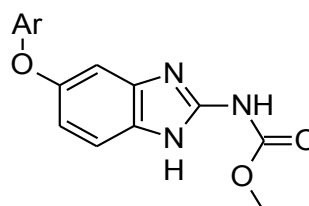
6. METODOLOGÍA

6.1. Derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo

Con base en la estructura de nuevos agentes inhibidores de la polimerización de tubulina^{23,25} y en carbamatos bencimidazólicos diseñados como inhibidores de la polimerización de los microtúbulos de parásitos^{20,49}; se eligieron para su síntesis una serie de seis derivados del bencimidazol de los compuestos propuestos^{20,49}, los cuales se muestran en la Tabla 6.1.

Las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) de los compuestos de la serie LCG se predijeron; en este estudio se incluyeron otros derivados carbamatos bencimidazólicos usados como referencia (ver Tabla I.1 del anexo I) empleando el servidor FAF-Drugs⁵⁰.

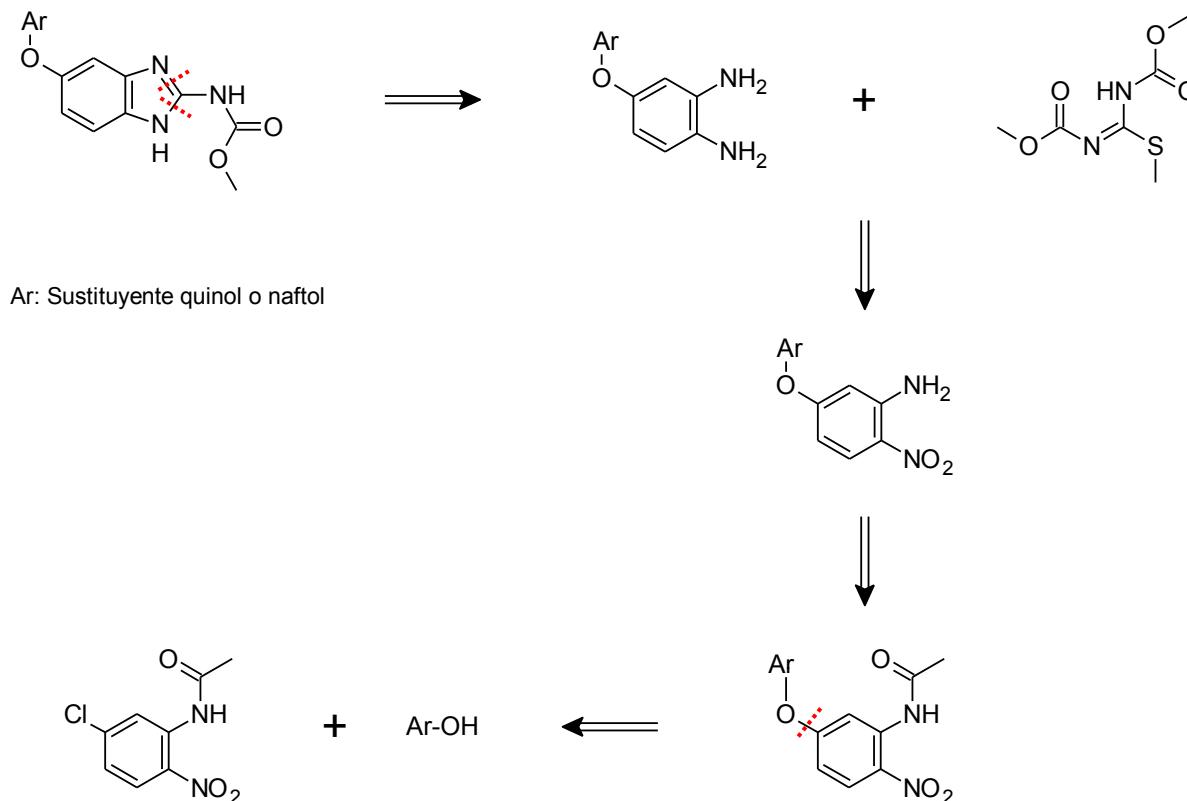
Tabla 6.1. Estructura química de la serie LCG



LCG	Ar	LCG	Ar
1		2	
3		4	
5		6	

6.2. Parte química

6.2.1. Análisis retrosintético

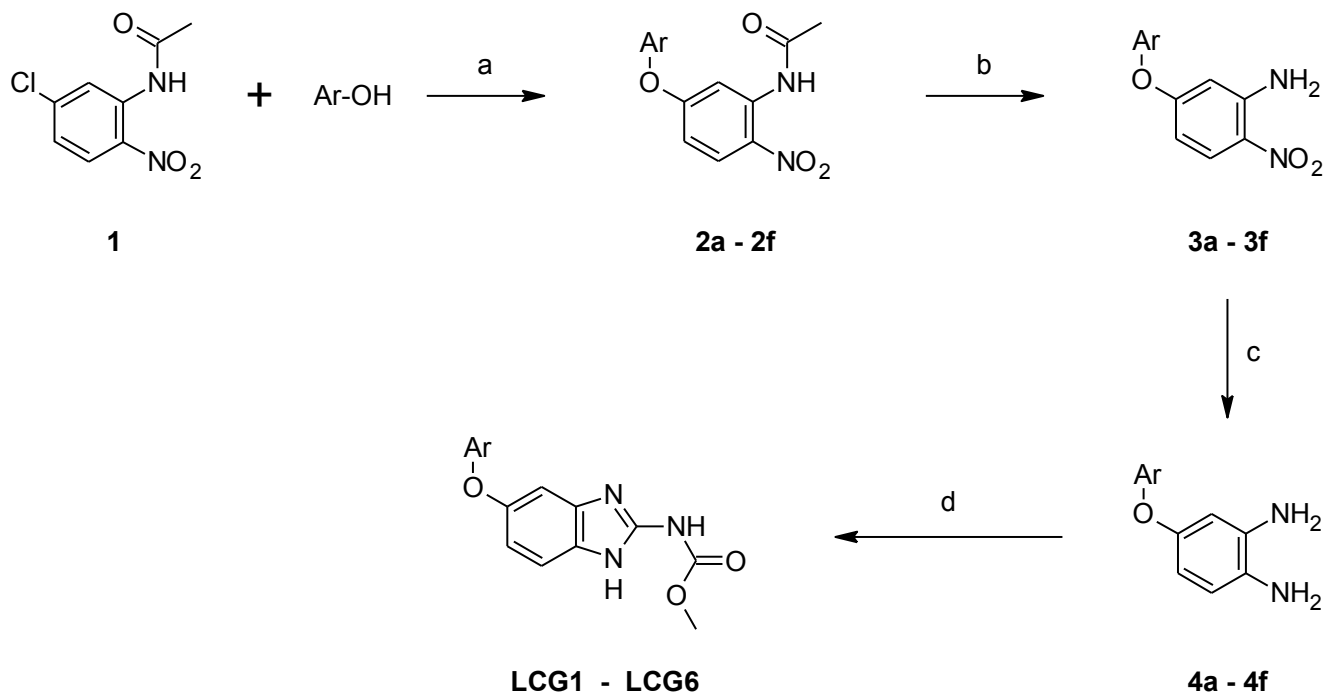


Esquema 6.1. Análisis retrosintético para los compuestos a sintetizar.

Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos LCG1-LCG6, se realizó el análisis retrosintético mostrado en la Esquema 6.1.

Se planteó obtener los bencimidazoles-2-carbamato de metilo (serie LCG) por una ciclocondensación, siendo los precursores: *o*-fenilendiamina debidamente sustituida y *N,N*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea. Para la síntesis de la *o*-fenilendiamina se propuso la introducción del grupo Ariloxi por una reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática (S_NAr) entre 5-cloro-2-nitroacetanilina y el correspondiente naftol o quinol sustituido adecuadamente, seguido de la hidrólisis de la acetamida y reducción catalítica del grupo nitro.

6.2.2. Síntesis de los derivados de carbamato de bencimidazol LCG1-LCG6



Esquema 6.2. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la serie LCG. (a) Na_2CO_3 , DMF, 190°C , 600 W; (b) NaOH / MeOH; (c) H_2 , Pd/C 10% o Ni-Raney 30%, MeOH, 40°C ; (d) *N,N*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea, MeOH/ H_2O /AcOH, 70°C .

En el Esquema 6.2 se muestra la ruta sintética propuesta para obtener los bencimidazoles-2-carbamato de metilo LCG1-LCG6. Inicialmente se partió de la 5-cloro-2-nitroacetanilina (1), misma que se sometió a $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ asistida por microondas con el correspondiente naftol o quinol (ArOH) en condiciones básicas, obteniéndose el éter deseado. Posteriormente, se realizó la hidrólisis básica con NaOH/MeOH de la nitroacetanilina sustituida (2a-2f). La reducción del grupo nitro de la nitroanilina sustituida (3a-3f), se llevó a cabo mediante una reducción catalítica utilizando hidrógeno y catalizador, Pd/C o Ni-Raney para los compuestos clorados (LCG4 y LCG5), en MeOH a 40°C . Por último, al finalizar la reducción, la *ortho*-fenilendiamina (4a-4f) se hizo reaccionar con *N,N*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea en solución de MeOH/ácido acético glacial para la obtención del derivado del bencimidazol correspondiente.

6.3. Parte computacional

6.3.1. Alineamiento de secuencias y comparación estructural

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a la β -tubulina de humano,⁵¹ otros mamíferos, protozoarios y nematodos (susceptibles y resistentes al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos)²¹ se obtuvieron de la base de datos de proteínas de UniProt⁵² (ver Tabla IV.1.1 del Anexo IV). Posteriormente, se alinearon las secuencias de aminoácidos utilizando el módulo *Align* del mismo servidor. Las secuencias se utilizaron en la creación de un cladograma para analizar las relaciones entre la familia de β -tubulina de las diferentes especies empleando la plataforma *Phylogeny.fr*.⁵³

6.3.2. Modelado por homología

Se construyeron los modelos por homología de β -tubulina de las isoformas HsBT1, HsBT3 y HsBT6 de *Homo sapiens*, y SsBT de *Sus scrofa*. El modelado por homología de esas proteínas se realizó con el programa MODELLER 9v13⁵⁴, utilizando como molde a los residuos 1-428 de la cadena D de la estructura cristalográfica de la β -tubulina de *Ovis aries* (PDB ID: 3N2G_D)⁵⁵, misma que fue empleada por Aguayo-Ortiz y colaboradores en un estudio previo.²¹

Para cada isoforma se generaron cinco modelos, los cuales se evaluaron por los parámetros de validación QMEAN score, Z-score, diagrama de Ramachandran y porcentaje de error en rotámeros, que fueron proporcionados por el servidor Swiss Model⁵⁶, además del valor de RMSD (Å) entre el modelo y la estructura cristalográfica calculado con el programa PyMOL⁵⁷. De acuerdo a estos resultados, se seleccionó el mejor modelo para cada isoforma. Finalmente, cada modelo se sometió a una minimización de energía empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN⁵⁸, usando el paquete GROMACS 4.5.5⁵⁹.

6.3.3. Acoplamiento molecular

Preparación de las proteínas. Los modelos proteicos se prepararon con la interfaz gráfica AutoDock Tools⁶⁰, agregando los hidrógenos polares y asignando las cargas de los aminoácidos.

Preparación de los ligandos. Los compuestos de la serie LCG y derivados de bencimidazoles-2-carbamato de metilo (ver Tabla I.1 del Anexo I) se construyeron con el programa Maestro de Schrödinger⁶¹, tomando en cuenta el isomerismo del grupo carbamato (*cis*; *trans*), el tautomerismo de anillo de bencimidazol que da origen a los isómeros con sustitución en el sustituyente arilo en posición 5 o en 6 y los enantiómeros de los metabolitos (+; -). Se minimizaron las estructuras con el campo de fuerza MMFF94x y se dio flexibilidad a los enlaces rotables, excepto para los enlaces amida, los cuales se fijaron según el isómero correspondiente. Finalmente, se utilizó el programa AutoDock Tools para agregar los hidrógenos polares y detectar los centros de torsión y enlaces rotables de las moléculas.

Acoplamiento molecular. Los cálculos de *docking* fueron desarrollados utilizando el software AutoDock 4.2⁶² en la modalidad rígido-flexible. La caja de búsqueda se centró en el aminoácido 200, con 90 x 70 x 80 puntos de tamaño y un espaciado de 0.375 Å. El algoritmo genético tipo Lamarckiano se utilizó como método de búsqueda, con un total de 30 corridas, un número máximo de 5 000 000 de evaluaciones energéticas y una población inicial de 150 conformeros.²¹ El mejor modo de unión se seleccionó con base a la menor energía de unión y mayor tamaño de clúster.

6.3.4. Identificación de otros posibles blancos anticancerígenos

Otras posibles dianas farmacológicas de los bencimidazoles-2-carbamato de metilo para el desarrollo de terapias contra el cáncer fueron obtenidos de los resultados reportados.⁴⁹

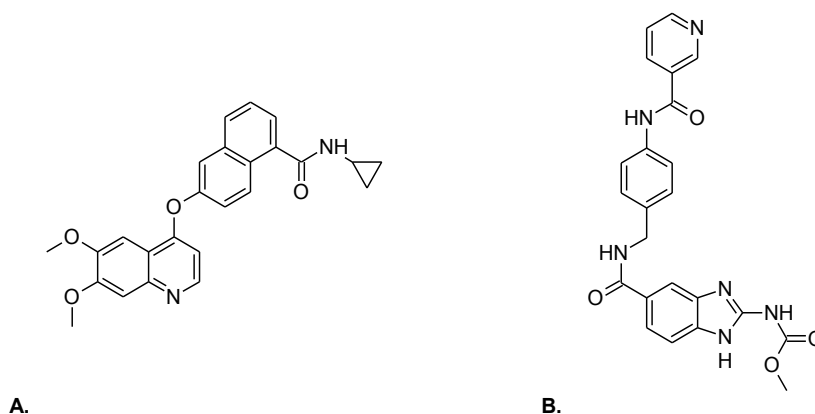


Figura 6.1. Compuestos (A) 3B8R y (B) C422⁶³.

Los compuestos LCG, PBS90⁶⁴ y WW5a²³ fueron evaluados en receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2 (VGEFR-2). Para los cálculos de *docking* se utilizó la proteína cristalizada (PDB: 2OH4)⁶⁵ y los parámetros reportados en el trabajo anterior⁴⁹. El compuesto referencia empleado fue el 3B8R (ver Figura 6.1.A); los resultados del acoplamiento molecular del compuesto C422⁶³, mostrado en la Figura 6.1. (B), fueron extraídos⁴⁹. Se empleó el software AutoDock 4.2 en la modalidad rígido-flexible. La caja de búsqueda se centró en el ligando cocrystalizado, de 70 x 70 x 70 puntos con un espaciado de 0.375 Å. El algoritmo genético tipo Lamarckiano fue utilizado como método de búsqueda con un total de 30 corridas con un número máximo de 5 000 000 de evaluaciones energéticas y una población inicial de 150 conformeros. El mejor modo de unión se seleccionó con base a la menor energía de unión y mayor tamaño de clúster.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se ha reportado un gran número de derivados bencimidazol-2-carbamato de metilo que inhiben la polimerización de los microtúbulos; entre ellos, compuestos como QG10a²⁵ y WW5a²³ (ver Figura 7.1.A) los cuales mostraron una importante actividad antitumoral. Ambas moléculas y sus derivados presentan en su estructura tres partes principales: bencimidazol-2-carbamato de metilo (núcleo principal), un sustituyente aromático y un conector entre ellos (ver Figura 7.1.B).

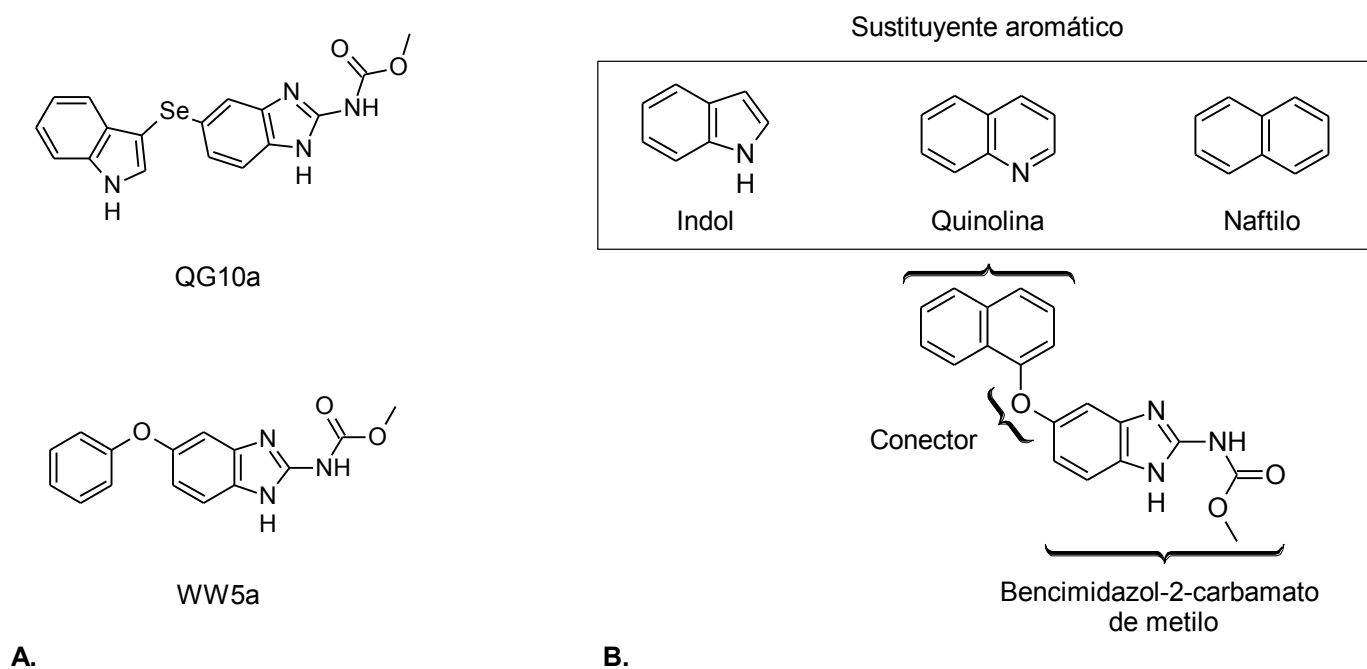


Figura 7.1. (A) Estructura de los compuestos QG10a y WW5a. (B) Partes de la estructura de los derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo.

En la serie de compuestos similares a WW5a, Wang y colaboradores²³ evalúan como sustituyente aromático a un grupo fenilo con diferentes sustituciones y al átomo de oxígeno como conector. Por otro lado, en el grupo de Guan²⁵ sintetizaron a QG10a y derivados, evaluándose sustituyentes indoles y conectores sulfuro, sulfóxido, sulfona y selenio. Los tipos de conector utilizados en ambos trabajos son grupos aceptores de puentes de hidrógeno, lo cual es importante debido a que un grupo de esta naturaleza favorece la unión a la β -tubulina

mediante una interacción de puente de hidrógeno con la Cys239²¹. Es por ello que en este estudio se propuso evaluar al oxígeno como conector; asimismo modificar el grupo aromático por grupos que han sido empleados para el tratamiento del cáncer, como lo es el naftilo y la quinolina.

En diversos trabajos se han estudiado moléculas que contienen el núcleo de quinolina, el cual es isómero al heterociclo indol y se encuentra catalogada como una estructura privilegiada (ver Figura 7.1.B). Dichos compuestos presentan actividad antitumoral a través de diversos mecanismos de acción,⁶⁶ por ejemplo la inhibición de la polimerización de la tubulina.^{67,68} Otro núcleo aromático interesante es el naftilo (ver Figura 7.1.B); de igual forma, existen reportes de moléculas que lo contienen y con la misma actividad biológica,^{69,70} algunos por medio de la desestabilización de los microtúbulos.⁷¹

Incluir estos núcleos en la estructura en nuevos derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo como sustituyentes podría favorecer el acoplamiento de los compuestos a la β -tubulina o permitir su unión a otro blanco para el tratamiento del cáncer e incrementar la posibilidad de lograr su función terapéutica. En la Tabla 6.3 se muestran las estructuras de las moléculas de la serie LCG propuestas para su síntesis.

A estas moléculas se les calcularon las siguientes propiedades estructurales: peso molecular (MW), donadores de puentes de hidrógeno (HBD), aceptores de puentes de hidrógeno (HBA), enlaces rotables (RB), área polar superficial topológica (tPSA) y logaritmo del coeficiente de partición (LogP). En la Tabla 7.1 se muestran los valores obtenidos para cada derivado del bencimidazol.

Dichas propiedades fueron calculadas con la finalidad de predecir la biodisponibilidad oral, al considerar los criterios de aceptación de las reglas de Lipinski ($MW \leq 500$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 10$ y $LogP \leq 5$), Egan ($0 \leq tPSA \leq 132$, $-1 \leq LogP \leq 6$) y Veber ($RB \leq 10$, $tPSA \leq 140$). El cumplimiento de estas reglas permite suponer que existe alta probabilidad de que los compuestos posean buena biodisponibilidad oral; pero si dos o más de estas propiedades se encuentran fuera del rango establecido, se considera una posible baja biodisponibilidad.⁷²⁻⁷⁴ Como se puede observar en la Tabla 7.1 es muy probable que los compuestos de la serie

LCG presenten buena biodisponibilidad oral puesto que cumplen con las reglas antes mencionadas.

En la predicción de la toxicidad de las moléculas se emplearon las reglas de GSK 4/400⁷⁵ y Pfizer 3/75⁷⁶. La primera señala que los compuestos con LogP>4 y MW>400 presentarán mayor probabilidad de ser tóxicos;⁷⁵ en cuanto a la segunda regla supone una alta toxicidad a compuestos que tengan LogP>3 y tPSA<75.⁷⁶ Como se puede observar en la Tabla 7.1 todos cumplen con la regla GSK 4/400; sin embargo, con los compuestos PBS-90, FBZ y la serie LCG se debe tener precaución bajo los criterios de regla de Pfizer 3/75. Asimismo, el compuesto de referencia PBZ y puede considerarse con alta probabilidad de ser tóxico. Debido a que ninguno viola ambas reglas, todos los compuestos LCG y demás carbamatos bencimidazólicos son aceptables.

Tabla 7.1. Propiedades moleculares de los derivados bencimidazólicos

Compuesto	MW	LogP	tPSA	HBD	HBA	RB	GSK 4/400	Pfizer 3/75	Resultado
ABZ	265.331	2.81	95.54	2	5	5	Bueno	Bueno	✓
ABZSO(+)	281.331	1.35	106.52	2	6	5	Bueno	Bueno	✓
ABZSO(-)	281.331	1.35	106.52	2	6	5	Bueno	Bueno	✓
FBZ	299.348	3.47	95.54	2	5	4	Bueno	Precaución	✓
FBZSO(+)	315.347	2.18	106.52	2	6	4	Bueno	Bueno	✓
FBZSO(-)	315.347	2.18	106.52	2	6	4	Bueno	Bueno	✓
MBZ	295.293	2.74	87.31	2	6	4	Bueno	Bueno	✓
NZ	301.320	2.76	115.55	2	6	4	Bueno	Bueno	✓
OBZ	249.266	2.27	79.47	2	6	5	Bueno	Bueno	✓
PBZ	247.293	3.28	70.24	2	5	5	Bueno	Malo	✓
LBZ	365.336	2.60	121.99	2	8	5	Bueno	Bueno	✓
WW5a	283.282	2.93	79.47	2	6	4	Bueno	Bueno	✓
PBS90	352.172	4.19	79.47	2	6	4	Bueno	Precaución	✓
LCG1	333.341	4.18	79.47	2	6	4	Bueno	Precaución	✓
LCG2	334.329	3.20	92.36	2	7	4	Bueno	Precaución	✓
LCG3	348.355	3.60	92.36	2	7	4	Bueno	Precaución	✓
LCG4	368.774	3.83	92.36	2	7	4	Bueno	Precaución	✓
LCG5	367.786	4.81	79.47	2	6	5	Bueno	Precaución	✓
LCG6	364.355	3.17	101.59	2	8	4	Bueno	Precaución	✓

7.2. Parte química

En la Tabla 7.2 se presentan los rendimientos de las reacciones involucradas en la síntesis de los compuestos **LCG1-LCG6**.

Tabla 7.2. Rendimientos de las reacciones involucradas en la síntesis de los compuestos LCG

Compuesto	Rendimiento (%)				
	S _N Ar*	Hidrólisis básica*	Reducción catalítica	Ciclocondensación	Global
LCG1	85.0 (2a)	95.0 (3a)	ND	80.0	64.6
LCG2	85.0 (2b)	70.0 (3b)	ND	73.0	43.4
LCG3	47.7 (2c)	84.5 (3c)	ND	94.0	37.9
LCG4	72.6 (2d)	88.5 (3d)	ND	50.0	32.2
LCG5	77.0 (2e)	96.9 (3e)	ND	81.7	60.9
LCG6	22.3 (2f)	96.3 (3f)	ND	70.7	15.2

*Rendimiento aproximado; ND: No determinado.

En la Tabla 7.3 se muestran las constantes físicas de los intermediarios y los productos finales sintetizados en este trabajo.

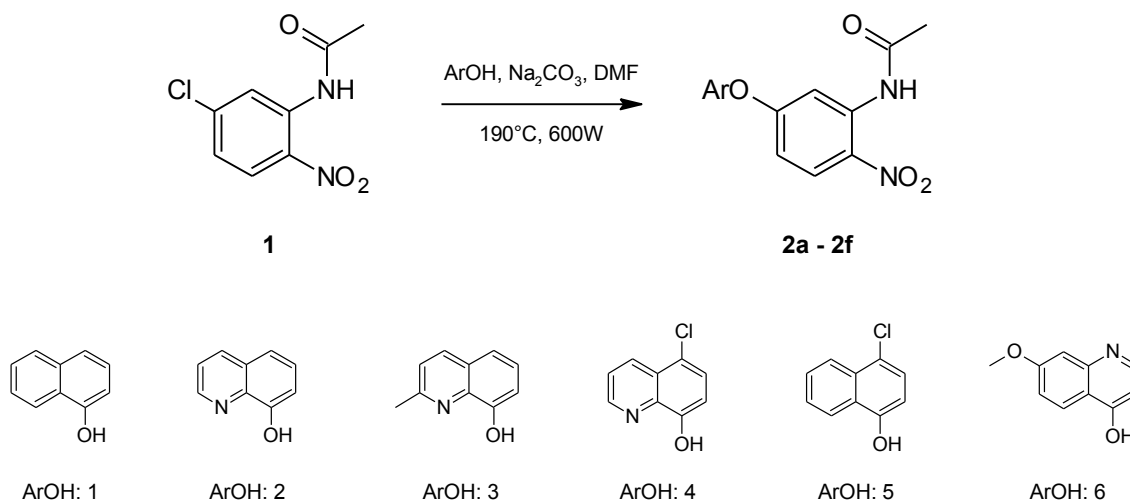
Tabla 7.3. Constantes físicas de los intermediarios aislados y productos finales

Compuesto	Punto de fusión (°C)	Factor de retención* (Rf)	Compuesto	Punto de fusión (°C)	Factor de retención* (Rf)
2a	ND	0.60	4a	ND	0.11
2b	ND	0.79	4b	ND	0.08
2c	ND	0.81	4c	ND	0.11
2d	ND	0.78	4d	ND	0.10
2e	ND	0.82	4e	ND	0.11
2f	ND	0.63	4f	ND	0.07
3a	170.8 - 172.3	0.77	LCG1	227.6 - 229.8	0.70
3b	208.8 - 209.8	0.67	LCG2	227.3 - 234.1	0.63
3c	192.7 - 193.1	0.77	LCG3	238.1 - 242.3	0.66
3d	156.1 - 157.7	0.72	LCG4	227.5 - 228.9	0.68
3e	156.7 - 157.8	0.M	LCG5	213.5 - 214.2	0.72
3f	234.9 - 235.4	0.49	LCG6	248.7 - 253.5	0.42

ND: No determinado; *Sistema de elución I: CHCl₃:MeOH (80:20).

7.2.1. Síntesis de las nitroacetanilidas 2a-2f

Reacción de Sustitución Nucleofílica Aromática



Esquema 7.1. S_NAr asistida por microondas para la obtención de los intermediarios **2a-2f**.

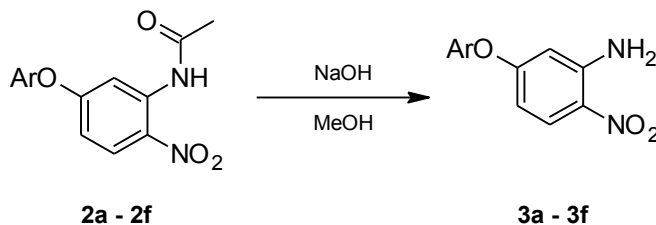
Por medio de una S_NAr del cloro de la 5-cloro-2-nitroacetanilina (**1**) por el grupo naftol o quinol (ArOH) correspondiente, se obtuvieron las nitroacetanilinas (**2a-2f**). Para ello se empleó un equipo de microondas disminuyendo significativamente el tiempo de reacción en comparación a reacciones realizadas por métodos convencionales. Se utilizó DMF como disolvente y carbonato de sodio como base para formar el ArO^- .

Estos compuestos no se aislaron debido a que el producto crudo de la reacción de S_NAr mostró ser mezcla del compuesto deseado **2a-2f** y su producto de hidrólisis. Por esta razón, se decidió realizar la hidrólisis total sin previa purificación para obtener a los intermediarios **3a-3f**.

Para la reacción de S_NAr se obtuvo un rendimiento de reacción aproximado ya que se calculó del producto crudo. De las reacciones realizadas, esta reacción presentó el menor rendimiento, por lo que se sugiere modificar el tiempo de reacción, temperatura y potencia en el microondas. Cabe mencionar, que el intermediario **2f** se obtuvo con más bajo rendimiento debido a la presencia de varios subproductos, además de su producto de hidrólisis, por tal motivo, se sometió a un proceso de purificación con lo que el rendimiento bajó considerablemente.

7.2.2. Síntesis de las nitroanilinas 3a-3f

Reacción de hidrólisis



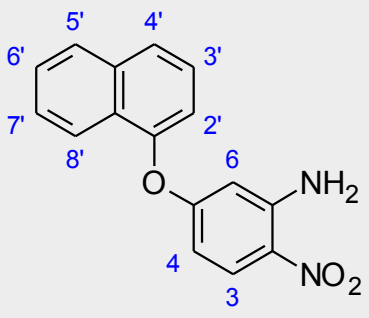
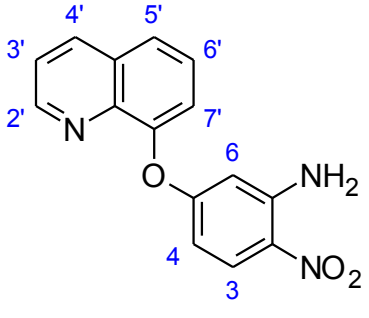
Esquema 7.2. Hidrólisis básica para la obtención de los intermediarios **3a-3f**.

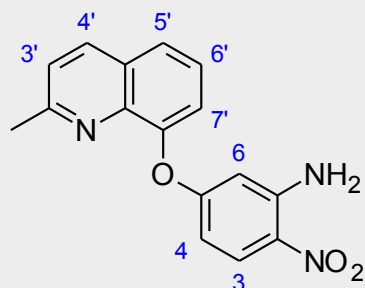
Se realizó la hidrólisis básica de las nitroacetanilidas sustituidas (**2a-2f**), de manera general, la reacción fue rápida y de buen rendimiento. Los Rf de las nitroanilinas sustituidas (**3a-3f**) son semejantes entre sí, en el mismo sistema; en el caso de **3b** y **3f**, el Rf es menor debido a que poseen un sustituyente quinolina capaz de establecer puentes de hidrógeno con la fase estacionaria.

Los intermediarios **3a-3f** son estables y fueron aislados para su caracterización estructural. En la Tabla 7.4 se resumen las constantes espectroscópicas de IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y espectrometría de masas, así como las asignaciones realizadas para cada compuesto; en el Anexo II.2 se muestran los espectros.

En los espectros de IR se identificaron las bandas correspondientes a los principales grupos funcionales Ar-O-Ar, Ar-NO₂ y Ar-NH₂ a 1053–1257, 1322–1370 y 3381–3500 cm⁻¹, respectivamente, además de las pertenecientes a grupos particulares de los sustituyentes. Asimismo, en los espectros de RMN ^1H se registraron las señales correspondientes a cada molécula; sin embargo, con la multiplicidad se presentaron dificultades para la asignación de éstas con sus hidrógenos, debido al solapamiento las señales correspondientes a hidrógenos de los sustituyentes aromáticos. Se observó una señal simple con un desplazamiento entre 7.3–7.6 ppm correspondiente al grupo amino presente en cada intermediario (**3a-3f**) y en la región entre 6.11 y 8.97 ppm se identificaron los hidrógenos aromáticos. En el espectro de RMN ^{13}C se localizaron la mayoría de las señales producidas por los carbonos de las estructuras. Finalmente, los espectros de masas mostraron el ion molecular mismo que coincidió con el pico base, excepto por **3c**.

Tabla 7.4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los intermedios 3a-3f

Compuesto	Método analítico y señales
 <p>5-(naftilén-1-iloxi)-2-nitroanilina (3a)</p>	<p>Espectro 1, IR (ATR, cm⁻¹): 3500 - 3345 (Ar-NH₂), 3064 (C-H aromático), 1903 - 1703 (C-H aromático), 1599 - 1460 (C=C aromático), 1567 (Ar-NO₂), 1338 (Ar-NO₂), 1220 - 1087 (Ar-O-Ar).</p> <p>Espectro 2, RMN ¹H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm): 6.28 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.39 (dd, <i>J</i> = 9.4, 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.33 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, H-2'), 7.43 (s, 2H, -NH₂), 7.52 - 7.67 (m, 3H, H-3', H-6', H-7'), 7.85 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, H-4'), 7.90 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-5'), 8.03 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H, H-3), 8.04 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, H-8').</p> <p>Espectro 3, RMN ¹³C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm): 102.4 (C-6), 106.4 (C-4), 113.7 (C-2'), 117.4 (C-4'), 121.1 (C-8'), 125.7 (C-8'a), 126.2 (C-3'), 126.3 (C-7'), 126.9 (C-6'), 127.0 (C-5'), 128.3 (C-3), 128.5 (C-2), 134.8 (C-4'a), 148.4 (C-1), 149.4 (C-1'), 164.1 (C-5).</p> <p>Espectro 4, EM (IE, m/z) (%ab): 280 (M⁺, 100%); 233 (M⁺ - 47, 18%); 127 ([233 - 106], 28%); 115 ([127 - 12], 39%).</p>
 <p>5-(quinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (3b)</p>	<p>Espectro 5, IR (ATR, cm⁻¹): 3440 (Ar-NH₂), 3157 - 3096 (C-H aromático), 1892 - 1707 (C-H aromático), 1626 (Ar-NH₂), 1579 - 1468 (C=C aromático), 1568 (Ar-NO₂), 1370 (Ar-NO₂), 1231 - 1053 (Ar-O-Ar).</p> <p>Espectro 6, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 6.17 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.31 (dd, <i>J</i> = 9.5, 2.7 Hz, 1H, H-4), 7.34 (s, 2H, -NH₂), 7.59-7.64 (ddd, <i>J</i> = 11.2, 7.3, 2.8 Hz, 2H, H-3', H-7'), 7.69 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.95 - 7.99 (m, 2H, H-3, H-5'), 8.48 (dd, <i>J</i> = 8.4, 1.7 Hz, 1H, H-4'), 8.86 (dd, <i>J</i> = 4.2, 1.7 Hz, 1H, H-2').</p> <p>Espectro 7, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 102.1 (C-6), 106.5 (C-4), 121.5 (C-7'), 122.3 (C-3'), 125.9 (C-5'), 126.0 (C-6'), 126.9 (C-3), 128.0 (C-2), 129.8 (C-4'a), 136.4 (C-4'), 140.8 (C-8'a), 148.2 (C-1), 149.2 (C-2'), 150.7 (C-8'), 164.6 (C-5).</p> <p>Espectro 8, EM (IE m/z) (%ab): 281 (M⁺, 98%); 280 ([M⁺ - 1], 100%); 264 ([280 - 16], 15%); 234 ([264 - 30], 66%).</p>



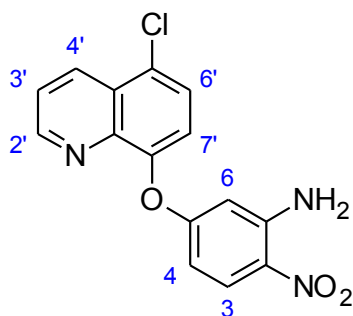
5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina
(3c)

Espectro 9, IR (ATR, cm^{-1}): 3381 - 3450 (Ar-NH₂), 3111 (C-H aromático), 1603 - 1491 (C=C aromático), 1561 (Ar-NO₂), 1466 (CH₃), 1322 (Ar-NO₂), 1226 (Ar-O-Ar).

Espectro 10, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 2.57 (s, 3H, -CH₃), 6.20 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H-6), 6.32 (dd, J = 9.5, 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.37 (s, 2H, -NH₂), 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-3'), 7.53 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H, H-7'), 7.59 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.88 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H, H-5'), 7.98 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 8.34 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-4').

Espectro 11, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 25.2 (-CH₃), 102.2 (C-6), 106.7 (C-4), 121.2 (C-7'), 123.1 (C-5'), 125.6 (C-3'), 125.9 (C-6'), 128.0 (C-2), 128.1 (C-4'a), 136.4 (C-4'), 140.4 (C-8'a), 148.3 (C-1), 148.9 (C-8'), 159.2 (C-2'), 164.6 (C-5).

Espectro 12, EM (IE m/z) (%ab): 295 (M⁺, 78%); 294 (M⁺ - 1, 100%); 248 ([294 - 46], 38%).



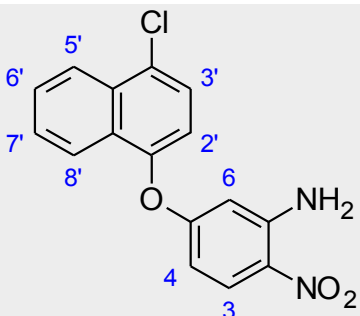
5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina
(3d)

Espectro 13, IR (ATR, cm^{-1}): 3433 (Ar-NH₂), 3146 - 3082 (C-H aromático), 1714 (C-H aromático), 1620 - 1463 (C=C aromático), 1575, 1356 (Ar-NO₂), 1254 - 1230 (Ar-O-Ar).

Espectro 14, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 6.18 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.34 (dd, J = 9.5, 2.7 Hz, 1H, H-4), 7.33 (s, 2H, -NH₂), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7'), 7.78 (dd, J = 8.6, 4.2 Hz, 1H, H-3'), 7.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6'), 7.97 (d, J = 9.5, 1H, H-3), 8.64 (dd, J = 8.6, 1.6 Hz, 1H, H-4'), 8.97 (dd, J = 4.2, 1.6 Hz, 1H, H-2').

Espectro 15, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 102.3 (C-6), 106.4 (C-4), 121.9 (C-7'), 123.6 (C-3'), 126.0 (C-5'), 127.0 (C-3), 127.1 (C-2), 127.2 (C-4'a), 128.0 (C-6'), 132.9 (C-4'), 141.4 (C-8'a), 148.2 (C-2'), 148.7 (C-1), 151.6 (C-8'), 164.3 (C-5).

Espectro 16, EM (IE m/z) (%ab): 317 (M⁺ + 2, 33%); 315 (M⁺, 100%); 314 (M⁺ - 1, 66%); 280 (M⁺ - 35, 18%); 268 ([280 - 12], 34%); 179 ([268 - 89], 16%).



5-(4-cloronaftil-1-iloxi)-2-nitroanilina
(3e)

Espectro 17, IR (ATR, cm^{-1}): 3464-3343 (Ar-NH₂), 3070 (C-H aromático), 1952 - 1881 (C-H aromático), 1633 (Ar-NH₂), 1591 - 1456 (C=C aromático), 1504 (Ar-NO₂), 1336 (Ar-NO₂), 1228 - 1196 (Ar-O-Ar).

Espectro 18, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 6.29 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.43 (dd, J = 9.5, 2.7 Hz, 1H, H-4), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-2'), 7.41 (s, 2H, -NH₂), 7.69 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H-7'), 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-3'), 7.79 (ddd, J = 8.4, 6.9, 1.3 Hz, 1H, H-6'), 7.94 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 8.03 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 8.26 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-8').

Espectro 19, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 102.7 (C-6), 106.4 (C-4), 117.8 (C-2'), 122.0 (C-8'), 124.4 (C-5'), 126.4 (C-3), 126.6 (C-3'), 127.5 (C-4'), 127.5 (C-8'a), 128.0 (C-2), 128.5 (C-7'), 128.6 (C-6'), 131.2 (C-4'a), 148.3 (C-1), 148.9 (C-1'), 163.7 (C-5).

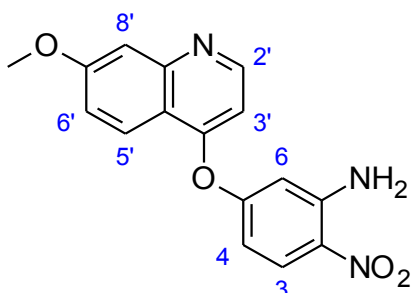
Espectro 20, EM (IE m/z) (%ab): 316 (M⁺ + 2, 33%); 314 (M⁺, 100%); 233 (M⁺ - 81, 12%); 204 ([233 - 29], 12%); 149 ([204 - 55], 20%).

Espectro 21, IR (ATR, cm⁻¹): 3469 - 3400 (Ar-NH₂), 3167 (C-H aromático), 2984 (CH₃), 1617 - 1460 (C=C aromático), 1560 (Ar-NO₂), 1257 (Ar-O-Ar).

Espectro 22, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 6.11 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-3'), 6.53 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-8'), 6.78 (dd, J = 9.1, 2.0 Hz, 1H, H-4), 7.05 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H, H-6'), 7.16 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.67 (s, 2H, -NH₂), 7.91 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-2'), 8.13 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-5'), 8.19 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-3).

Espectro 23, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 55.6 (-CH₃), 99.7 (C-8'), 109.6 (C-6), 113.0 (C-3'), 114.1 (C-4), 117.4 (C-6'), 120.3 (C-4'a), 127.8 (C-5'), 128.0 (C-3), 130.1 (C-2), 141.6 (C-8'a), 142.8 (C-1), 146.5 (C-2'), 147.2 (C-5), 162.1 (C-4'), 176.0 (C-7').

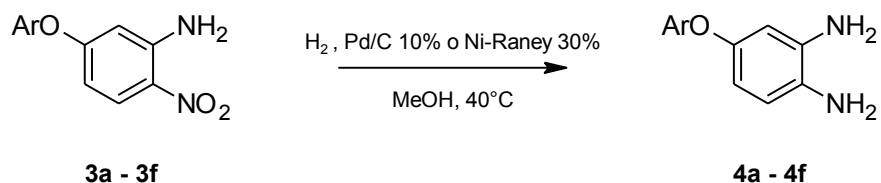
Espectro 24, EM (IE m/z) (%ab): 311 (M⁺, 100%); 293 (M⁺ - 18, 38%); 283 ([293 - 10], 14%); 250 ([283 - 33], 14%); 222 ([250 - 28], 14%).



5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroanilina (3f)

7.2.3. Síntesis de las o-fenilendiaminas 4a-4f

Reducción catalítica

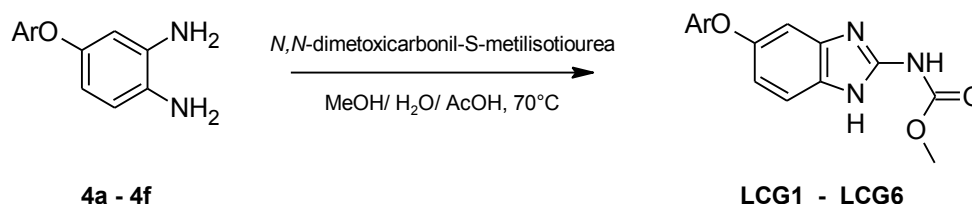


Esquema 7.3. Reducción catalítica para la obtención de los intermediarios 4a-4f.

La reducción del grupo nitro los intermediarios **3a-3f** se llevó a cabo mediante una reducción catalítica utilizando hidrógeno, catalizador (Pd/C o Ni-Raney para los compuestos clorados como **3d** y **3e**) y calentamiento.

Las diaminas (**4a-4f**) obtenidas en este trabajo tienden a oxidarse al contacto con el aire; por esta razón se sometieron sin aislar a la reacción de ciclocondensación. Se determinó la culminación de la reacción mediante ccf, ya que el Rf de los compuestos deseados es menor a 0.2.

7.2.4. Síntesis de los productos finales (LCG1 - LCG6)



Esquema 7.4. Ciclocondensación para la obtención de los compuestos de la serie LCG.

Por último, las *o*-fenilendiaminas (**4a-4f**) se hicieron reaccionar con *N,N*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea en MeOH, ácido acético glacial como catalizador y calentamiento. Cabe resaltar que a excepción de LCG4, todos los productos se obtuvieron con buen rendimiento a partir de las dos reacciones; la reducción y la ciclocondensación.

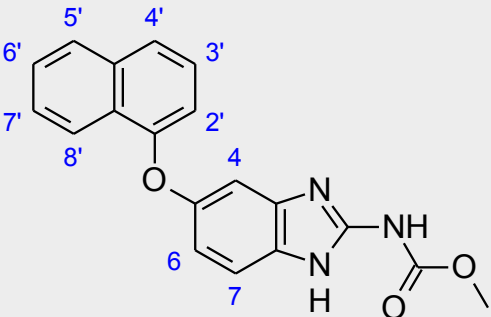
El punto de fusión de los productos finales es alto y los Rf similares; además, la diferencia entre ellos radica en los sustituyentes en la posición 5(6). Estos compuestos presentan muy baja solubilidad en una amplia gama de disolventes.

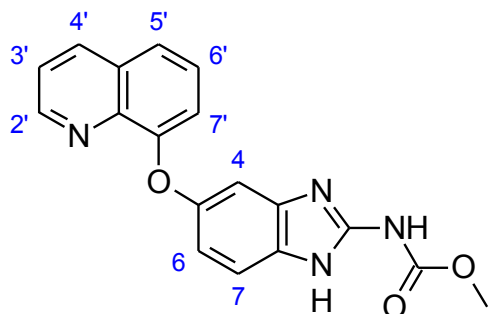
En la Tabla 7.5 se resumen las constantes espectroscópicas de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y espectrometría de masas, así como las asignaciones realizadas para cada compuesto de la serie LCG; en el Anexo II.2 se encuentran los espectros.

En los espectros de IR de los compuestos de la serie LCG se identificaron las bandas correspondientes a los grupos funcionales C=O, CH₃ y Ar-NH-R₂ a 1710–1733, 2947–2985 y 3184–3584 cm⁻¹, respectivamente, además de las pertenecientes a grupos particulares de

los sustituyentes. En el espectro de RMN ^1H se observó una señal simple con un desplazamiento de aproximadamente 3.7 ppm y que integró para 3H, originado por los hidrógenos del metilo; otra señal simple se registró entre 11.6–11.8 ppm que comprende el hidrógeno del grupo amino del anillo de bencimidazol y del carbamato; y en la región aromática se identificaron los hidrógenos aromáticos. El número de señales correspondió con el esperado para cada estructura pero nuevamente la multiplicidad de las mismas no se resolvió en todos los casos. En los espectros de RMN ^{13}C se localizaron las señales que producidas por los carbonos de las estructuras excepto por los carbonos cuaternarios del núcleo de bencimidazol (C-3a y C-7a) en cada una de las moléculas y los carbonos C-4 y C-7 de LCG6. Finalmente, en los espectros de masas se localizaron los picos pertenecientes al ion molecular y al pico base: Todos los compuestos los compuestos mostraron es la pérdida de CH_3OH como primera fragmentación.

Tabla 7.5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos de la serie LCG

Compuesto	Método analítico y señales
 <p><i>N</i>-[5-(naftilen-1-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG1)</p>	<p>Espectro 25, IR (ATR, cm^{-1}): 3406 (Ar-NH-R₂), 3053 - 3007 (C-H aromático), 2955 (CH₃), 1710 (C=O, CO- OCH₃), 1603 - 1448 (C=C aromático), 1281 (C-O-C).</p>
	<p>Espectro 26, RMN ^1H (TMS, DMSO, δ en ppm): 3.73 (s, 3H, -OCH₃), 6.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-2'), 6.90 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 7.08 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 7.41 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3'), 7.43 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.52 - 7.61 (m, 2H, H-6', H-7'), 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-5'), 7.96 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-4'), 8.20 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-8'), 11.64 (s, 2H, -NH).</p>
	<p>Espectro 27, RMN ^{13}C (TMS, DMSO, δ en ppm): 52.5 (-OCH₃), 104.6 (C-4), 111.8 (C-2'), 113.2 (C-6), 114.6 (C-7), 121.6 (C-8'), 122.5 (C-5'), 125.8 (C-8'a), 126.1 (C-7'), 126.2 (C-3'), 126.8 (C-6'), 127.9 (C-4'), 134.6 (C-4'a), 148.0 (C-2), 151.5 (C-5), 154.0 (C-1'), 154.8 (-CO).</p>
	<p>Espectro 28, EM (IE m/z) (%ab): 333 (M^+, 72%); 301 ($M^+ - 32$, 100%); 272 ([301 - 29], 21%); 127 ([272 - 145], 16%).</p>



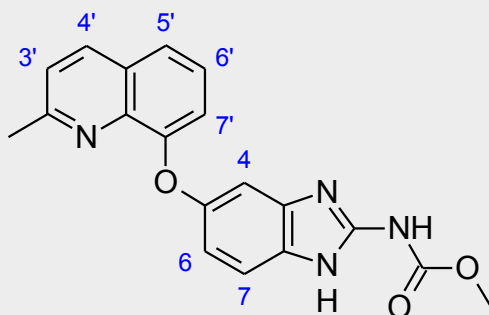
N-[5-(quinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG2)

Espectro 33, IR (ATR, cm^{-1}): 3209 (Ar-NH- R_2), 3012 - 3074 (C-H aromático), 2947 (CH_3), 1726 (C=O, CO- OCH_3), 1594 - 1440 (C=C aromático), 1259 (C-O-C).

Espectro 34, RMN ^1H (TMS, DMSO, δ en ppm): 3.73 (s, 3H, - OCH_3), 6.86 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 7.02 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 7.11 (dd, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H, H-7'), 7.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-7), 7.51 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.59 (dd, $J = 8.3, 4.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.70 (dd, $J = 8.3, 1.1$ Hz, 1H, H-5'), 8.40 (dd, $J = 8.4, 1.7$ Hz, 1H, H-4'), 8.88 (dd, $J = 4.1, 1.7$ Hz, 1H, H-2'), 11.63 (s, 2H, -NH).

Espectro 35, RMN ^{13}C (TMS, DMSO, δ en ppm): 52.4 (- OCH_3), 103.9 (C-4), 112.9 (C-6), 114.4 (C-7), 116.0 (C-7'), 122.1 (C-3'), 122.5 (C-5'), 126.8 (C-6'), 129.5 (C-4'a), 136.1 (C-4'), 140.4 (C-8'a), 147.9 (C-2), 149.9 (C-2'), 152.0 (C-5), 153.8 (C-8'), 154.8 (-CO).

Espectro 36, EM (IE m/z) (%ab): 334 (M^+ , 23%); 302 ($\text{M}^+ - 32$, 56%); 301 ([302 - 1], 100%); 275 ([301 - 26], 10%).



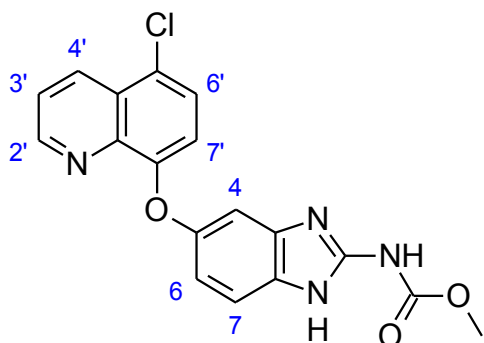
N-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG3)

Espectro 41, IR (ATR, cm^{-1}): 3184 (Ar-NH- R_2), 3060 (C-H aromático), 2985 - 2947 (CH_3), 1726 (C=O, CO- OCH_3), 1592 - 1467 (C=C aromático), 1258 (C-O-C).

Espectro 42, RMN ^1H (TMS, DMSO, δ en ppm): 2.65 (s, 3H, - CH_3), 3.74 (s, 3H, - OCH_3), 6.88 (dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H, H-6), 6.98 (d, $J = 7.7$ Hz, H-7'), 7.07 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 7.39 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.42 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-7), 7.47 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-3'), 7.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 8.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-4'), 11.62 (s, 2H, -NH).

Espectro 43, RMN ^{13}C (TMS, DMSO, δ en ppm): 25.1 (- CH_3), 52.4 (- OCH_3), 104.7 (C-4), 113.4 (C-6), 114.4 (C-7), 115.2 (C-7'), 121.8 (C-5'), 122.8 (C-3'), 125.7 (C-6'), 127.7 (C-4'a), 136.2 (C-4'), 139.7 (C-8'), 147.9 (C-2), 151.6 (C-5), 153.8 (C-8'), 154.8 (-CO), 158.5 (C-2').

Espectro 44, EM (IE m/z) (%ab): 348 (M^+ , 32%); 316 ($\text{M}^+ - 32$, 52%); 315 ([316 - 1], 100%); 289 ([315 - 26], 16%); 207 (289 - 82), 27%).



N-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-
bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
(LCG4)

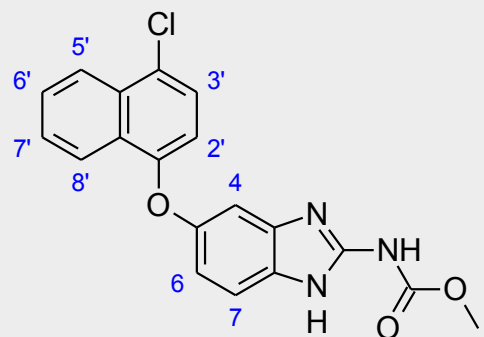
Espectro 49, IR (ATR, cm^{-1}): 3196 (Ar-NH-R₂), 3061 (C-H aromático), 2953 (CH₃), 1733 (C=O, CO- OCH₃), 1589 - 1463 (C=C aromático), 1252 (C-O-C).

Espectro 50, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 6.88 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, H-6), 7.06 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-7'), 7.08 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.42 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-7), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.77 (dd, J = 8.6, 4.1 Hz, 1H, H-3'), 8.58 (dd, J = 8.6, 1.3 Hz, 1H, H-4'), 9.00 (dd, J = 4.0, 1.2 Hz, 1H, H-2'), 11.63 (s, 2H, -NH).

Espectro 51, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 52.5 (-OCH₃), 104.5 (C-4), 113.1 (C-6), 114.2 (C-7), 115.5 (C-7'), 123.2 (C-5'), 123.4 (C-3'), 126.6 (C-4'a), 126.9 (C-6'), 132.5 (C-4'), 140.7 (C-8'a), 148.0 (C-2), 150.6 (C-2'), 151.2 (C-5), 153.7 (C-8'), 154.8 (-CO).

Espectro 52, EM (FAB⁺ m/z) (%ab): 370 (M+2, 33%); 369 (M+H⁺, 45%); 337 (M⁺ -32, 8%); 307 ([337 - 30], 33%); 289 ([307 - 18], 16%); 154 ([289 - 135], 100%).

Espectro 57, IR (ATR, cm^{-1}): 3402 (Ar-NH-R₂), 3072 - 3020 (C-H aromático), 2952 (CH₃), 1721 (C=O, CO- OCH₃), 1605 - 1454 (C=C aromático), 1275 (C-O-C).

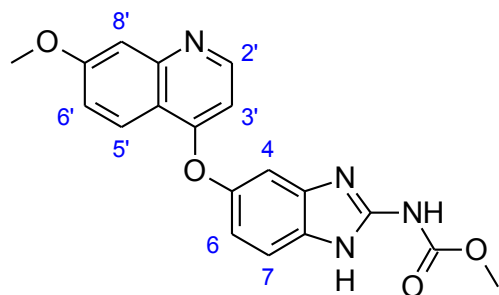


N-[5-(4-cloronaftilen-1-iloxi)-1*H*-
bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
(LCG5)

Espectro 58, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 6.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-2'), 6.92 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.14 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-4), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-3'), 7.69 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 1H, H-7'), 7.77 (ddd, J = 8.4, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H-6'), 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 8.33 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-8'), 11.68 (s, 2H).

Espectro 59, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 52.5 (-OCH₃), 105.0 (C-4), 111.3 (C-2'), 113.4 (C-6), 114.6 (C-7), 122.3 (C-8'), 123.8 (C-5'), 123.9 (C-4'), 126.3 (C-8'a), 126.6 (C-3'), 127.0 (C-7'), 128.4 (C-6'), 130.8 (C-4'a), 148.0 (C-2), 150.7 (C-5), 153.7 (C-1'), 154.7 (-CO).

Espectro 60, EM (IE m/z) (%ab): 369 (M+2,33%), 367 (M⁺, 46%); 335 (M⁺ -32,100%); 299 ([335 - 36], 22%); 272 ([299 - 27], 21%).



N-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG6)

Espectro 65, IR (ATR, cm^{-1}): 3584 (Ar-NH-R₂), 3066 (C-H aromático), 2952 (CH₃), 1723 (C=O, CO- OCH₃), 1613 - 1456 (C=C aromático), 1250 (C-O-C).

Espectro 66, RMN ¹H (TMS, DMSO, δ en ppm): 3.62 (s, 3H, OCH₃ en C7'), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 6.08 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-3'), 6.30 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-8'), 7.01 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H, H-6'), 7.18 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H-6), 7.52 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-4), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 7.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-2'), 8.14 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-5'), 11.86 (s, 2H, -NH).

Espectro 67, RMN ¹³C (TMS, DMSO, δ en ppm): 52.6 (C7'-OCH₃), 55.4 (-OCH₃), 99.9 (C-8'), 108.9 (C-3'), 112.4 (C-6'), 120.2 (C-6), 120.4 (C-4'a), 127.6 (C-5'), 134.4 (C-5), 143.4 (C-8'a), 144.4 (C-2'), 148.8 (C-2), 154.5 (-CO), 161.8 (C-7'), 176.1 (C-4').

Espectro 68, EM (FAB⁺ m/z) (%ab): 365 (M+H⁺, 30%); 364 (M⁺, 10%); 333 (M⁺ -31, 10%); 307 ([333 - 26], 25%); 289 ([307 - 18], 12%); 154 ([289 - 135], 100%).

Para la asignación de los hidrógenos y carbonos en los espectros de RMN, se emplearon los datos obtenidos en RMN ¹H, RMN ¹³C y los siguientes experimentos: COSY (Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) y NOESY (Nuclear Overhauser Efecto Spectroscopy). Para fines prácticos a continuación se muestra un ejemplo con el compuesto LCG2.

Mediante el experimento COSY se encontraron las correlaciones de los acoplamientos de hidrógenos vecinos, las cuales se observan fuera de la diagonal. En la Tabla 7.6 se detallan la posición y desplazamiento de los hidrógenos acoplados en el compuesto LCG2, mientras que en la Figura 7.2 se muestra una ampliación del área del espectro del experimento COSY donde se observa el acoplamiento entre ellos.

Tabla 7.6. Correlaciones de ¹H-¹H observadas en el espectro COSY de LCG2

Posición de los hidrógenos acoplados	Desplazamiento (δ en ppm)
H-6; H-7	6.86; 7.40
H-6'; H-5'	7.51; 7.70
H-7'; H-6'	7.11; 7.51
H-3'; H-2'	7.59; 8.88
H-3'; H-4'	7.59; 8.40

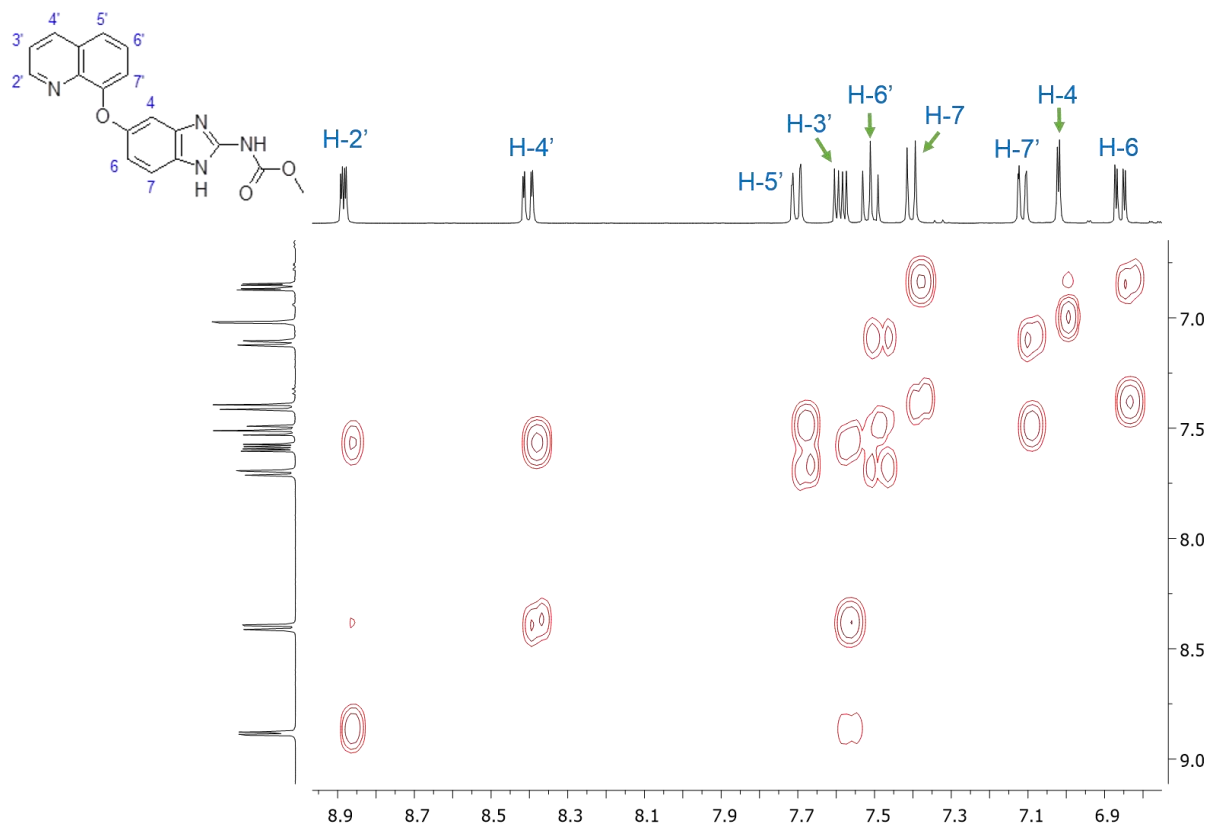


Figura 7.2. Espectro COSY de LCG2.

En la Tabla 7.6 se muestra la correlación de las señales observadas en el experimento HSQC del hidrógeno y el carbono al cual están enlazados y en la Figura 7.3 se presenta la asignación de estas señales (el espectro completo se encuentra en el anexo II.2). Los carbonos cuaternarios no se relacionan con hidrógenos ni los hidrógenos unidos a átomos de nitrógeno.

Tabla 7.7. Correlaciones de ^1H - ^{13}C observadas en el espectro HSQC de LCG2

Posición del H	Desplazamiento del H (ppm)	Desplazamiento del C (ppm)
-OCH ₃	3.73	52.4
4	7.02	103.9
6	6.86	112.9
7	7.40	114.4
2'	8.88	149.9
3'	7.59	122.1
4'	8.40	136.1
5'	7.70	122.5
6'	7.51	126.8
7'	7.11	116.0

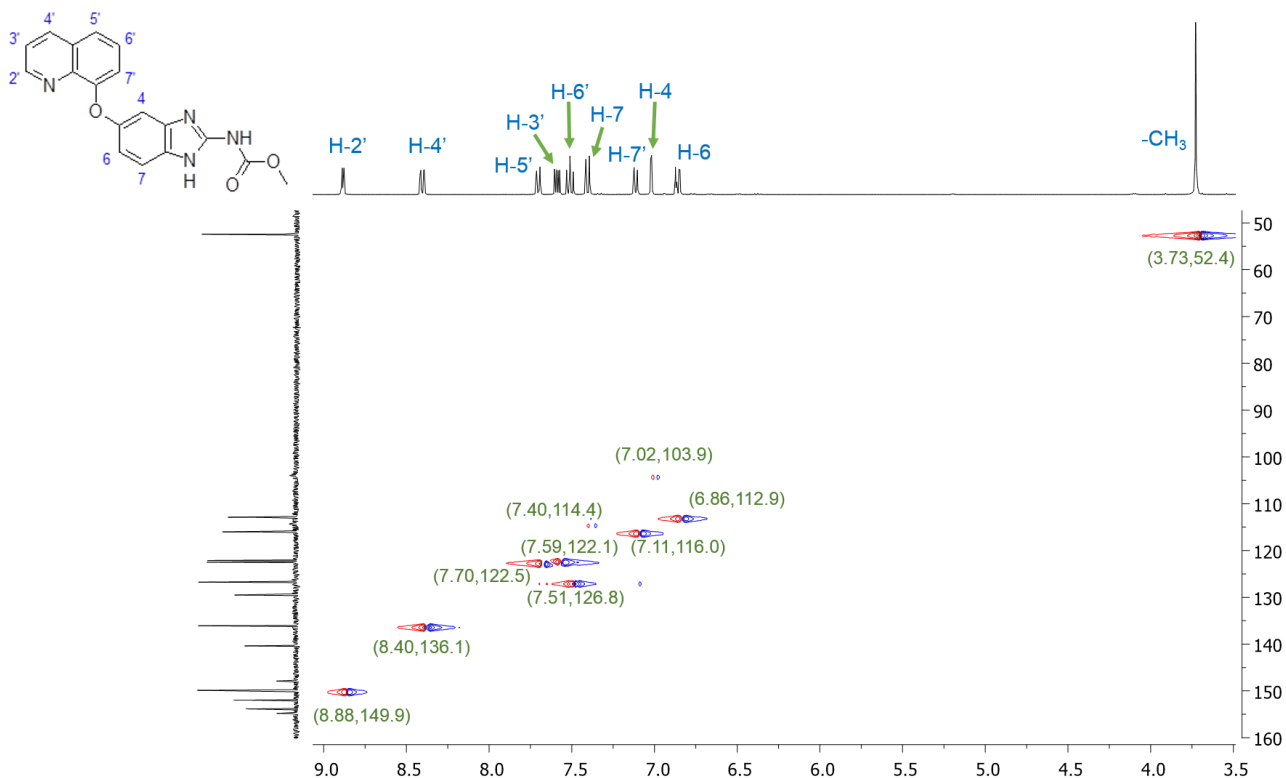


Figura 7.3. Espectro del experimento HSQC de LCG2.

En el caso de los carbonos cuaternarios se requirió del espectro de RMN de ^{13}C y el del experimento HMBC para asignar las señales, en la Tabla 7.8 se muestran las correlaciones que lo permitieron y en la Figura 7.4 se muestra el área del espectro de manera ampliada.

Tabla 7.8. Correlaciones de ^1H - ^{13}C observadas en el espectro HMBC de LCG2

Posición del H	Desplazamiento del H (ppm)	Carbono con el que correlaciona	Desplazamiento del C (ppm)
-OCH ₃	3.73	C=O	154.8
4	7.02	6	112.9
		5	152.0
6	6.86	4	103.9
		5	152.0
7	7.40	5	152.0
2'	8.88	4'	136.1
		8'a	140.4
		3'	122.1
3'	7.59	4'a	129.5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4'	8.40	2'	149.9
		8'a	140.4
		5'	122.5
		4'a	129.5
5'	7.70	7'	116.0
		8'a	140.4
		4'	136.1
		6'	126.8
6'	7.51	4'a	129.5
		8'	153.8
		5'	122.5
		7'	116.0
7'	7.11	5'	122.5
		8'a	140.4
		8'	153.8

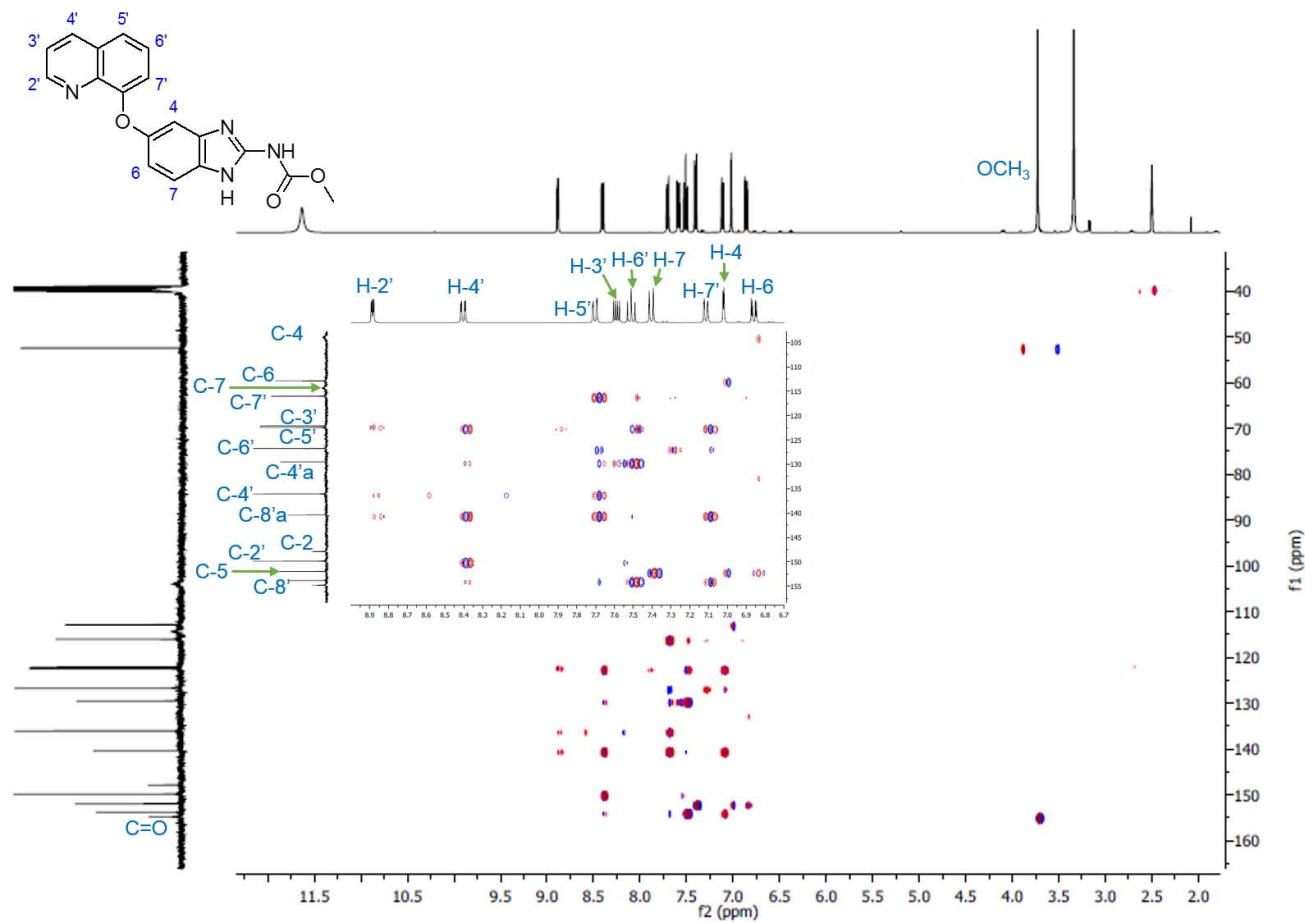


Figura 7.4. Espectro del experimento HMBC de LCG2.

Por último, en el espectro del experimento NOESY se observó una correlación entre los hidrógenos en las posiciones 4' y 5' (ver Espectro 40, Anexo II.2) debida a que su localización en el espacio es cercana.

La caracterización estructural de los compuestos LCG se realizó de manera similar; los espectros correspondientes se encuentran en el Anexo II.2.

7.3. Parte computacional

7.3.1. Alineamiento de secuencias y comparación estructural

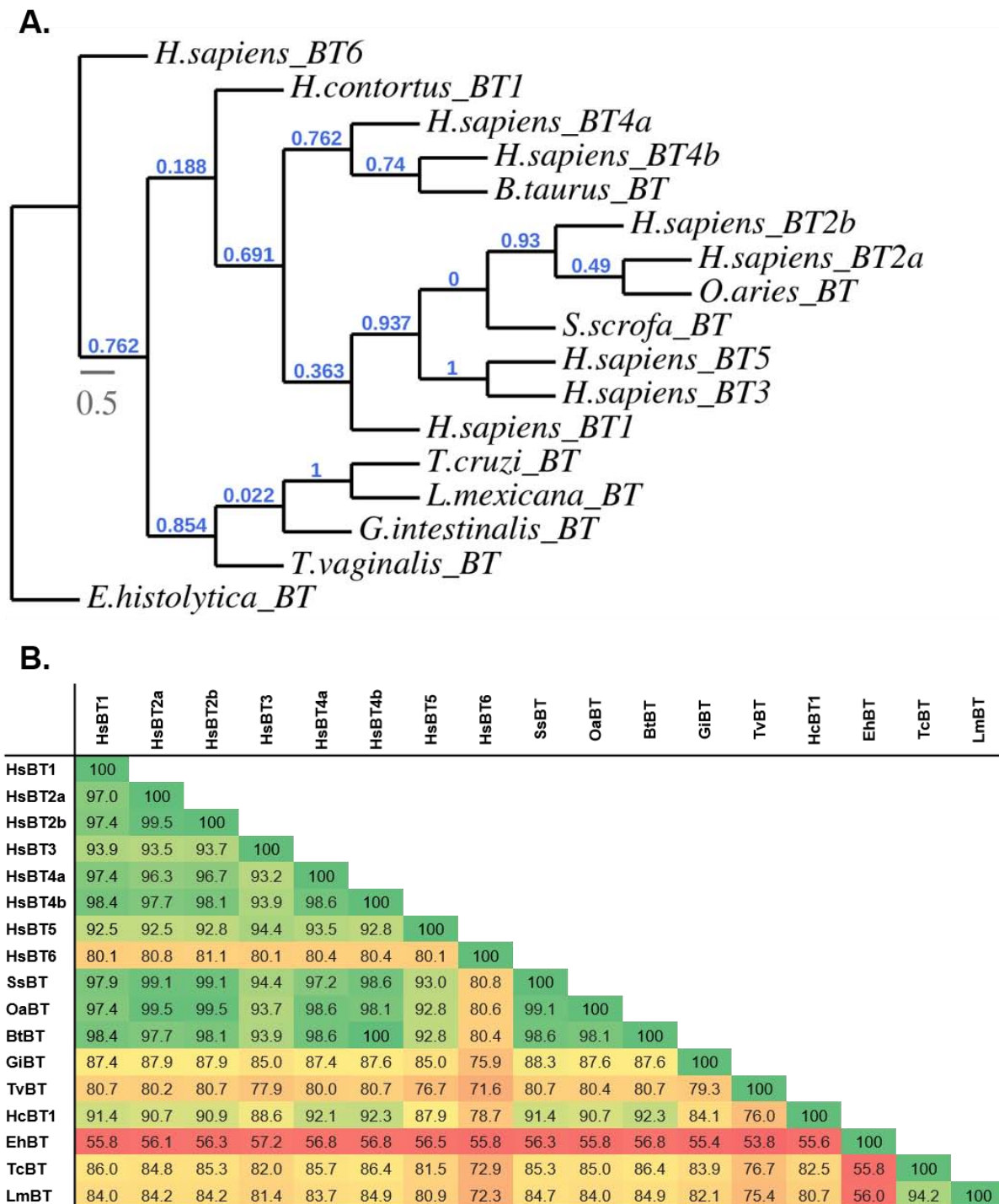


Figura 7.5. (A) Cladograma y (B) matriz de correlación de las isoformas de β -tubulina empleadas en este estudio. En la tabla III.1.1 del Anexo III se enlistan las claves de identificación de UniProt de estas secuencias.

Para realizar el estudio de acoplamiento molecular fue necesario construir los modelos β -tubulina de humano. Además, en este trabajo se incluyeron las isoformas de *Sus scrofa* (SsBT) y *Ovis aries* (OaBT), la primera debido a que es la disponible en *Tubulin Polymerization Assay Kit*⁷⁷ que se utilizará en la evaluación de los compuestos de la serie LCG; por su parte, la OaBT porque fue empleada como molde en el modelado de las estructuras tridimensionales²¹. En la Figura 7.5 se muestra un cladograma y una matriz de correlación de las isoformas de β -tubulina analizadas en este estudio. Como se puede observar, las β -tubulina de mamíferos presentan una alta similitud entre sí, excepto por la HsBT6 que incluso tiene mayor diferencia secuencial con el resto de las que se expresan en el humano (ver Figura III.1.1 del Anexo III).

Dado que HsBT6 se localiza solamente en células hematopoyéticas,³¹ el resultado obtenido es interesante ya que se necesita que tenga mayor diferencia secuencial con las isoformas HsBT1 y HsBT3 para aumentar la selectividad hacia estas dos últimas. No obstante, se esperaba una mayor similitud entre HsBT1 y HsBT3 y menor al resto de las isoformas para evitar la unión inespecífica de ligandos.

Las isoformas HcBT1 seguida de GiBT, son las que presentan mayor similitud con las de humano, excepto por HsBT6; ambos parásitos son susceptibles al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos⁷⁸. Por otro lado, las β -tubulina de humano poseen menor similitud en comparación con las isoformas de los protozoarios EhBT, TcBT y LmBT, que son organismos resistentes a dicho tratamiento⁷⁸. Dado que la isoforma HsBT6 es la que presenta mayor diferencia secuencial con las de los parásitos susceptibles, podemos suponer que un compuesto del tipo carbamato bencimidazólico podría unirse con menor afinidad a dicha isoforma, en contraste con la de organismos susceptibles, aunque no se obtuvo mayor semejanza con respecto a las isoformas de parásitos resistentes al tratamiento mencionado.

De manera general, se esperaba que las dianas biológicas sugeridas, HsBT1 y HsBT3, presentaran mayor similitud secuencial con las isoformas de parásitos susceptibles y menor con el resto de las de humano así como con la de organismos resistentes al tratamiento con

carbamatos bencimidazólicos. Sin embargo, además de la similitud secuencial es importante la disposición de los aminoácidos en el sitio de unión de los agentes de unión a tubulina.

Como ya se mencionó, se han localizado experimentalmente seis sitios de unión a moléculas en la β -tubulina; con ellos se realizó una comparación secuencial de los aminoácidos que lo componen en las isoformas de humano y la que contiene el ligando co-cristalizado. En la Figura 7.6 se muestra el sitio de unión y dicha comparación secuencial para los agentes inhibidores de la polimerización de la tubulina: vinblastina, colchicina y rizoxina F.

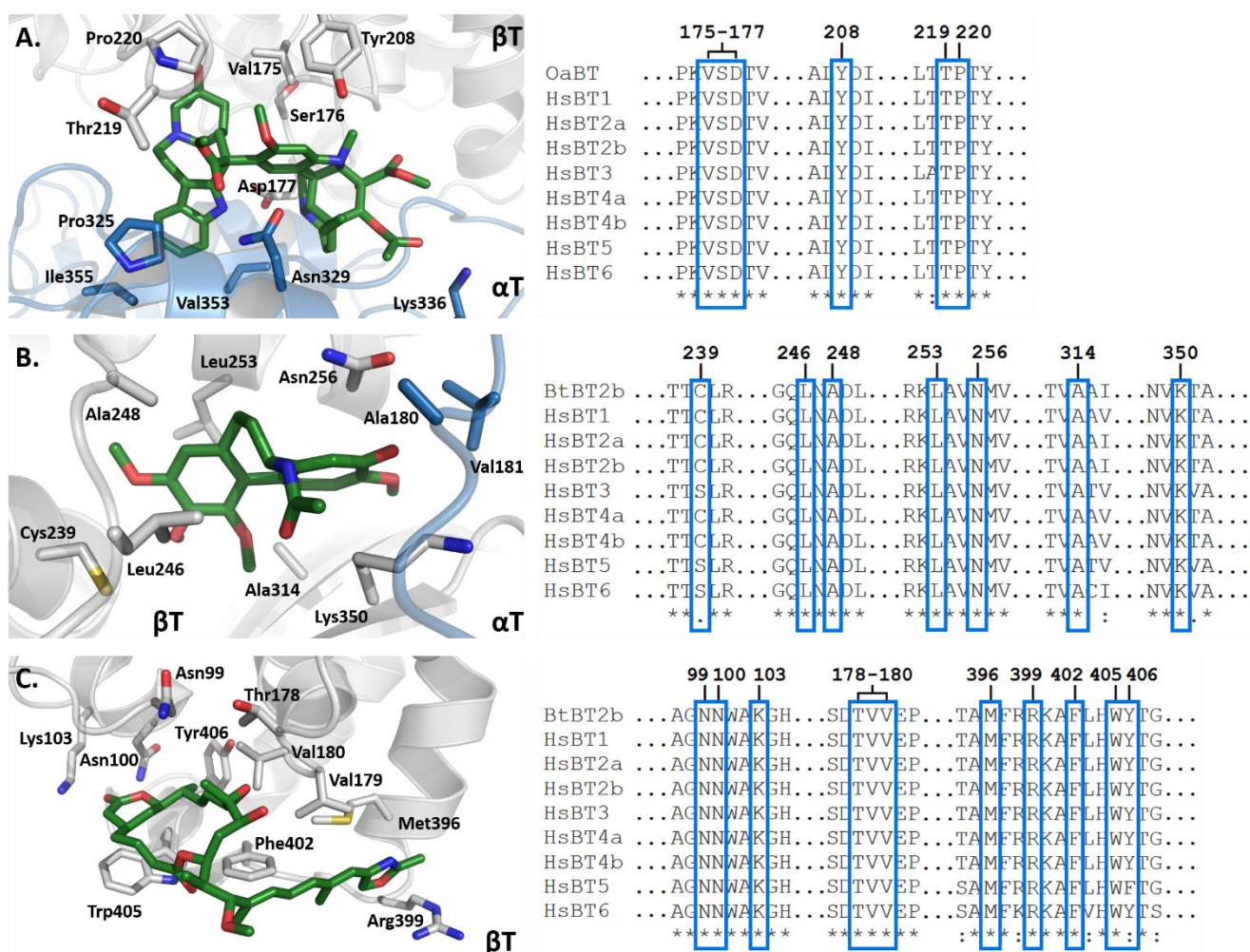


Figura 7.6. Representación del sitio de unión de (A) vinblastina, (B) colchicina y (C) rizoxina F como agentes inhibidores de la polimerización de tubulina co-cristalizados en proteínas de mamífero y comparación de los aminoácidos que componen los sitios de unión en las ocho isoformas de β -tubulina de humano.

En esta figura se puede apreciar que no hay diferencias en los aminoácidos del sitio de unión de la vinblastina en todas las isoformas de humano. En el caso de la colchicina, sólo se registra un cambio en la posición 239 de Cys a Ser en las isoformas HsBT3, HsBT5 y HsBT6; sin embargo, ambos aminoácidos mantienen propiedades muy similares, por lo cual no afectaría una posible interacción como grupo donador de puente de hidrógeno. Finalmente, en el sitio de unión de la rizoxina F, cambia únicamente el aminoácido 406 en HsBT5 de Tyr a Phe, la cual no es una isoforma de interés para este trabajo.

Debido a que no hay un cambio relevante en los aminoácidos que interactúan con estos agentes, el sitio de unión se considera altamente conservado por lo que no es posible diseñar inhibidores selectivos a un tipo de isoforma para los sitios antes mencionados.

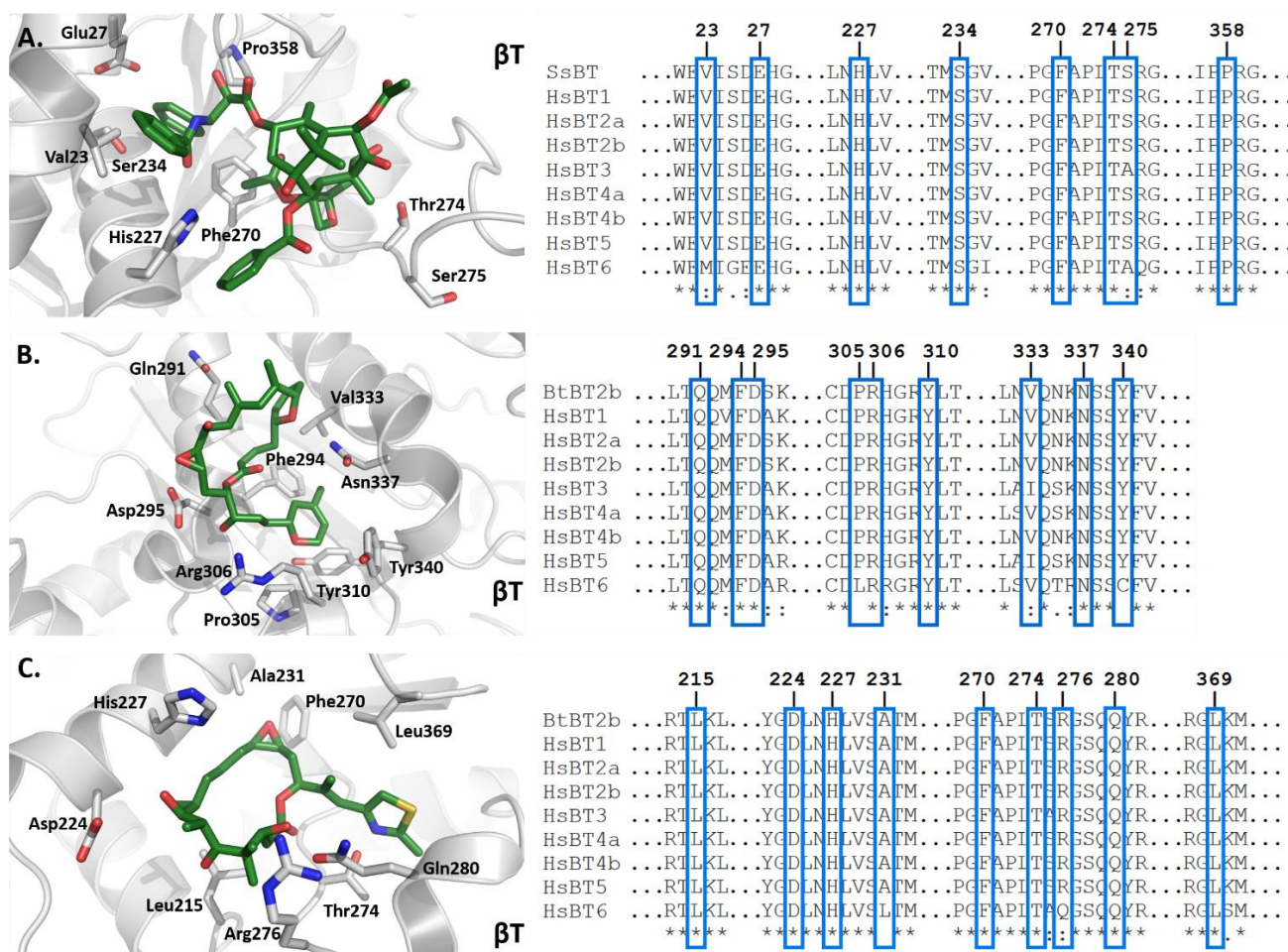


Figura 7.7. Representación del sitio de unión de (A) taxol, (B) laulimalida y (C) epotilona A como agentes estabilizadores de la polimerización de tubulina co-cristalizados en proteínas de mamífero y comparación de los aminoácidos que componen los sitios de unión en las ocho isoformas de β -tubulina de humano.

Los últimos tres sitios de unión de la β -tubulina corresponden a los agentes estabilizadores de la polimerización: taxol, laulimalida y epotilona A; éstos se representan en la Figura 7.7 al igual que la comparación de los aminoácidos que conforman su sitio de unión.

En el sitio de unión del taxol se encuentran dos diferencias; la primera es un cambio de Val por Met en la posición 23 de la HsBT6; sin embargo los aminoácidos son muy similares y podría no perderse la interacción de la Val23 hace contacto hidrofóbico con los anillos fenilo del taxol.¹⁴ El segundo si tiene un efecto sobre la unión del taxol, la Ser275 cambia a Ala en las isoformas HsBT3 y HsBT6. Este residuo es crucial para la unión del taxol, la sustitución de la Ser275 propicia la pérdida de un puente de hidrógeno con la β -tubulina del heterodímero continuo y por ende pierde su función como estabilizador.^{14,18} Por tanto, diseñar derivados de este compuesto que presenten mayor selectividad a HsBT3 para evitar la resistencia causada por la Ala275 no es favorable ya que también se encuentra en HsBT6, por tanto aumentaría el riesgo que las moléculas sean hematotóxicas. Por otro lado, tampoco es conveniente el diseño de fármacos no hematotóxicos empleando la Met23 puesto que no serían selectivos entre ninguna de las otras isoformas.

En cuanto al sitio de unión de la laulimalida, se registra un cambio en el residuo 333 de una Val por una Iso en HsBT3 y HsBT5, ambos aminoácidos son muy similares y no se tienen reportes de que esta conversión esté asociada a una variación en la respuesta a esta molécula. En HsBT6 se observan dos diferencias en este sitio de unión, la primera es en la Leu305, ya que el resto de las isoformas presenta Pro; pero este residuo no es esencial para el acoplamiento de la laulimalida. La otra ocurre en la Tyr340, éste favorece el acoplamiento del ligando al interactuar con la Arg306 y promover un cambio conformacional.^{19,79} En HsBT6, la Tyr340 se encuentra sustituida por una Cys, la cual también puede aportar un donador de puente de hidrógeno. Una vez más, las modificaciones el sitio de unión no confieren mayor afinidad contra las dianas propuestas.

Finalmente, el sitio de unión de la epotilona A es contante en todas las isoformas, excepto en HsBT6, puesto que en ella se distinguen las dos únicas diferencias en los residuos 231 y 276 que son clave para la unión de la epotilona⁸⁰ pero hasta ahora no han sido asociados a mecanismos de resistencia a este fármaco.

A pesar de que la secuencia de β -tubulina de humano está muy conservada, variaciones en el sitio de unión del ligando podrían afectar el acoplamiento del mismo, por eso es importante el análisis de cada uno de ellos. En los sitios de unión de la β -tubulina sólo el taxol pierde su actividad por la sobreexpresión de HsBT3 y su poca afinidad a este sitio. Sin embargo, en el resto de los casos no existen diferencias clave que apoyen la selectividad de un compuesto por un tipo de isoforma en particular. Por tanto, no es factible diseñar moléculas que se unan preferentemente a las isoformas HsBT1 y HsBT3, y al mismo tiempo con baja afinidad por la HsBT6 para ninguno de los seis sitios de unión de los compuestos estudiados.

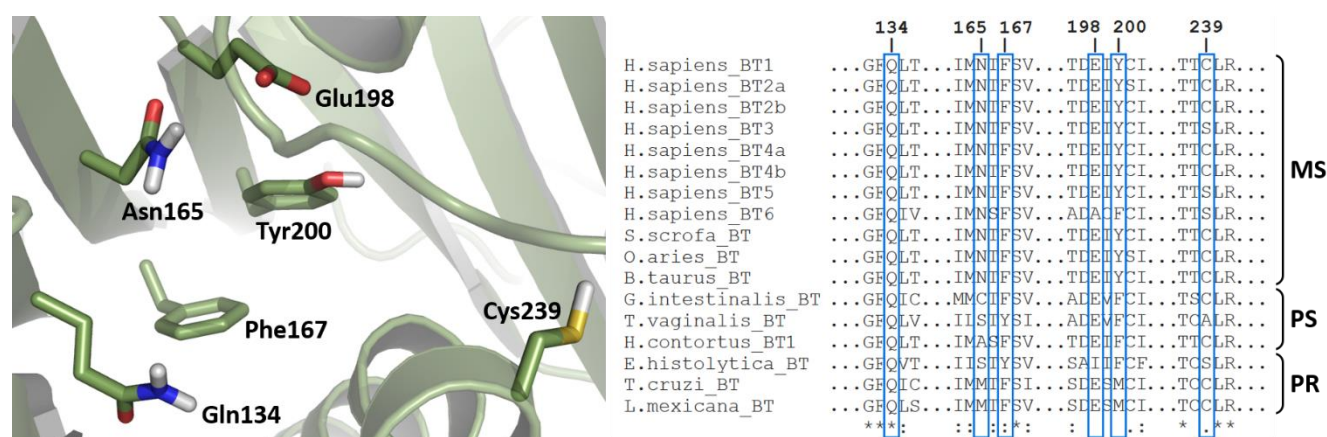


Figura 7.8. Representación y comparación de los aminoácidos que componen al sitio de unión propuesto de los carbamatos bencimidazólicos en las ocho isoformas de β -tubulina de humano y mamíferos (MS), además de parásitos susceptibles (PS) y resistentes (PR) al tratamiento con dichos compuestos.

Por otro lado, adicionalmente se mencionó un posible sitio de unión para los derivados de bencimidazol localizado cerca del sitio de la colchicina en el monómero de la β -tubulina,^{20,21} el cual se muestra en la Figura 7.8 al igual que el alineamiento de los aminoácidos que lo conforman en las isoformas de humano, mamíferos, parásitos susceptibles y resistentes al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos.

Excepto por HsBT6, todas las isoformas de humano y mamífero tienen el sitio de unión muy conservado. El único aminoácido que varía es el 239 de Cys a Ser en HsBT3, HsBT5 y HsBT6, como se observó en el sitio de la colchicina; sin embargo, se mantiene un grupo donador de puente de hidrógeno. Es interesante mencionar que HsBT6 presenta cambios en

las posiciones 198 y 200, las cuales son posiciones importantes para la interacción con estos derivados de bencimidazol, según estudios de resistencia realizados en parásitos.^{20,21}

De esto último, se han descrito mutaciones importantes en la β -tubulina que repercuten en la resistencia y susceptibilidad de parásitos a carbamatos bencimidazólicos. Estas mutaciones son: Phe167Tyr, Glu198Ala y Phe200Tyr.^{78,81-84} Por tanto, si los aminoácidos se conservan en el sitio de unión de las isoformas blanco, HsBT1 y HsBT3, éstas podrían verse afectadas por este tipo de moléculas; en caso contrario, el tratamiento no causaría daño sobre las células que expresen esa isoforma en particular.

Como puede observarse en la Figura 7.8, la HsBT6 posee los residuos Ala198 y Phe200. Aunque solo presenta una de las variaciones que están implicadas en la resistencia, la modificación de Glu a Ala es determinante para que se genere una baja afinidad por los BZC.⁸² Además, esta isoforma muestra mayor similitud con los aminoácidos del posible sitio de unión del parásito resistente *E. histolytica*.

En el caso de HsBT1 y HsBT3 se tiene un residuo de Tyr en la posición 200, lo cual, según los estudios experimentales de resistencia a carbamatos bencimidazólicos en parásitos, indicaría una baja afinidad de los compuestos por el sitio; sin embargo, esta mutación sólo se ha asociado a una disminución en la susceptibilidad pero no causa una resistencia completa, como sucede en el caso de la mutación Glu198Ala.⁸²

Además de los aminoácidos presentados en la Figura 7.8, en el sitio de unión se localizan otros residuos hidrofóbicos (Leu240, Leu250, Leu253 y Phe266) e hidrofílicos (Thr237 y Asn256),²¹ pero están ampliamente conservados (ver Figura III.1.1 del Anexo III). En este estudio no se encontraron grandes diferencias en el sitio de unión de las dianas biológicas, pero sí con HsBT6, a la cual los compuestos propuestos podrían presentar baja afinidad.

7.3.2. Modelado por homología

Para esta sección se siguió la metodología empleada por Aguayo-Ortiz y colaboradores.²¹ En la Tabla 7.9 se resumen los resultados de la validación de los modelos proteicos de las secuencias de aminoácidos de las isoformas de β -tubulina (HsBT1, HsBT3, HsBT6 y SsBT)

generados por homología con el programa MODELLER 9v13, en el cual se empleó como molde la cadena D de la estructura cristalográfica PDB: 3N2G. Los esquemas y gráficos correspondientes de los modelos seleccionados se encuentran en el Anexo III.2.

Tabla 7.9. Resultados de validación de los modelos generados en el estudio

Isoforma	No. Modelo	QMEANscore	Z-score	RMSD (Å)	Ramachandran plot (%)		Error en rotámeros (%)
					P	NP	
HsBT1	A	0.616	-1.78	0.130	96.71	3.29	3.27
	B	0.640	-1.50	0.130	96.71	3.29	3.00
	C	0.627	-1.66	0.133	96.95	3.05	3.27
	D*	0.644	-1.46	0.130	96.95	3.05	2.72
	E	0.598	-1.99	0.138	96.71	3.29	3.54
HsBT3	A	0.642	-1.47	0.126	97.18	2.82	3.26
	B*	0.639	-1.51	0.121	97.18	2.82	2.45
	C	0.611	-1.85	0.126	96.95	3.05	3.80
	D	0.620	-1.74	0.126	97.65	2.35	2.17
	E	0.618	-1.76	0.123	97.18	2.82	3.26
HsBT6	A	0.603	-1.94	0.118	97.18	2.82	3.03
	B	0.629	-1.63	0.122	96.95	3.05	2.48
	C	0.649	-1.39	0.122	96.71	3.29	2.75
	D*	0.638	-1.52	0.120	97.18	2.82	2.75
	E	0.651	-1.37	0.122	97.18	2.82	4.13
SsBT	A*	0.623	-1.69	0.143	97.18	2.82	2.17
	B	0.625	-1.68	0.131	96.95	3.05	3.53
	C	0.618	-1.77	0.148	96.95	3.05	2.45
	D	0.611	-1.84	0.140	96.71	3.29	2.45
	E	0.619	-1.74	0.130	96.71	3.29	2.99

Nota: Regiones del diagrama de Ramachandran: (P) Permitida & (NP) No Permitida.

* Modelos seleccionados.

Los siguientes parámetros de validación fueron determinados por el servidor Swiss Model⁵⁶: QMEAN score, Z-score, diagrama de Ramachandran y porcentaje de error en rotámeros; el RMSD (Å) se calculó con el programa PyMOL⁵⁷. Para la selección de los mejores modelos se emplearon los siguientes criterios:

- Puntuación QMEANscore. Es el valor del grado de confiabilidad del modelo al ser comparado con otras estructuras en una escala que va del 0 al 1, aquellos modelos con un valor más cercano a 1 son los mejores.^{9,79} Los modelos generados tienen valores cercanos a 0.6 para cualquiera de las isoformas.

- Puntuación Z (Z-score). Es una medida de la significancia de una alineación múltiple con otras estructuras conocidas, que representa la calidad del modelo, negativo (baja calidad) o positivo (calidad alta).⁹ Se espera que este valor sea cercano a cero. Los modelos generados resultaron con baja resolución y de ellos se escogieron las estructuras que presentaran uno de los menores valores absolutos.
- Desviación cuadrática media o RMSD (*Root Mean Square Deviation*, Å). Este valor mide el grado de similitud de la estructura tridimensional entre dos proteínas, resulta de la superposición del modelo final con el molde. El RMSD es 0 Å para estructuras idénticas y aumenta conforme las estructuras se vuelven más diferentes, hasta 2.0 Å se considera aceptable.^{9,85} En todos los casos, los modelos tienen valores cercanos a 0.1 Å, pues las isoformas son muy similares entre sí.
- Diagrama de Ramachandran. Gráfico que representa las combinaciones angulares ψ (psi) y ϕ (phi) de todos los aminoácidos que constituyen a una proteína. Dependiendo del tipo de estructura secundaria que estén conformando, los aminoácidos se ubican dentro de un esquema de cuatro cuadrantes.^{9,86} Para los modelos seleccionados la región permitida agrupa más del 95% que corresponden a aquellos aminoácidos cuyas conformaciones angulares están dentro de los parámetros aceptables
- Errores por residuo. Este esquema presenta las regiones de la estructura tridimensional del modelo generado, mediante un gradiente de colores de acuerdo a las variaciones que presente. El gradiente de color va de azul a rojo, dónde las zonas de mayor confianza (RMSD<1.0 Å) son coloreadas de azul y las en rojo representan las regiones de menor confianza (RMSD>3.5 Å).⁹ Los modelos seleccionados presentan un porcentaje de error de residuos menor a 3% y los esquemas se muestran en el Anexo III.2. Las regiones en rojo son se localizan principalmente en asas de la estructura y son regiones pequeñas, mientras que las partes en azul se encuentran en la parte interna de la estructura.

Una vez seleccionados los modelos, se realizó una comparación del posible sitio de unión de los carbamatos bencimidazólicos en las isoformas HsBT1, HsBT3 y HsBT6, los cuales se muestran en la Figura 7.9. En ella se distinguen principalmente las diferencias en los residuos 239, 198 y 200.

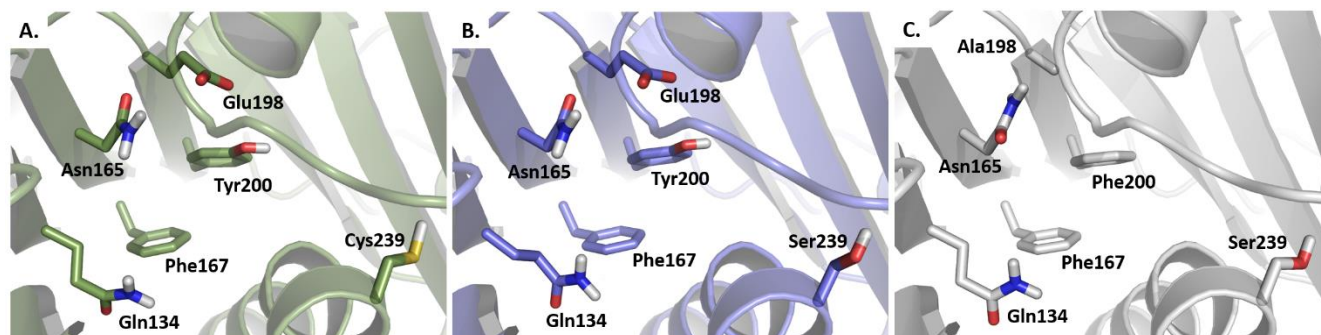


Figura 7.9. Representación de los aminoácidos principales identificados en el posible sitio de unión de los carbamatos bencimidazólicos en las isoformas (A) HsBT1, (B) HsBT3 y (C) HsBT6.

Dado que el modelo generado para la β -tubulina de *S. scrofa* presenta los mismos aminoácidos en el sitio que HsBT1 se decidió utilizar solamente el segundo para realizar los estudios de acoplamiento molecular (ver Figura III.3.1 del Anexo III).

7.3.3. Acoplamiento molecular

Tabla 7.10. Resultados de acoplamiento molecular en los modelos de β -tubulina

Compuesto	HsBT1 / SsBT			HsBT3			HsBT6		
	Conf.	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster	Conf.	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster	Conf.	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster
ABZ	<i>trans</i> -1,5	-7.50	17	<i>trans</i> -1,6	-7.72	17	<i>cis</i> -1,5	-6.72	27
ABZSO(+)	<i>trans</i> -1,5	-7.81	11	<i>cis</i> -1,5	-7.32	17	<i>trans</i> -1,6	-6.88	24
ABZSO(-)	<i>trans</i> -1,5	-7.66	12	<i>trans</i> -1,6	-7.83	24	<i>cis</i> -1,5	-7.10	25
FBZ	<i>trans</i> -1,6	-8.12	17	<i>trans</i> -1,5	-8.51	28	<i>trans</i> -1,5	-7.48	22
FBZSO(+)	<i>trans</i> -1,5	-8.49	22	<i>trans</i> -1,5	-8.71	29	<i>trans</i> -1,5	-8.15	26
FBZSO(-)	<i>trans</i> -1,5	-8.36	22	<i>trans</i> -1,5	-8.70	30	<i>cis</i> -1,5	-7.96	21
MBZ	<i>trans</i> -1,5	-8.71	18	<i>trans</i> -1,6	-8.80	20	<i>trans</i> -1,6	-7.52	27
NZ	<i>trans</i> -1,5	-8.45	24	<i>cis</i> -1,5	-8.05	25	<i>cis</i> -1,6	-7.22	20
PBZ	<i>trans</i> -1,5	-7.37	24	<i>trans</i> -1,6	-7.61	19	<i>trans</i> -1,5	-6.80	27
OBZ	<i>trans</i> -1,5	-6.98	19	<i>trans</i> -1,6	-7.25	22	<i>cis</i> -1,5	-6.39	21
LBZ	<i>trans</i> -1,5	-8.87	20	<i>trans</i> -1,6	-9.45	21	<i>cis</i> -1,6	-7.57	12
WW5a	<i>trans</i> -1,5	-7.97	19	<i>trans</i> -1,6	-8.31	28	<i>cis</i> -1,5	-7.10	25
LCG1	<i>trans</i> -1,5	-9.53	25	<i>trans</i> -1,6	-10.17	30	<i>cis</i> -1,5	-8.16	24
LCG2	<i>trans</i> -1,5	-9.21	24	<i>trans</i> -1,6	-9.72	28	<i>cis</i> -1,5	-8.01	28
LCG3	<i>trans</i> -1,5	-9.55	28	<i>trans</i> -1,6	-9.96	30	<i>cis</i> -1,6	-8.14	17
LCG4	<i>trans</i> -1,5	-9.58	22	<i>trans</i> -1,6	-10.01	25	<i>cis</i> -1,6	-8.22	20
LCG5	<i>trans</i> -1,5	-9.92	24	<i>trans</i> -1,6	-10.46	30	<i>cis</i> -1,6	-8.24	22
LCG6	<i>trans</i> -1,5	-9.89	26	<i>trans</i> -1,6	-9.67	17	<i>trans</i> -1,5	-7.26	13
PBS90	<i>trans</i> -1,5	-8.56	24	<i>trans</i> -1,6	-9.03	20	<i>cis</i> -1,6	-7.65	21

Nota. Conf.: conformación.

Con las estructuras de β -tubulina generadas mediante modelado por homología se realizaron los estudios de acoplamiento molecular en el posible sitio de unión. En la Tabla 7.10 se muestran los resultados de la conformación, energía libre de unión (puntuación o Score) y tamaño de clúster obtenidos en la evaluación de la serie LCG y otros carbamatos bencimidazólicos empleados como referencia. Los datos presentados en un gradiente de colores que va de rojo a verde, los primeros tienen mayor valor de Score, indicando una menor afinidad por el sitio, y en verde se encuentran los de menor valor de energía, mostrando una mayor afinidad. Además, el tamaño de clúster permite determinar la probabilidad de unión de estos compuestos al sitio, en donde un número de integrantes cercano a 30 indica una alta probabilidad.

En las isoformas HsBT1 y HsBT3 la conformación *trans* del carbamato y el isomerismo en 1,5 en el bencimidazol son favorecidos en el acoplamiento, siendo los compuestos de la serie LCG los que tienen menor valor de Score y mayor número de integrantes en el clúster (ver Tabla 7.10). Por otro lado, en HsBT6 los resultados no son consistentes en cuanto a la conformación ni al isomerismo; asimismo, el tamaño de clúster es variado y los valores de Score son los más altos con respecto a las otras dos isoformas.

Estos resultados indican que las moléculas de la serie LCG, seguidos por el LBZ y PBS-90⁶⁴, se acoplarán con mayor afinidad a HsBT1 y HsBT3 que los otros carbamatos bencimidazólicos. Además, debido a que se ha comprobado la actividad antitumoral de los compuestos de referencia, existe mayor probabilidad de que los elementos de la serie LCG sean más activos. Adicionalmente, los resultados obtenidos para HsBT6 aumentan la probabilidad de que ninguno de estos compuestos provoquen hematotoxicidad por la unión a la β -tubulina de células hematopoyéticas.

El modo de unión de los compuestos evaluados a las isoformas de β -tubulina se muestra en la Figura 7.10. Las moléculas se dividieron en dos grupos para facilitar su visualización: serie LCG (Figuras 7.10.A1, B1, C1) y compuestos de referencia (Figuras 7.10.A2, B2, C2). Se observa que el modo en que se acoplan ambos grupos es similar tanto en HsBT1 como en HsBT3, dado que mantienen los puentes de hidrógeno formados por los residuos Glu198 y Tyr200 con el hidrógeno de los grupos bencimidazol y carbamato, respectivamente. Estas

interacciones son favorecidas por la conformación *trans* en el carbamato y el isomerismo en 1,5 en el bencimidazol. En cuanto a HsBT6, los compuestos no se localizan adentro del sitio de unión sugerido pues al tener los residuos Ala198 y Phe200 no establecen los puentes de hidrógeno como ocurre en las otras isoformas.

Por otra parte, se reportó que la Cys239 forma un puente de hidrógeno con el grupo aceptor de puentes de hidrógeno ubicado en la posición 5 del núcleo de bencimidazol²¹ del LBZ, MBZ, NZ, ABZ, ABZSO y OBZ. A pesar de ello, en este estudio no se observó dicha interacción con la Cys239 de HsBT1 y la Ser239 de HsBT3 y HsBT6 debido a que el sustituyente aromático en la serie LCG es voluminoso y por la posición que adopta es imposible que se forme un puente de hidrógeno debido a la distancia entre el residuo y el conector.

Adicionalmente al estudio con las isoformas de humano, se realizó un estudio de acoplamiento molecular de los compuestos LCG, PBS y WW5a en las β -tubulina de los parásitos *G. intestinalis* y *E. histolytica*, en donde el primero es susceptible al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos y el segundo no (ver Figura III.3.2 del Anexo III). Se encontró que los compuestos se acoplan mejor a la GiBT lo cual demuestra que los resultados obtenidos para las isoformas de humano son comparables con las de los parásitos y con los reportados por Aguayo-Ortiz y colaboradores²¹.

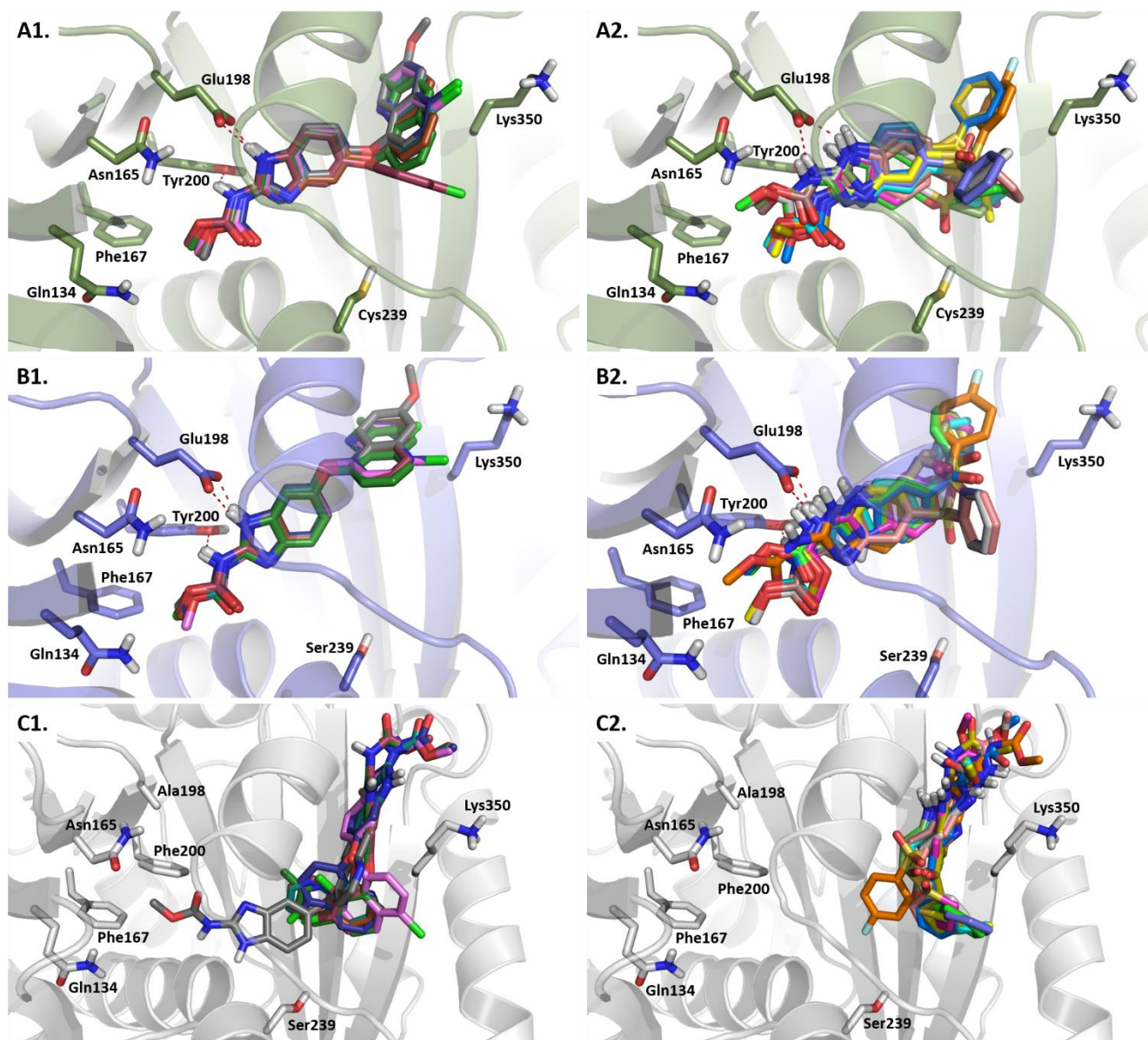


Figura 7.10. Modo de unión de los compuestos sintetizados en las isoformas (A) HsBT1, (B) HsBT3 y (C) HsBT6: en la primera columna, LCG1 (café oscuro), LCG2 (turquesa), LCG3 (verde), LCG4 (lila), LCG5 (morado), LCG6 (gris) y PBS90 (guinda); en comparación con los compuestos de referencia, segunda columna: ABZ (cian), ABZSO(+) (magenta), ABZSO(-) (amarillo), FBZ (rosa), FBZSO(+) (blanco), FBZSO(-) (morado claro), MBZ (azul), NZ (amarillo mostaza), PBZ (café), OBZ (verde claro), LBZ (naranja) y WW5a (verde limón).

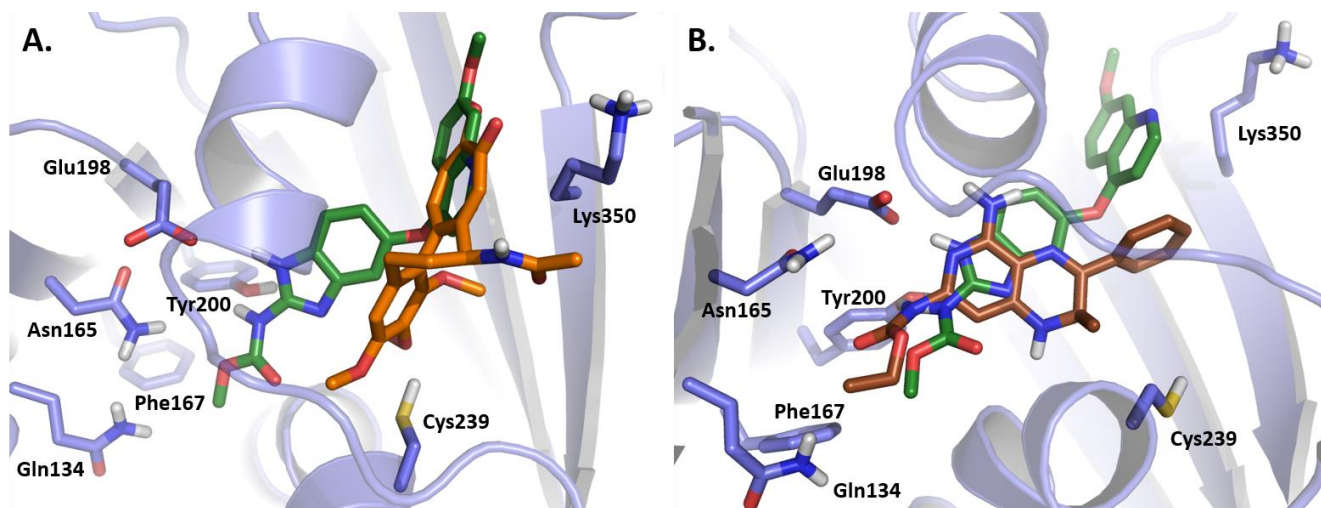


Figura 7.11. Comparación del modo de unión del compuesto LCG6 (verde) con los ligandos co-cristalizados (A) colchicina (naranja, PDB: 1SA0⁸⁷) y (B) G2N (café, PDB: 3N2G⁵⁵).

A pesar de que el sitio de unión sugerido para los carbamatos bencimidazólicos no es el mismo que el de la colchicina, se ha reportado que estos se encuentran superpuestos y experimentalmente se tienen resultados de la inhibición competitiva entre ambos.^{20,21,88} En la Figura 7.11A se muestra la cercanía del sitio de unión de la colchicina y el compuesto LCG6.

Además de la colchicina, se ha co-cristalizado el ligando G2N que tiene un modo de unión semejante al propuesto para la serie LCG; en la Figura 7.11B se representa el modo de unión de LCG6 y G2N en el sitio. El compuesto G2N también interacciona con el Glu198 mediante un puente de hidrógeno con el grupo carbamato de su estructura.

En resumen, los compuestos de serie LCG tienen un acoplamiento similar entre sí y a otros derivados bencimidazólicos en el sitio de unión propuesto en las isoformas HsBT1 y HsBT3 debida a la conservación de los residuos en 198 y 200, principalmente; mientras que en HsBT6 no se favorece su unión por la modificación del Glu por Ala en la posición 198. Este estudio también sugiere que la serie LCG presentará mayor afinidad por la β -tubulina que los utilizados como referencia.

7.3.4. Identificación de otros posibles blancos anticancerígenos

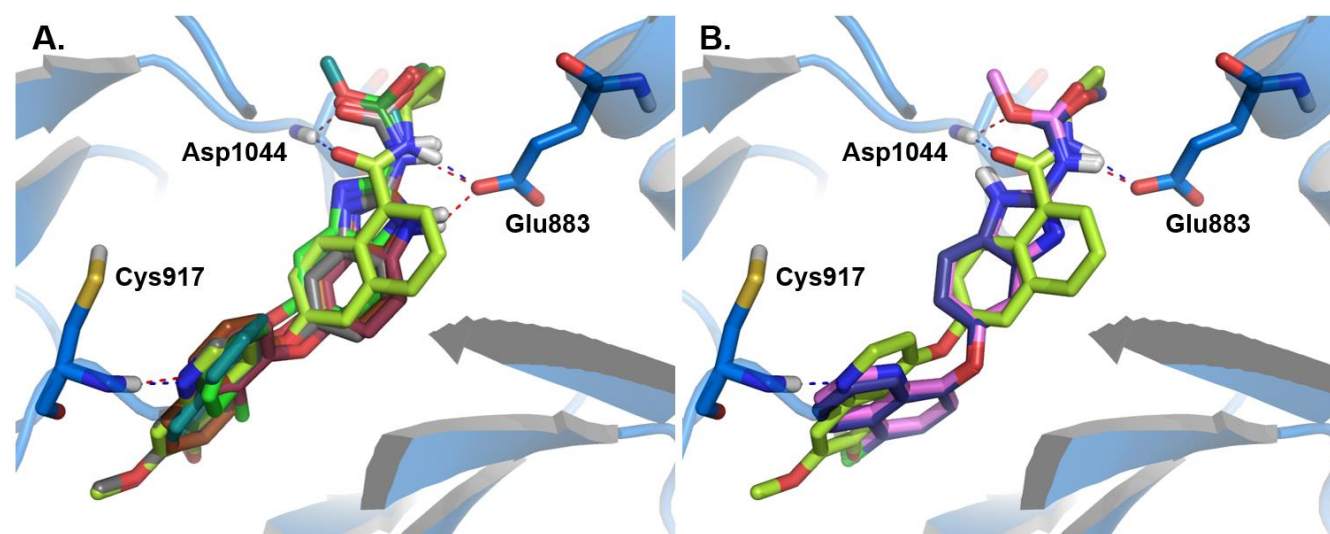
En un estudio de reposicionamiento de compuestos realizado en el trabajo de maestría del M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz⁴⁹, se realizó una búsqueda de otras posibles dianas farmacológicas para una base de datos de derivados bencimidazólicos, dentro de los que se encuentran los compuestos de la serie LCG. Los blancos más interesantes, porque también están involucrados en la regulación de procesos cancerosos son: el factor de transcripción *forkhead box M1* (FOXM1) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2 (VEGFR-2). A continuación se discutirán ambos.

El factor de transcripción *forkhead box M1* (FOXM1) pertenece a la superfamilia de proteínas FOX, que se caracterizan por presentar un dominio de unión al ADN altamente conservado.⁸⁹ Su sobreexpresión está estrechamente involucrada en la iniciación, invasión y metástasis del cáncer, entre ellos de mama, ovario, pulmón y páncreas.^{89,90} Este es un blanco potencialmente adecuado para el desarrollo de terapias contra el cáncer.

En el estudio de acoplamiento molecular, antes se identificó a los compuestos LCG2 y LCG5 entre los derivados de bencimidazol con mayor afinidad a la FOXM1c; siendo el LCG5 uno de los que permanecieron más tiempo en el sitio de unión durante la dinámica molecular, presentó menor energía de unión y uno de los menores valores RMSD. En este estudio se sugiere que esta molécula, entre otras, tiene alta probabilidad de inhibir la actividad transcripcional de la FOXM1c.⁴⁹

En el mismo trabajo, se identificó al receptor VEGFR-2 como posible blanco biológico de los compuestos de la serie LCG.⁴⁹ Este un receptor de tirosina quinasa localizado en la superficie de las células que es activado por el reconocimiento de VEGF; este receptor es el mediador más importante de los efectos mitógenos, supervivencia, angiogénesis y la permeabilidad microvascular del VEGF.^{91,92} De estos procesos, la angiogénesis tiene un papel relevante en el crecimiento, progresión y metástasis del cáncer.^{93,94} Por lo cual el VEGFR-2 es un blanco interesante para el diseño de fármacos que inhiban la angiogénesis tumoral.

Con base en ese estudio, en este trabajo se evaluaron los compuestos LCG, PBS90⁶⁴ y WW5a²³ en receptor VEGFR-2. La Figura 7.12 muestra los resultados del acoplamiento molecular incluyendo los del compuesto referencia 3B8R y del C422⁶³.



Compuesto	Conf.	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster	Compuesto	Conf.	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster
3B8R	-	-12.01	9	LCG4	<i>cis</i> -1,5	-9.68	27
WW5a	<i>trans</i> -1,5	-8.55	25	LCG5	<i>trans</i> -1,5	-10.13	19
LCG1	<i>trans</i> -1,5	-10.25	28	LCG6	<i>trans</i> -1,5	-10.81	29
LCG2	<i>cis</i> -1,5	-9.92	26	PBS90	<i>trans</i> -1,5	-9.63	30
LCG3	<i>trans</i> -1,5	-10.34	27	C422*	<i>trans</i> -1,5	-10.76	9

Figura 7.12. Acoplamiento molecular de los compuestos de la serie LCG, PBS90, WW5a en el sitio de unión de la VEGFR-2 con un modo de unión (A) similar: WW5a (verde limón), LCG1 (café oscuro), LCG2 (turquesa), LCG3 (verde), LCG6 (gris) y PBS90 (guinda), y (B) diferente: LCG4 (lila) y LCG5 (morado) al compuesto co-cristalizado 3B8R (verde claro). Tabla de resultados de acoplamiento molecular de dichos compuestos en VEGFR-2. *Valor tomado de la referencia 49.⁴⁹

De los resultados obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular el ligando co-cristalizado en el receptor, empleado como referencia, presenta menor energía pero menor tamaño de clúster; sin embargo, los de la serie LCG presentan una energía relativamente baja y el mayor número de integrantes en el clúster. El compuesto que destaca es el LCG6 que incluso tiene mejores resultados que el C422, carbamato bencimidazólico encontrado co-cristalizado en el receptor.

Los compuestos con acoplamiento similar al 3B8R se muestran en la figura 7.12.A, estos conservan los puentes de hidrógeno formados entre los grupos carbamato y bencimidazol y el residuo Glu883, además del formado entre carbonilo del carbamato con el Asp1044. El LCG6 establece un puente de hidrógeno adicional entre el nitrógeno del sustituyente quinolina y la cadena principal de Cys917 como sucede con el de referencia. En la Figura 7.12.B se compara el modo de unión del 3B8R con LCG4 y LCG5; pese a que el acoplamiento es diferente se conservan los enlaces formados. Por tanto es importante la presencia de un donador y un aceptor de puentes de hidrógeno para que interaccionen con los residuos Glu883 y Asp1044, respectivamente; asimismo, el acoplamiento se ve favorecido por la presencia de un grupo aceptor de puentes de hidrógeno que interaccione con el carbonilo de la Cys917 en la cadena principal.

Los resultados obtenidos sugieren que es muy probable que las moléculas LCG se unan al receptor VEGFR-2 y puedan modular la actividad de éste. Una razón más para ello es que se ha reportado que el MBZ y otras moléculas con un núcleo de quinolina y uno de bencimidazol inhiben la actividad cinasa de este receptor.^{65,95,96}

Si bien los compuestos LCG no fueron diseñados para que se unieran con gran afinidad al receptor VEGFR-2, sería interesante realizar este ensayo para estudiar las características estructurales que favorezcan su afinidad.

Desarrollar una terapia contra el cáncer que actúe con mayor afinidad sobre un tipo de proteína sobreexpresada, como lo es HsBT1 y HsBT3, disminuye riesgos de toxicidad por unión inespecífica; sin embargo, también pueden aprovecharse las características estructurales de las moléculas para atacar simultáneamente otras dianas biológicas, en este caso FOXM1c y VEGFR-2, de esta manera se podría lograr un tratamiento más efectivo.

8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron los seis derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo con un rendimiento global entre 15-65%. El paso limitante de la reacción es la S_NAr , por lo que se sugiere aumentar el tiempo de reacción o potencia en el microondas. Los compuestos LCG fueron caracterizados por sus constantes físicas (punto de fusión y R_f) y estructuralmente usando métodos espectroscópicos y espectrométricos. De dichos compuestos se cuenta con la cantidad suficiente para la realización de los ensayos biológicos.

Los productos de la serie LCG mostraron pobre solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos comunes por lo que fue difícil su purificación. Además, esta característica podría limitar su evaluación biológica.

Según las predicciones realizadas, se estima que los seis derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo presentarán buena biodisponibilidad oral y baja toxicidad.

Del análisis secuencial y comparación del sitio de unión de seis agentes que modulan la polimerización de los α microtúbulos y cuyo blanco es la β -tubulina, se encontró que estos están muy conservados y por tanto no es posible diseñar compuestos que se sean selectivos hacia las isoformas HsBT1 y HsBT3, y que además no se unan a HsBT6.

Los compuestos de la serie LCG tienen un acoplamiento similar entre sí en el sitio de unión propuesto en las isoformas HsBT1 y HsBT3. El residuo Glu198 es determinante para la afinidad de las isoformas HsBT1 y HsBT3 por los compuestos de la serie LCG, por lo que se espera que muestren mayor afinidad por los blancos y mayor inhibición que los utilizados como referencia.

Se demostró que la unión de los carbamatos bencimidazólicos con la isoforma HsBT6, con una modificación en el residuo198 (Ala por Glu), es semejante a la que presentan estos compuestos con la tubulina de parásitos resistentes a los carbamatos.

Los estudios de acoplamiento molecular en el receptor VEGFR-2 revelaron que los compuestos LCG podrían presentar afinidad por éste, siendo el mejor de ellos el compuesto LCG6. Adicionalmente, existe la probabilidad que posean afinidad por el factor de transcripción FOXM1c.

9. PERSPECTIVAS

Realizar los ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* sobre las líneas celulares SKLU-1, SW48 y MCF-7, asimismo en células hematopoyéticas sanas.

Determinar la CI_{50} de la serie LCG1-LCG6 en las líneas celulares anteriores.

Determinar si los datos obtenidos con los estudios de acoplamiento molecular pueden predecir adecuadamente los resultados de inhibición de la polimerización de los microtúbulos.

Diseñar moléculas que posean mayor afinidad por HsBT1 y HsBT3, aprovechar sus características estructurales para atacar simultáneamente otras dianas biológicas, como la FOXM1 y el VEGFR-2, y lograr un tratamiento más efectivo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Cancer (2015).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [Consultado: enero de **2015**]
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Población, hogares y vivienda.
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484> [Consultado: enero de **2015**]
3. Instituto Nacional de Cancerología. INCan en números.
http://incan-mexico.org/incan/incan.jsp?iu_p=/incan/pub/estatico/direccion//incan-numeros.xml [Consultado: enero de **2015**]
4. Vanneman, M. & Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer.* **2012**, 12: 237–251.
5. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Targeted Cancer Therapies.
<http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet> [Consultado: enero de **2015**]
6. Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K., Soni, R. & Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 87: 89–124.
7. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer.* **2010**, 10: 194–204.
8. Risinger, A. L., Giles, F. J. & Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, 35: 255–261.
9. Aguayo-Ortiz, R. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la beta-tubulina de helmintos y protozoarios. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México, D. F. **2012**.
10. McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. & McCann, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* **2008**, 1785: 96–132.
11. Ferreira, J. G., Pereira, A. L. & Maiato, H. *Microtubule Plus-End Tracking Proteins and Their Roles in Cell Division*. International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc., **2014**, 309.
12. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9: 309–322.
13. Amos, L. a. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, 22: 916–926.

14. Torin Huzil, J., Ludueña, R. F. & Tuszynski, J. Comparative modelling of human β tubulin isotypes and implications for drug binding. *Nanotechnology*. 2006, 17: S90–S100.
15. Gaukroger, K., Hadfield, J. a, Lawrence, N. J., Nolan, S. & McGown, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**,1: 3033–3037.
16. Prota, A. E. *et al.* A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 17: 1–5.
17. Andreopoulou, E. & Muggia, F. Pharmacodynamics of tubulin and tubulin-binding agents: extending their potential beyond taxanes. *Clin. Breast Cancer.* **2008**, 8 Suppl 2: S54–S60.
18. Magnani, M. *et al.* The β I/ β III-tubulin isoforms and their complexes with antimitotic agents: Docking and molecular dynamics studies. *FEBS J.* **2006**, 273: 3301–3310.
19. Prota, A. E. *et al.* Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53: 1621–1625.
20. Aguayo-Ortiz, R. *et al.* Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, 41: 12–19.
21. Aguayo-Ortiz, R. *et al.* Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, 45: 26–37.
22. Yenjerla, M., Cox, C., Wilson, L. & Jordan, M. A. Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 328: 390–398.
23. Wang, W. *et al.* New benzimidazole-2-urea derivatives as tubulin inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2014, 24: 4250–4253.
24. Sasaki, J. *et al.* The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest and Apoptosis by Depolymerizing Tubulin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells 1 Supported in part by grants from the National Cancer Institute and the NIH Specialized Program of Research Excellence in. *Molecular Cancer Therapeutics.* **2002**, 1: 1201–1209.
25. Guan, Q. *et al.* Synthesis and evaluation of benzimidazole carbamates bearing indole moieties for antiproliferative and antitubulin activities. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 87: 306–315.
26. Dogra, N. & Mukhopadhyay, T. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway by methyl N-(6-phenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate leads to a potent cytotoxic effect in tumor cells: A novel antiproliferative agent with a potential therapeutic implication. *J. Biol. Chem.* 2012, 287: 30625–30640.

27. Pourgholami, M. H. *et al.* In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Lett.* **2001**, 165: 43–49.
28. Pourgholami, M. H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y. & Morris, D. L. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: In vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, 55: 425–432.
29. Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R. & Roth, J. a. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8: 2963–2969.
30. Kale, S. S. *et al.* Novel hybrid nocodazole analogues as tubulin polymerization inhibitors and their antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25: 1982-1985.
31. Leandro-García, L. J. *et al.* Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken).* **2010**, 67: 214–223.
32. Tommasi, S. *et al.* Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. *Int. J. Cancer.* **2007**, 120: 2078–2085.
33. Coley, H. M. Mechanisms and consequences of chemotherapy resistance in breast cancer. *Eur. J. Cancer Suppl.* **2009**, 7: 3–7.
34. Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D. & Papadimitriou, C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, 38: 890–903.
35. Wehbe, H., Kearney, C. M. & Pinney, K. G. Combretastatin A-4 resistance in H460 human lung carcinoma demonstrates distinctive alterations in β -tubulin isotype expression. *Anticancer Res.* **2005**, 25: 3865–3870.
36. Sève, P., Reiman, T. & Dumontet, C. The role of β III tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* **2010**, 67: 136–143.
37. Hetland, T. E. *et al.* Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance. *Hum. Pathol.* **2011**, 42: 1019–1026.
38. Hopfinger, a J. Computer-assisted drug design. *J. Med. Chem.* **1985**, 28: 1133–1139.
39. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science.* **2004**, 303: 1813–1818.
40. Ooms, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7: 141–158.

41. Kapetanovic, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemico-biological approach. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 171: 165–176.
42. Veselovsky, A. V & Ivanov, A. S. Strategy of Computer-Aided Drug Design. **2003**, 3: 33–40.
43. Greer, J., Erickson, J. W., Baldwin, J. J. & Varney, M. D. Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **1994**, 37: 1035–1054.
44. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3: 935–949.
45. Waszkowycz, B., Clark, D. E. & Gancia, E. Outstanding challenges in protein-ligand docking and structure-based virtual screening. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, 1: 229–259.
46. Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J. & Corbeil, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 153: S7–S26.
47. Taylor, R. D., Jewsbury, P. J. & Essex, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2002**, 16: 151–166.
48. Sotriffer, C. & Klebe, Gerharkd; Stahl, Martin; Born, H. J. in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. **2003**, capítulo 7: 281–331.
49. Aguayo-Ortiz, R. Análisis quimioinformático y modelado molecular de derivados bencimidazol para la selección eficiente de compuestos giardicidas y reposicionamiento en otras enfermedades. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. México, D. F. **2015**.
50. FAFDrugs3.
<http://fafdrugs3.mti.univ-paris-diderot.fr/> [Consultado: enero de **2015**]
51. Gajewski, M. M., Tuszynski, J. A., Barakat, K., Huzil, J. T. & Klobukowski, M. Interactions of laulimalide, peloruside, and their derivatives with the isoforms of β -tubulin. *Can. J. Chem.* Vol. **2013**, 91 : 1–7.
52. Magrane, M. & Consortium, U. P. UniProt Knowledgebase: A hub of integrated protein data. *Database.* **2011**, 1–13.
53. Dereeper, A. *et al.* Phylogeny . fr: robust phylogenetic analysis for the. **2008**, 36: 465–469.

54. Sali, A. and T. L. B. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **1993**, 779–815.
55. Barbier, P. *et al.* Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285: 31672–31681.
56. Roman A Laskowski, Malcolm W MacArthur, David S Moss, J. M. T. Swiss-Model. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **1993**, 283–291.
<http://swissmodel.expasy.org/>
57. Delano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific LLC. (2007). www.pymol.org [Cosultado: enero de **2015**]
58. Lindorff-Larsen, K. *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2010**, 78: 1950–1958.
59. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26: 1701–1718.
60. Garrett M. Morris, Ruth Huey, William Lindstrom, M. F. S. & Richard K. Belew, David S. Goodsell, A. J. O. Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30: 2785–2791.
61. Schrödinger, L. Schrödinger Release 2014-4: Maestro. (**2014**).
62. Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19: 1639–1662.
63. Melchor Dondel de la Torre, S. P. Síntesis de derivados del Carbendazim y Nicotinamida como compuestos de acción antiparasitaria. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. México, D. F. **2011**.
64. Salgado, P. B. Síntesis y actividad antiparasitaria de análogos del 1H-bencimidazol-2-il-carbamato de metilo. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. México, D. F. **2008**.
65. Hasegawa, M. *et al.* Discovery of novel benzimidazoles as potent inhibitors of TIE-2 and VEGFR-2 tyrosine kinase receptors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50: 4453–4470.
66. Afzal, O. *et al.* A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 1–40.
67. Nien, C. Y. *et al.* 5-Amino-2-Aroylquinolines as highly potent tubulin polymerization inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, 53: 2309–2313.

68. Pérez-Melero, C. *et al.* A new family of quinoline and quinoxaline analogues of combretastatins. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, 14: 3771–3774.
69. Petrillo, G. *et al.* Design, synthesis, and in vitro evaluation of new naphthylnitrobutadienes with potential antiproliferative activity: Toward a structure/activity correlation. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, 16: 240–247.
70. Shreder, K. R. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of (1-halo-2-naphthyl) carbamate-based inhibitors of KIAA1363 (NCEH1/AADACL1). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, 22: 5748–5751.
71. Salum, L. B. *et al.* N-(1'-naphthyl)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide as microtubule destabilizer: synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and in vivo activity against acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 96: 504–518.
72. Lipinski, C. a, Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46: 3–26.
73. Egan, W. J., Merz, K. M. & Baldwin, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, 43: 3867–3877.
74. Veber, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45: 2615–2623.
75. Gleeson, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J. Med. Chem.* **2008**, 51: 817–834.
76. Hughes, J. D. *et al.* Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, 18: 4872–4875.
77. Cytoskeleton. Tubulin Polymerization Assay Kit Manual (CDS03 and BK006). in *Tubulin Polymerization Assay Kit* 1–18 (2009).
<http://www.cytoskeleton.com/> [Consultado: enero de **2015**]
78. Katiyar, S. K., Gordon, V. R., Mclaughlin, G. L. & Edlind, T. D. Antiprotozoal Activities of Benzimidazoles and Correlations with 13-Tubulin Sequence. **1994**, 38: 2086–2090.
79. Bennett, M. J., Barakat, K., Huzil, J. T., Tuszynski, J. & Schriemer, D. C. Discovery and characterization of the laulimalide-microtubule binding mode by mass shift perturbation mapping. *Chem. Biol.* **2010**, 17: 725–734.
80. Huzil, J. T. *et al.* A Unique Mode of Microtubule Stabilization Induced by Peloruside A. *J. Mol. Biol.* **2008**, 378: 1016–1030.

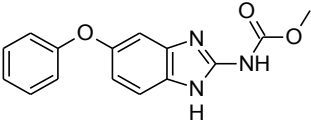
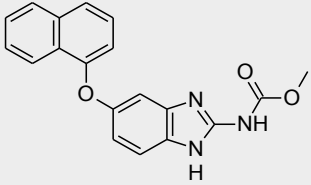
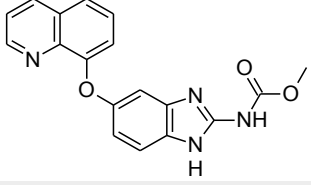
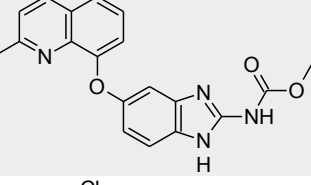
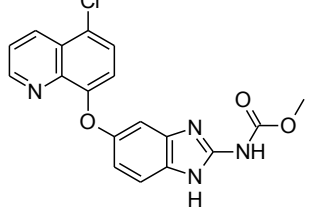
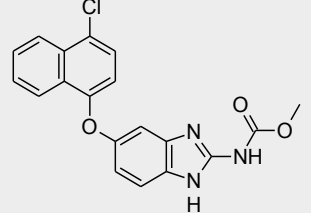
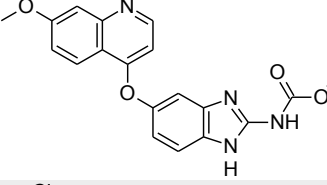
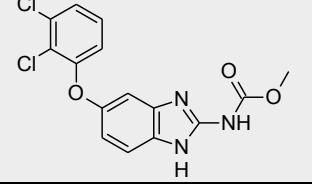
81. Kwa, M. S. G., Veenstra, J. G. & Roos, M. H. *r e s i s t a n c e* in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. **1994**, 63: 299–303.
82. Kotze, A. C. *et al.* International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol. DRUGS DRUG Resist.* **2012**, 2: 92–97.
83. Rufener, L., Kaminsky, R. & Mäser, P. Molecular & Biochemical Parasitology In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of β -tubulin. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2009. 168: 120–122.
84. Silvestre, A. & Cabaret, J. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, 120: 297–300.
85. Carugo, O. & Pongor, S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci.* **2001**, 10: 1470–1473.
86. Ramakrishnan, C., Ramakrishnan, C., Ramachandran, G. N. & Ramachandran, G. N. Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain ConformationsII. Allowed Conformations for a Pair of Peptide Units. *Biophys. J.* **1965**, 5: 909–933.
87. Ravelli, R. B.G. *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. Letters To Nature. *Nature.* **2004**, 428: 198–202.
88. Nguyen, T. L. *et al.* A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **2005**, 48: 6107–6116.
89. Myatt, S. S. & Lam, E. W.-F. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2007**, 7: 847–859.
90. Cui, J. *et al.* Expression and Selection of Human Foxm1c Binding Peptides and Their Inhibitions on MCF7 Cancer Cells. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2014, 20: 447–456.
91. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* **2004**, 25: 581–611.
92. Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M. & Cross, M. J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* **2007**, 19: 2003–2012.
93. Youssoufian, H., Hicklin, D. J. & Rowinsky, E. K. Review: Monoclonal antibodies to the vascular endothelial growth factor receptor-2 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13: 5544–5549.

94. Sullivan, L. a. & Brekken, R. a. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *MAbs*. **2010**, 2: 165–175.
95. Bai, R.-Y., Staedtke, V., Rudin, C. M., Bunz, F. & Riggins, G. J. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro. Oncol.* **2014**, 17: 545–554.
96. Shi, L., Wu, T. T., Wang, Z., Xue, J. Y. & Xu, Y. G. Discovery of N-(2-phenyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)quinolin-4-amine derivatives as novel VEGFR-2 kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84: 698–707.

ANEXO I. DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL-2-CARBAMATO DE METILO

Tabla I.1. Derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo

Compuesto	Clave	Estructura
Albendazol	ABZ	
Sulfóxido de albendazol (+)	ABZSO(+)	
Sulfóxido de albendazol (-)	ABZSO(-)	
Fenbendazol	FBZ	
Sulfóxido de fenbendazol (+)	FBZSO(+)	
Sulfóxido de fenbendazol (-)	FBZSO(-)	
Mebendazol	MBZ	
Nocodazol	NZ	
Parbendazol	PBZ	
Oxibendazol	OBZ	
Luxabendazol	LBZ	

<i>N</i> -[5-fenoxi-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	WW5a	
<i>N</i> -[5-(naftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG1	
<i>N</i> -[5-(quinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG2	
<i>N</i> -[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG3	
<i>N</i> -[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG4	
<i>N</i> -[5-(4-cloronaftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG5	
<i>N</i> -[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG6	
<i>N</i> -[5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo ¹	PBS90	

ANEXO II. PARTE QUÍMICA

II.1. Metodología experimental

II.1.1. Instrumentación

El peso de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius AA210P, o bien, en una balanza granataria Scientech SL 600.

Las reacciones a temperatura constante se realizaron en una parrilla IKA RET básica con sensor de temperatura modelo IKA ETS-D4 fuzzy.

La concentración de las soluciones se realizó a presión reducida en un rotaevaporador Büchi R-215 con condensador vertical lleno de líquido refrigerante de automóvil y baño B-491. La condensación de los vapores se realizó por enfriamiento del líquido refrigerante con un enfriador en serpentín. Se utilizó una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 610 con regulador de vacío integrado CVC2 para disminuir la presión del Sistema (hasta 1 mmHg).

Las reacciones en microondas se realizaron en un equipo Microwave Synthesis System: Synthos 3000 de Aton Paar, usando el rotor 16MF100. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de plástico revestidos de PTFE con un volumen máximo de 50 mL y 20 bares de presión, chaquetas individuales de PEEK y sensor interno de temperatura y presión.

Las hidrogenaciones catalíticas se realizaron en un aparato de hidrogenación Parr Modelo 3916 EG y 250 cc como máxima capacidad, utilizando un tanque de hidrógeno de la casa INFRA y como catalizador Pd/C (al 10%) o Ni-Raney (al 30%), ambos de la casa Aldrich.

El avance de las reacciones y pureza de los compuestos sintetizados se analizó por cromatografía en capa fina (ccf) empleando cromatoplasmas de la casa Merck recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta. La composición del Sistema de elusión I empleado es CHCl₃:MeOH (80:20).

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un equipo Büchi Modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.

Las técnicas espectroscópicas y espectrométricas para la caracterización de los compuestos se realizaron con los equipos pertenecientes a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono (RMN ^1H y RMN ^{13}C) se obtuvieron en un espectrómetro Oxford de 400 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (Me_4Si , $\delta=0$) en DMSO-d_6 y los valores de J en Hz.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de FTIR / FIR spectrum 400, la frecuencia de las señales se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de masas se determinaron en los espectrómetros JEOL JMS-SX102A utilizándose las técnicas de introducción directa (ID) e impacto electrónico (IE) y/o bombardeo de rápido de átomos (FAB^+ por sus siglas en inglés). La simbología utilizada es M^+ = ion molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base. Los espectros de masas de los compuestos LCG4 y LCG6 fueron obtenidos en el equipo The MStation JMS-700, del Instituto de Química, UNAM utilizando utilizándose las técnicas de ID y FAB^+ .

II.1.2. Reactivos, disolventes y procedimientos generales

La serie de compuestos LCG se sintetizaron en el laboratorio a partir 5-cloro-2-nitroacetanilida y los naftoles y quinoles adecuadamente sustituidos comerciales (Aldrich), vía sustitución, hidrólisis, reducción y ciclación. A continuación se ilustra los procedimientos de síntesis detallados.

II.1.2.1. Procedimiento general para la Sustitución Nucleofílica Aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$)

En un tubo de plástico revestido de PTFE para reacción en microondas se colocaron 2.0 g de 5-cloro-2-nitroacetanilina (0.00932 mol), 1.1 eq (0.01398 mol) del correspondiente fenol o quinol (ArOH) y 1.48 g (0.01398 mol, 1.5 eq) de base Na_2CO_3 en 10 mL de DMF, las condiciones de reacción del sistema se programaron a 190 °C y 600 Watts durante 30 minutos con agitación constante; también se colocaron tres tubos de microondas con 50 mL de DMF como blanco. Posteriormente, la mezcla de reacción se transfirió a un matraz bola

de 100 mL y se llevó a sequedad en el rotaevaporador. A la resina obtenida se le adicionaron 30 mL de agua y 0.5 g de Na_2CO_3 y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se filtró al vacío y se recuperó la parte sólida correspondiente a la 2-nitroacetanilina sustituida en la posición 5 con el Aril éter correspondiente.

II.1.2.2. Procedimiento general para la hidrólisis básica

En un matraz de 50 mL se colocó 2-nitroacetanilida sustituida cruda obtenida de la reacción previa, y se sometió a hidrólisis básica con 1.5 eq de NaOH en 15 mL de MeOH durante dos horas a temperatura ambiente y con agitación constante. La mezcla de reacción se filtró al vacío y se recuperó la fracción sólida, la cual se lavó con MeOH (2 x 5 mL).

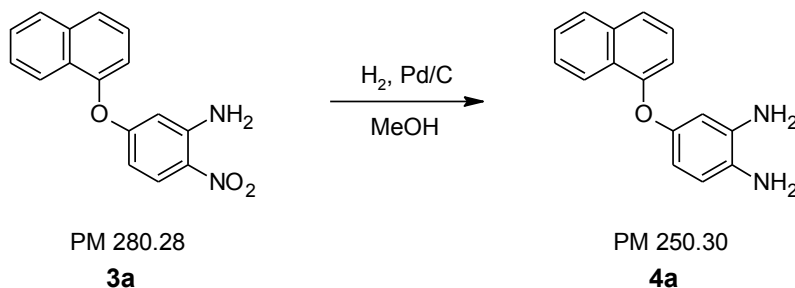
II.1.2.3. Procedimiento general para la reducción catalítica

En una botella de hidrogenación de 500 mL se mezclaron 0.00466 mol del compuesto nitrado, un catalizador (Pd/C al 10% o Ni-Raney al 30% en peso para los compuestos que presentaban átomos de cloro en su estructura) y 50 mL de MeOH. La botella se colocó en el sistema de hidrogenación y se purgó el aire presente mediante tres lavados de aproximadamente 30 lb/in² de hidrógeno, finalmente se llenó el recipiente con hidrógeno hasta una presión de 40 lb/in² y se colocó en agitación constante a 40°C hasta que no hubo más consumo de H₂. El catalizador se retiró por filtración al vacío a través de una cama de celita; el filtrado se transfirió a un matraz bola de 250 mL para eliminar el disolvente en el rotaevaporador, obteniéndose la *o*-fenilendiamina sustituida.

II.1.2.4. Procedimiento general para la ciclocondensación

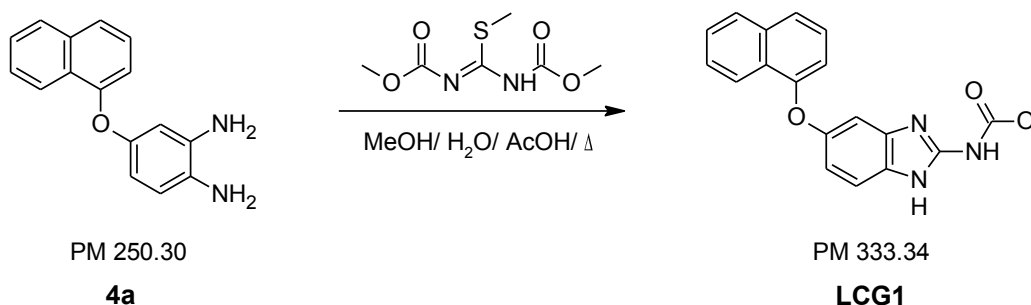
En un matraz bola de 250 mL adaptado con un refrigerante en posición de reflujo, conectado a trampas de cloro y agitación magnética, se mezclaron 0.00466 mol de la *o*-fenilendiamina sustituida con 1.44 g (0.00699 mol, 1.5 eq) de *N,N*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea en 7.8 mL de agua, 23.5 mL de MeOH y 1.5 mL de ácido acético glacial como catalizador ácido. La mezcla se calentó a 70 °C hasta agotarse la materia prima. A partir de los 30 min se observó la formación de un precipitado. El producto obtenido se separó por filtración al vacío. Por

II.1.2.7. 4-(Naftilen-1-iloxi)-1,2-fenilendiamina (4a)

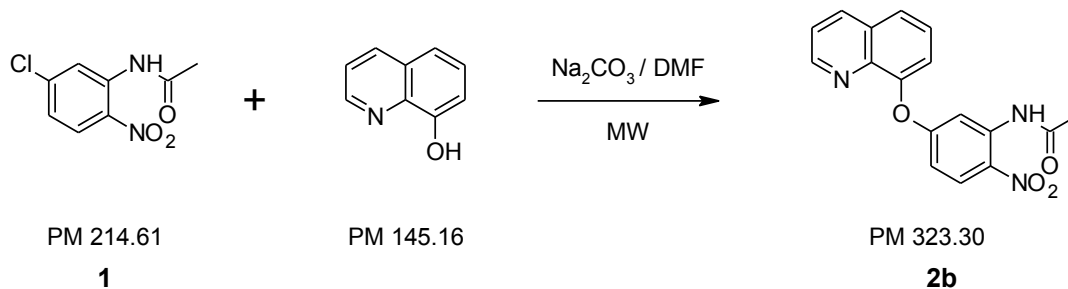


Siguiendo la metodología II.1.2.3 se sintetizó la *o*-fenilendiamina sustituida (**4a**), utilizando como catalizador 0.13 g de Pd/C (10% del peso del sustrato). El término de la reacción se determinó por medio de una ccf hasta que solo se evidenció una mancha (Rf= 0.11, Sistema I), se obtuvo una solución café que se concentró, tras retirarse el catalizador e inmediatamente se utilizó en la siguiente reacción.

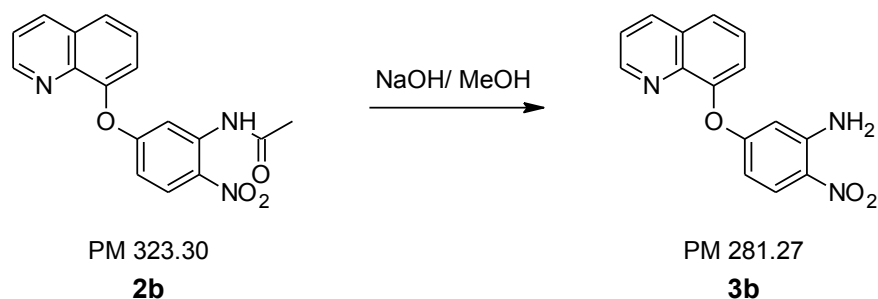
II.1.2.8. *N*-[5-(naftilen-1-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG1)



Para la obtención del producto final **LCG1** se siguió la metodología II.1.2.4; de esta reacción y la anterior, se obtuvo un rendimiento de 80.0%. En ccf el carbamato bencimidazólico, sólido blanco, mostró solo una mancha de Rf= 0.70 en el Sistema I.

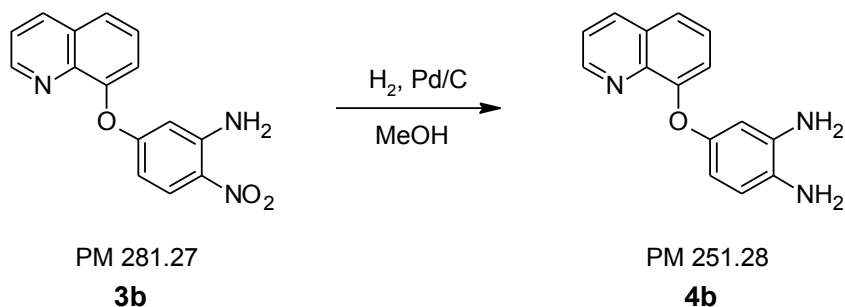
II.1.2.9. 5-(Quinolin-8-iloxi)-2-nitroacetanilina (**2b**)

Se siguió la metodología II.1.2.1 para la obtención de 2-nitroacetanilina sustituida (**2b**). De esta reacción se obtuvo un sólido amarillo, que no se aisló y se sometió a la siguiente reacción enseguida; por ccf: $R_f = 0.79$, Sistema I.

II.1.2.10. 5-(Quinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3b**)

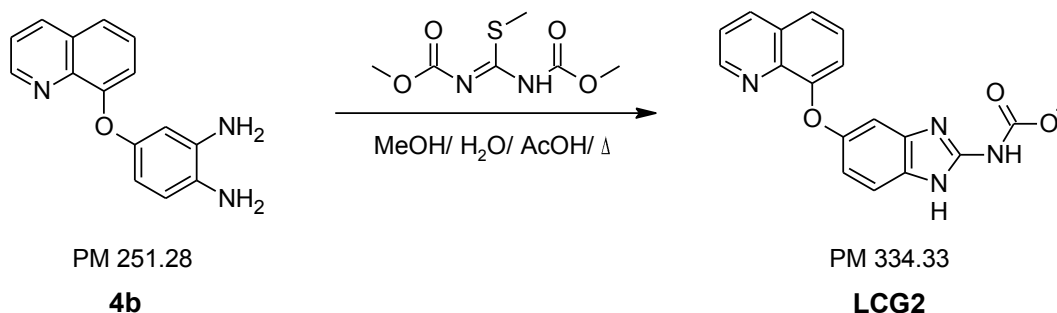
Para la obtención de la 2-nitroanilina sustituida (**3b**) se siguió la metodología II.1.2.2 partiendo de 2.56 g del compuesto **2b** y se obtuvieron 1.56 g (59.5%) de un sólido color mostaza que fue purificado por lavados con MeOH. En la ccf solo se observó una mancha cuyo R_f es 0.67, Sistema I.

II.1.2.11. 4-(Quinolin-8-iloxi)-1,2-fenilendiamina (**4b**)

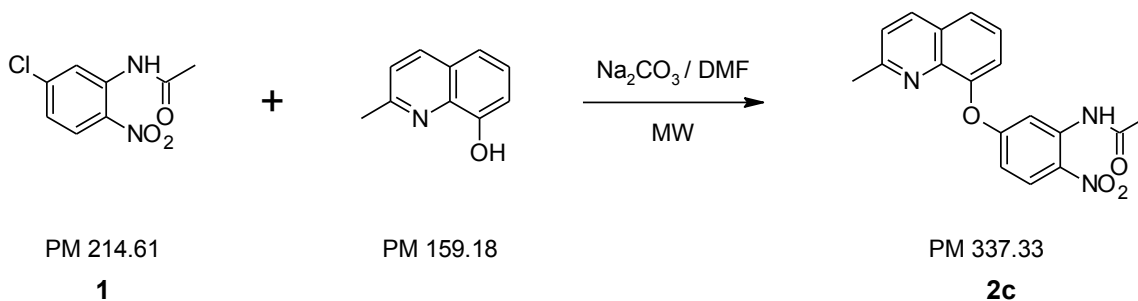


Partiendo del compuesto nitrado **3b** se sintetizó la *o*-fenilendiamina sustituida (**4b**) empleando la metodología II.1.2.3. Se utilizaron 0.13 g del catalizador de Pd/C (10% del peso del sustrato). Al finalizar la reacción se obtuvo una solución café, una sola mancha por ccf (Rf=0.08, Sistema I); después de retirar el catalizador, la solución se concentró para proseguir con la siguiente reacción sin más tratamiento.

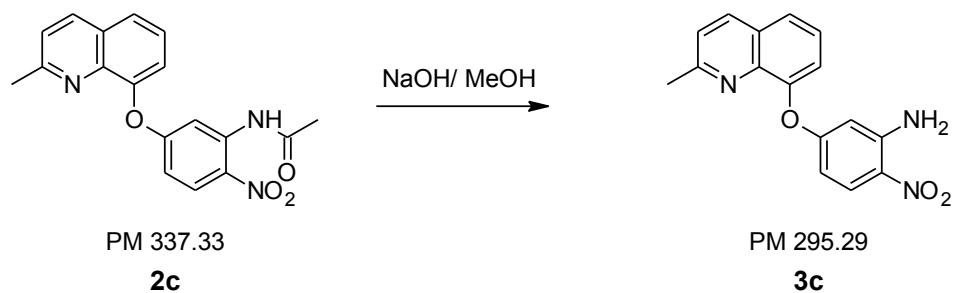
II.1.2.12. *N*-[5-(quinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG2**)



Para la síntesis del carbamato bencimidazólico **LCG2** se siguió la metodología II.1.2.4 obteniéndose un rendimiento de 73.0%; para purificarlo se modificó la metodología cambiando a lavados con MeOH-DMF en una proporción 99:1. El producto final, sólido blanco, mostró solo una mancha en ccf (Rf= 0.63, Sistema I).

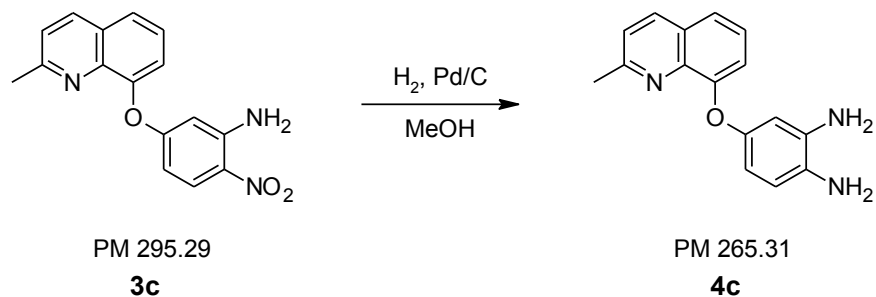
II.1.2.13. 5-(2-Metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroacetanilina (2c)

Utilizando la metodología **II.1.2.1** para la síntesis de 2-nitroacetanilina sustituida (**2c**). De esta reacción se obtuvo un sólido café, que no se aisló y se sometió a la siguiente reacción enseguida; por ccf: Rf= 0.81, Sistema I.

II.1.2.14. 5-(2-Metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (3c)

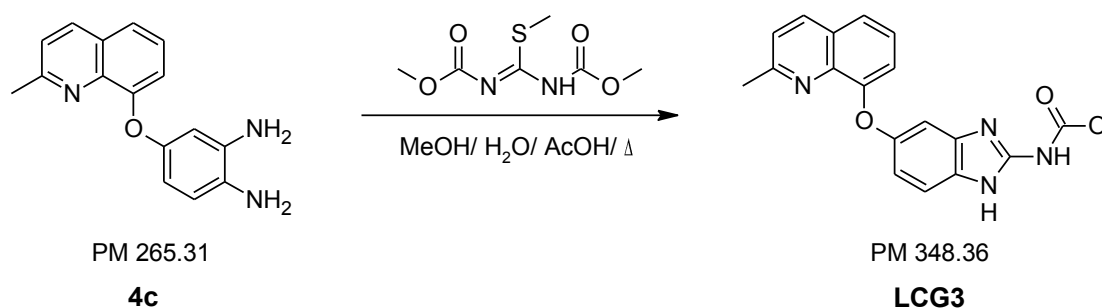
Para la obtención de la 2-nitroanilina sustituida (**3c**) se siguió la metodología **II.1.2.2** y se obtuvieron 1.11 g (40.3%) de un sólido color amarillo que fue purificado por lavados con MeOH. En la ccf solo se observó una mancha (Rf= 0.77, Sistema I).

II.1.2.15. 4-(2-Metilquinolin-8-iloxi)-1,2-fenilendiamina (**4c**)



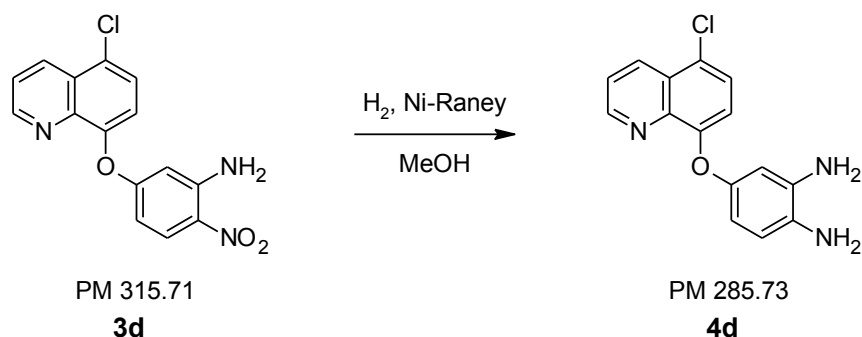
Siguiendo la metodología **II.1.2.3** se sintetizó la *o*-fenilendiamina sustituida (**4c**), utilizando como catalizador 0.13 g de Pd/C (10% del peso del sustrato). El término de la reacción se determinó por medio de una ccf hasta que solo se evidenció una mancha ($R_f = 0.11$, Sistema I), se obtuvo una solución café que se concentró tras retirarse el catalizador y se continuó con la siguiente reacción.

II.1.2.16. *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG3**)



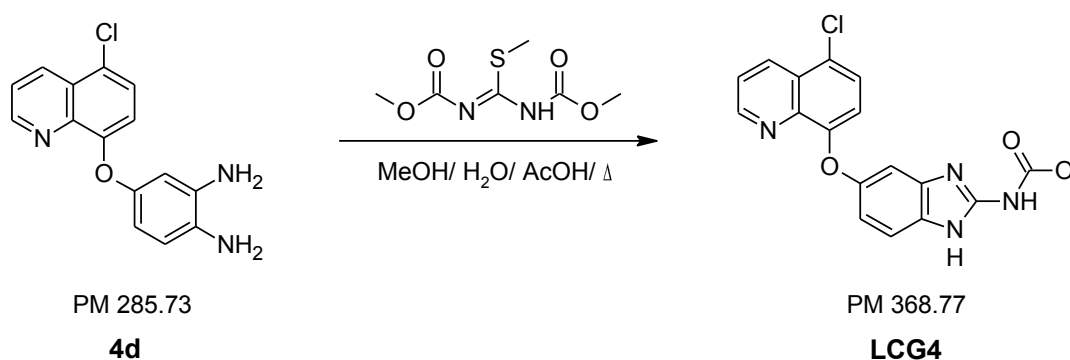
Partiendo de la *o*-fenilendiamina sustituida **4c** se siguió la metodología **II.1.2.4** para la obtención del producto final **LCG3**; el rendimiento de la reacción fue de 94.0%. En ccf el carbamato bencimidazólico, sólido blanco, mostró solo una mancha de $R_f = 0.66$ en el Sistema I.

II.1.2.19. 4-(5-Cloroquinolin-8-iloxi)-1,2-fenilendiamina (**4d**)

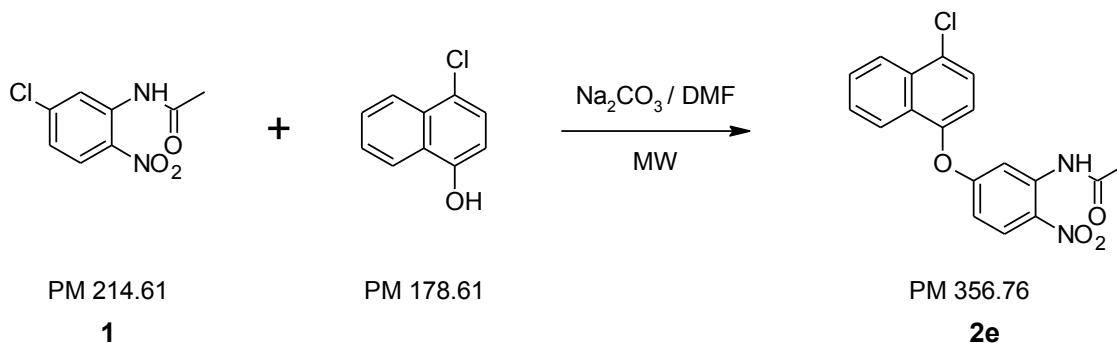


Para la obtención de la *o*-fenilendiamina sustituida **4d** se siguió la metodología **II.1.2.3** realizando las siguientes modificaciones: se utilizó una mezcla de disolventes MeOH-AcOEt en una proporción 80:20 como medio de reacción y en la filtración del producto MeOH caliente; se empleó Ni-Raney 30% (0.44 g) como catalizador. El término de la reacción se determinó por medio de una ccf hasta que solo se evidenció una mancha ($R_f=0.10$, Sistema I), se obtuvo un sólido café se utilizó en la siguiente reacción después de retirarse el catalizador y eliminar el disolvente.

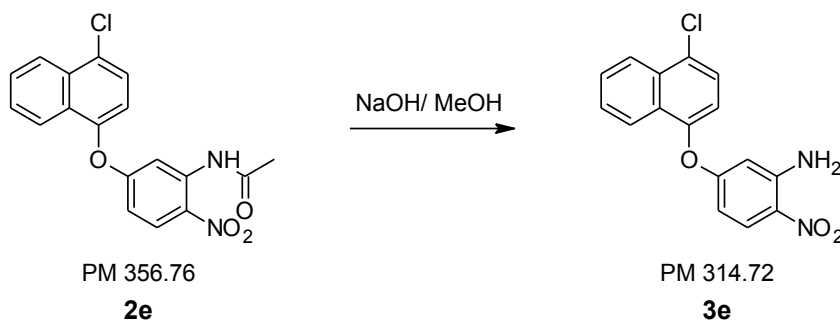
II.1.2.20. *N*-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG4**)



Se utilizó la metodología **II.1.2.4**, partiendo de la *o*-fenilendiamina sustituida **4d**, para la síntesis del carbamato bencimidazólico **LCG4**; el rendimiento de la reacción fue de 50.0%. Se realizaron cuatro lavados del producto con MeOH-DMF (99:1) y se obtuvo un sólido café que mostró solo una mancha en ccf ($R_f= 0.68$, Sistema I).

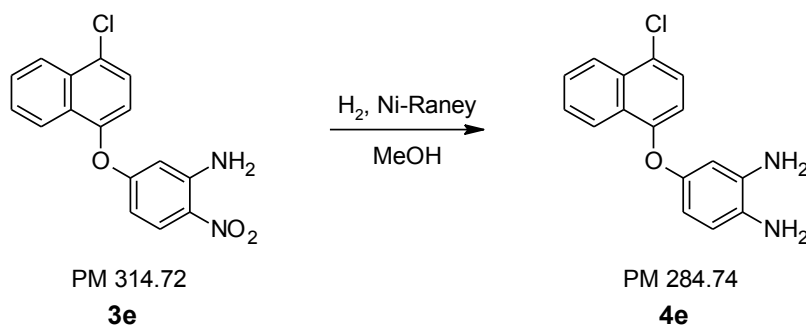
II.1.2.21. 5-(4-Cloronaftilen-1-iloxi)-2-nitroacetanilina (2e)

Para la obtención de la 2-nitroacetanilina sustituida **2e** se empleó la metodología II.1.2.1. De la reacción se llegó sólido amarillo, que no se aisló y se sometió inmediatamente a la siguiente reacción; por ccf: Rf= 0.82, Sistema I.

II.1.2.22. 5-(4-Cloronaftilen-1-iloxi)-2-nitroanilina (3e)

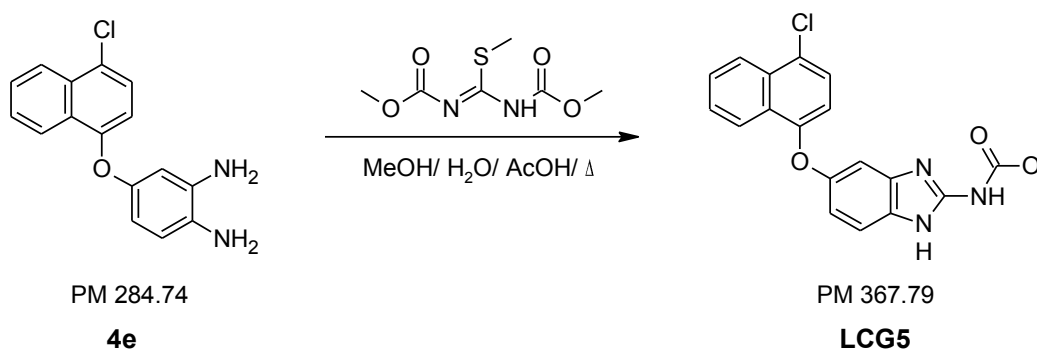
Utilizando el producto de la reacción anterior, se siguió la metodología II.1.2.2 para sintetizar la 2-nitroanilina sustituida (**3e**) y se obtuvieron 2.19 g (74.5%), sólido amarillo, que se purificó por lavados con MeOH y en la ccf solo se observó una mancha (Rf=0.78, Sistema I).

II.1.2.23. 4-(4-Cloronaftilen-1-iloxi)-1,2-fenilendiamina (**4e**)



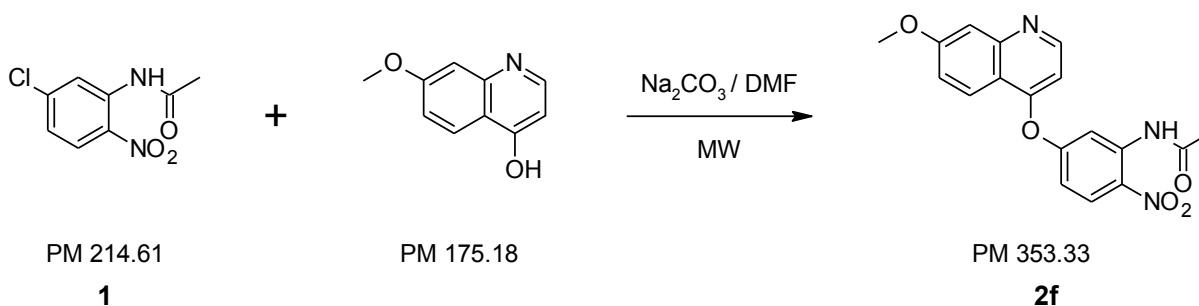
Se siguió la metodología **II.1.2.3** para la obtención de la *o*-fenilendiamina sustituida **4e**; como catalizador se usó Ni-Raney 30% (0.44 g). Al finalizar la reacción se observó una mancha por ccf (Rf=0.11, Sistema I). La solución café se filtró para retirar el catalizador y concentró, inmediatamente se sometió a la siguiente reacción.

II.1.2.24. *N*-[5-(4-cloronaftilen-1-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG5**)



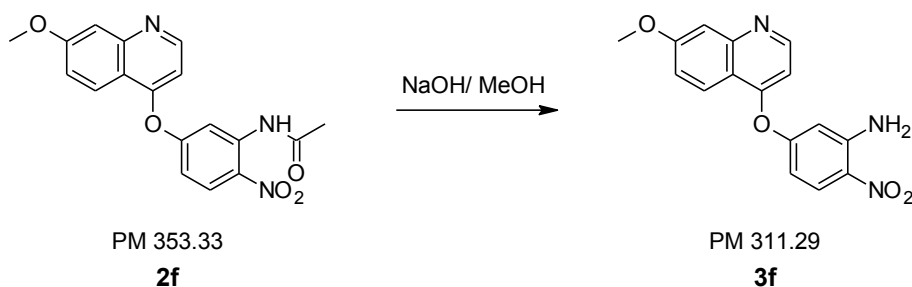
Partiendo de la *o*-fenilendiamina sustituida **4e** y siguiendo la metodología **II.1.2.4** se obtuvo el carbamato bencimidazólico **LCG5**; el rendimiento de la reacción fue de 81.7%. El sólido café claro se purificó por lavados con MeOH y mostró solo una mancha en ccf (Rf= 0.72, Sistema I).

II.1.2.25. 5-(7-Metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroacetanilina (2f)



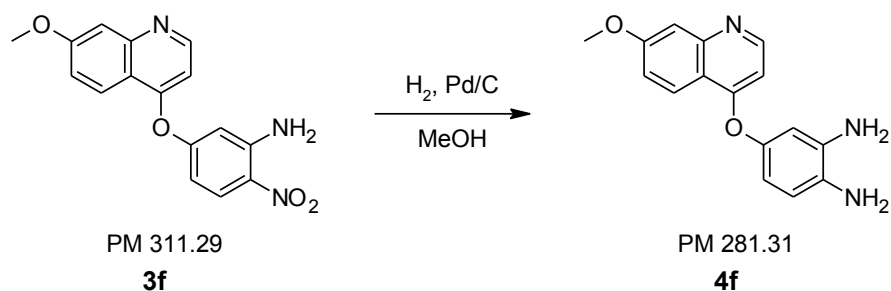
Para la síntesis de la 2-nitroacetanilina sustituida **2f** se siguió la metodología II.1.2.1. En la reacción se obtuvo un sólido amarillo que no se aisló y se sometió directamente a la siguiente reacción; por ccf: Rf= 0.63, Sistema I.

II.1.2.26. 5-(7-Metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroanilina (3f)



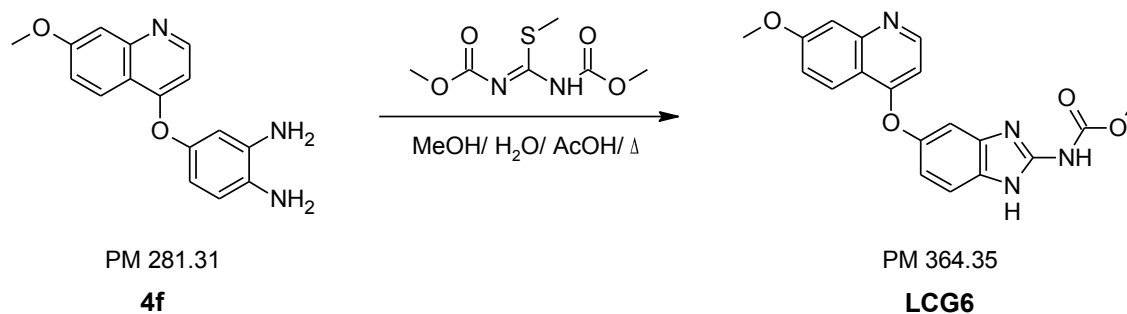
Utilizando el producto de la reacción anterior, se llegó a la 2-nitroanilina sustituida **3f** siguiendo la metodología II.1.2.2. De la reacción se obtuvieron 0.62 g (21.5%), sólido amarillo, que fue purificado por lavados con MeOH. La ccf evidenció solo una mancha (Rf=0.49, Sistema I).

II.1.2.27. 4-(7-Metoxiquinolin-4-iloxi)-1,2-fenilendiamina (**4f**)



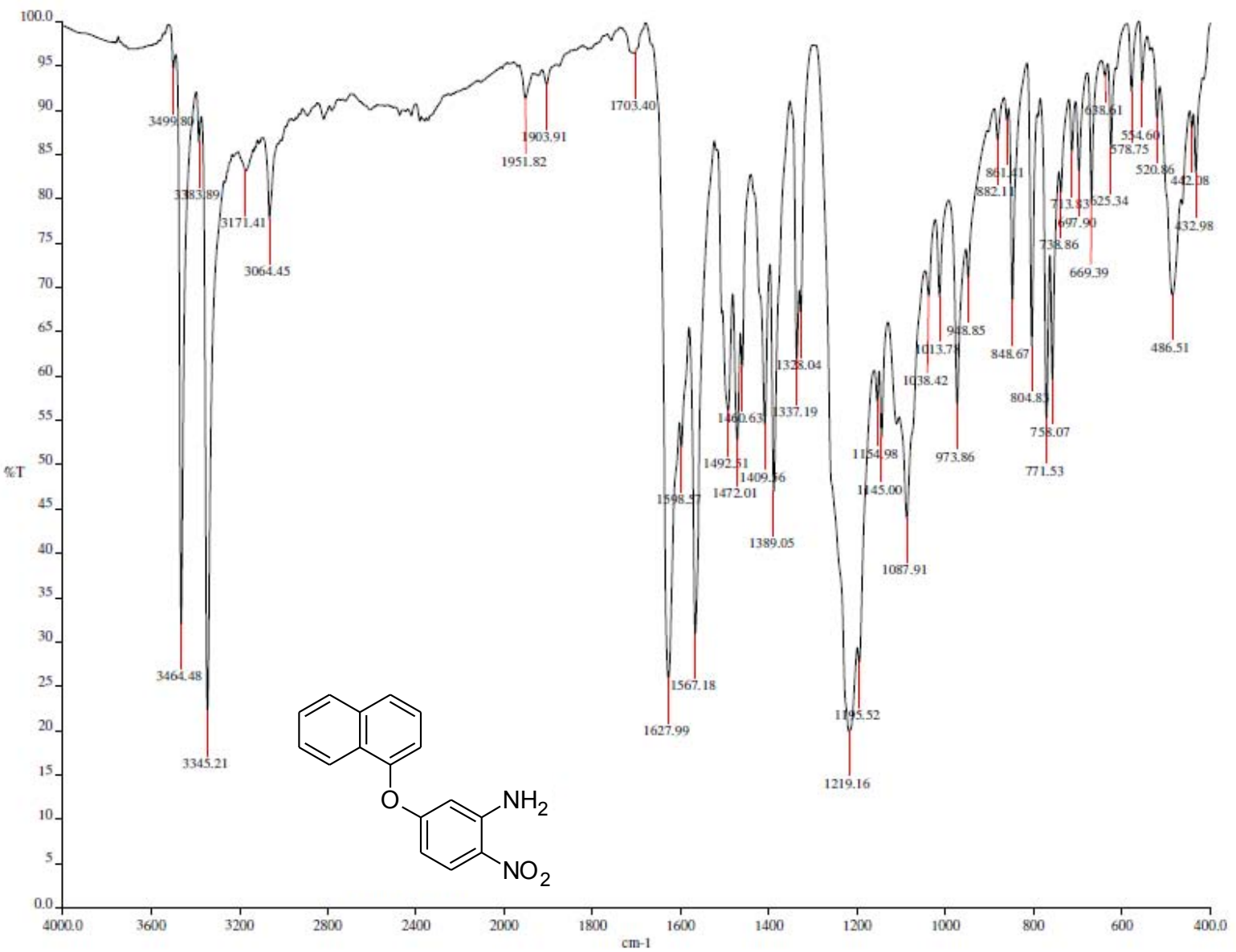
Para la obtención de la *o*-fenilendiamina sustituida **4f** se siguió la metodología **II.1.2.3**; como catalizador se usó Pd/C 10% (0.13 g). La solución café que se obtuvo se filtró y concentró, en ccf solo se observó una mancha ($R_f=0.07$, Sistema I).

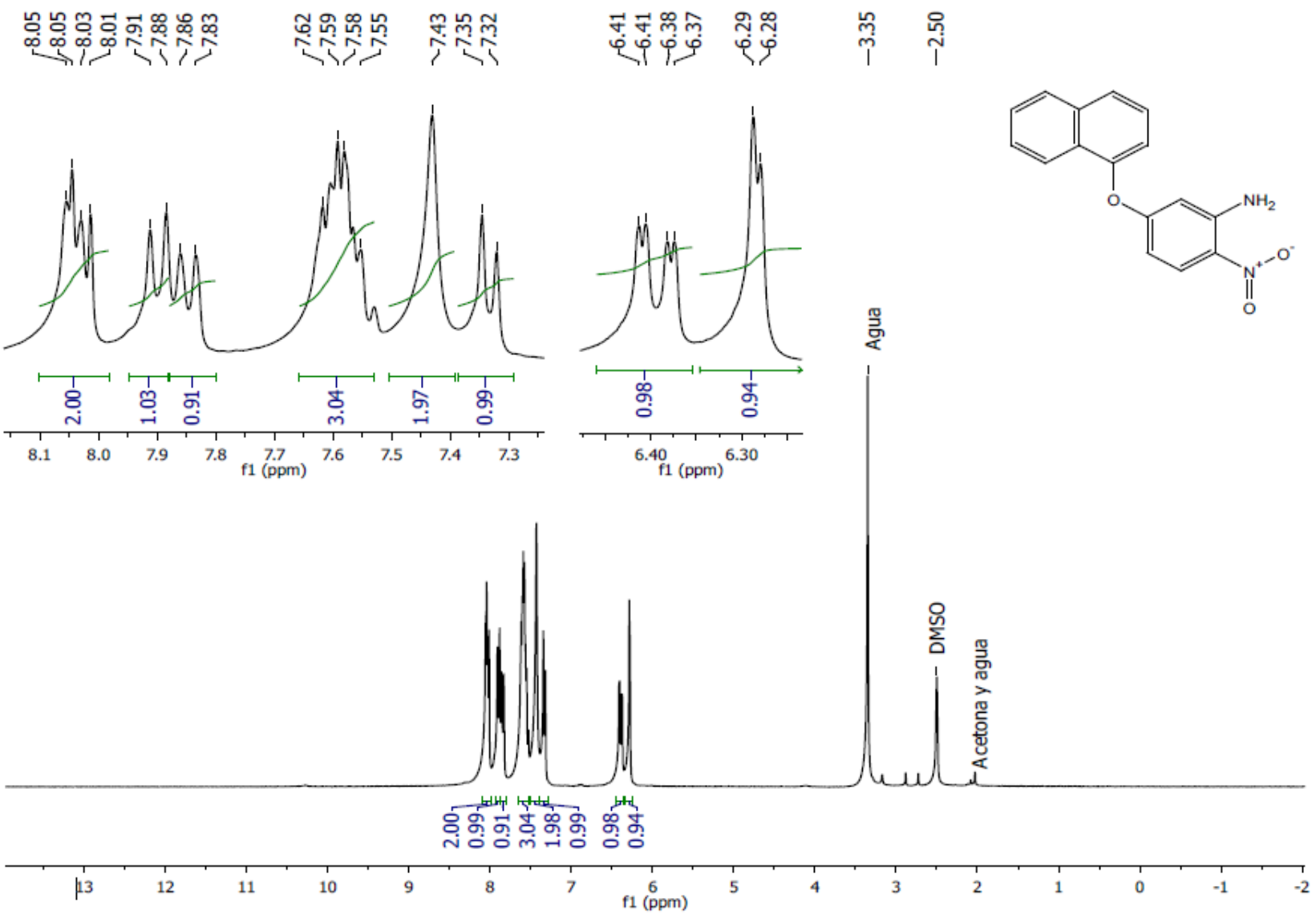
II.1.2.28. *N*-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG6**)



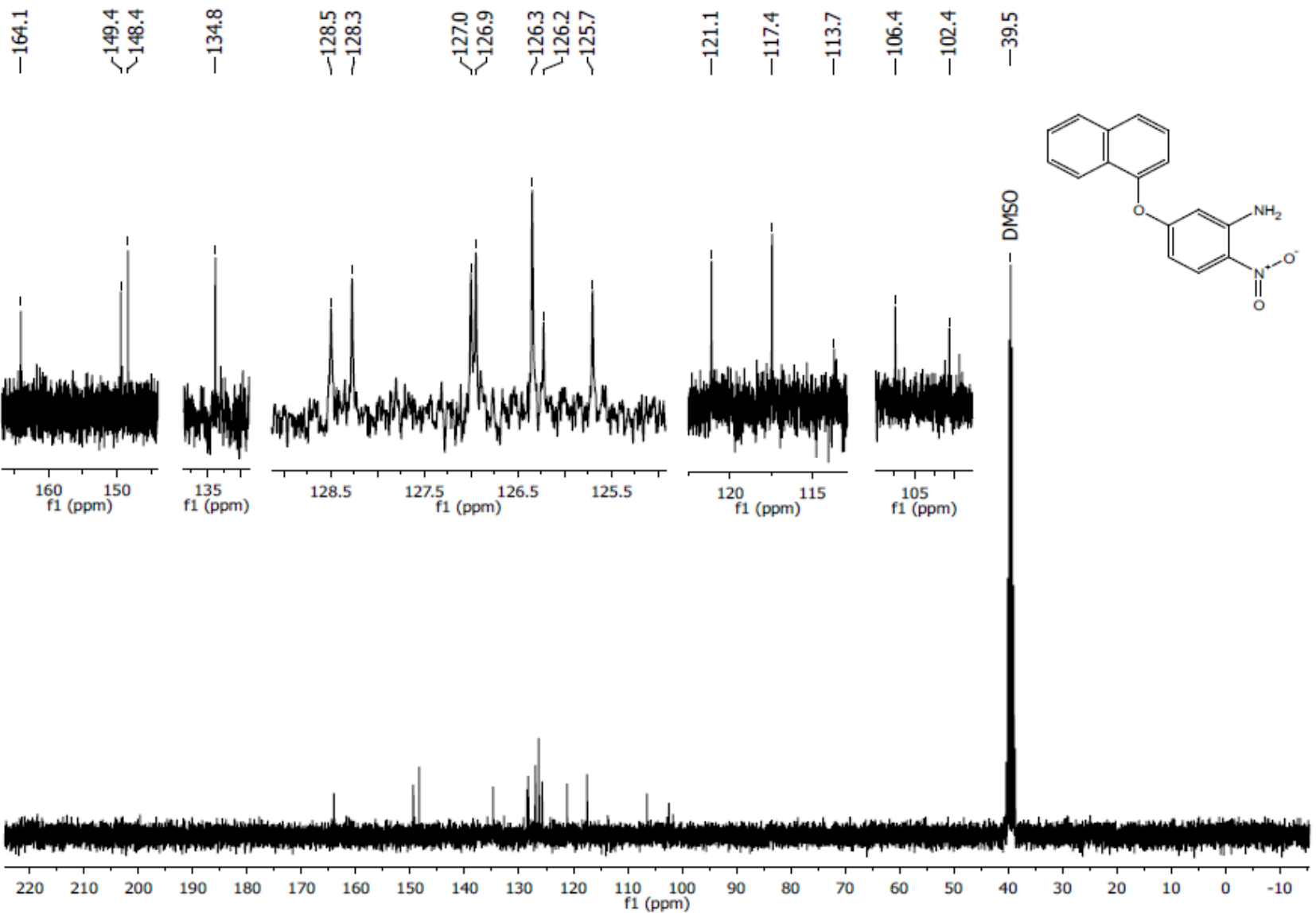
Partiendo de la *o*-fenilendiamina sustituida **4f** y siguiendo la metodología **II.1.2.4** se sintetizó el carbamato bencimidazólico **LCG6**; el rendimiento de la reacción fue de 70.7 %. El sólido café claro obtenido se purificó por lavados con MeOH y mostró solo una mancha en ccf ($R_f=0.42$, Sistema I).

II.2. Espectros





Espectro 2. RMN ¹H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(naftilén-1-iloxi)-2-nitroanilina (**3a**).



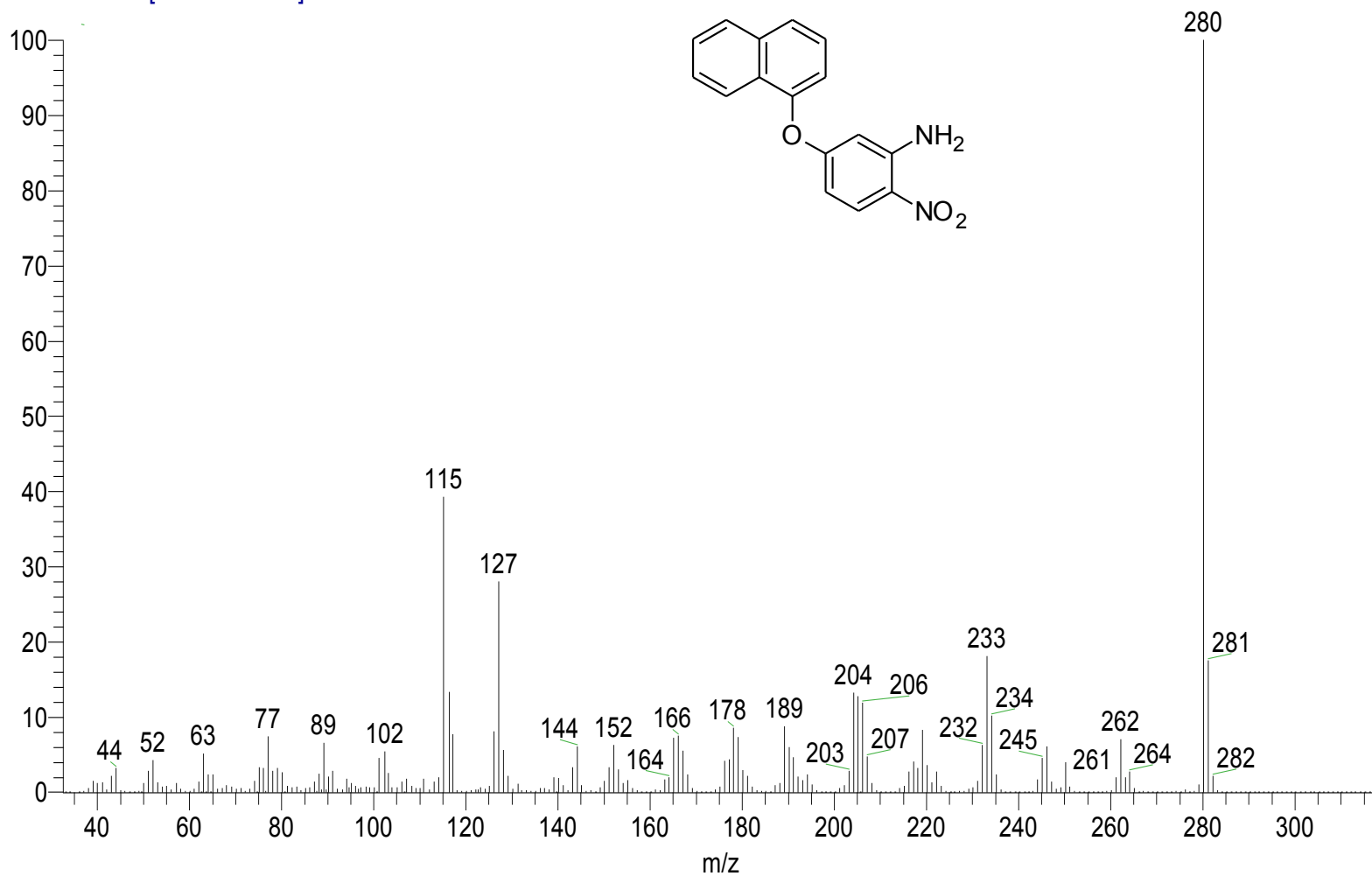
Espectro 3. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(naftilén-1-iloxi)-2-nitroanilina (**3a**).

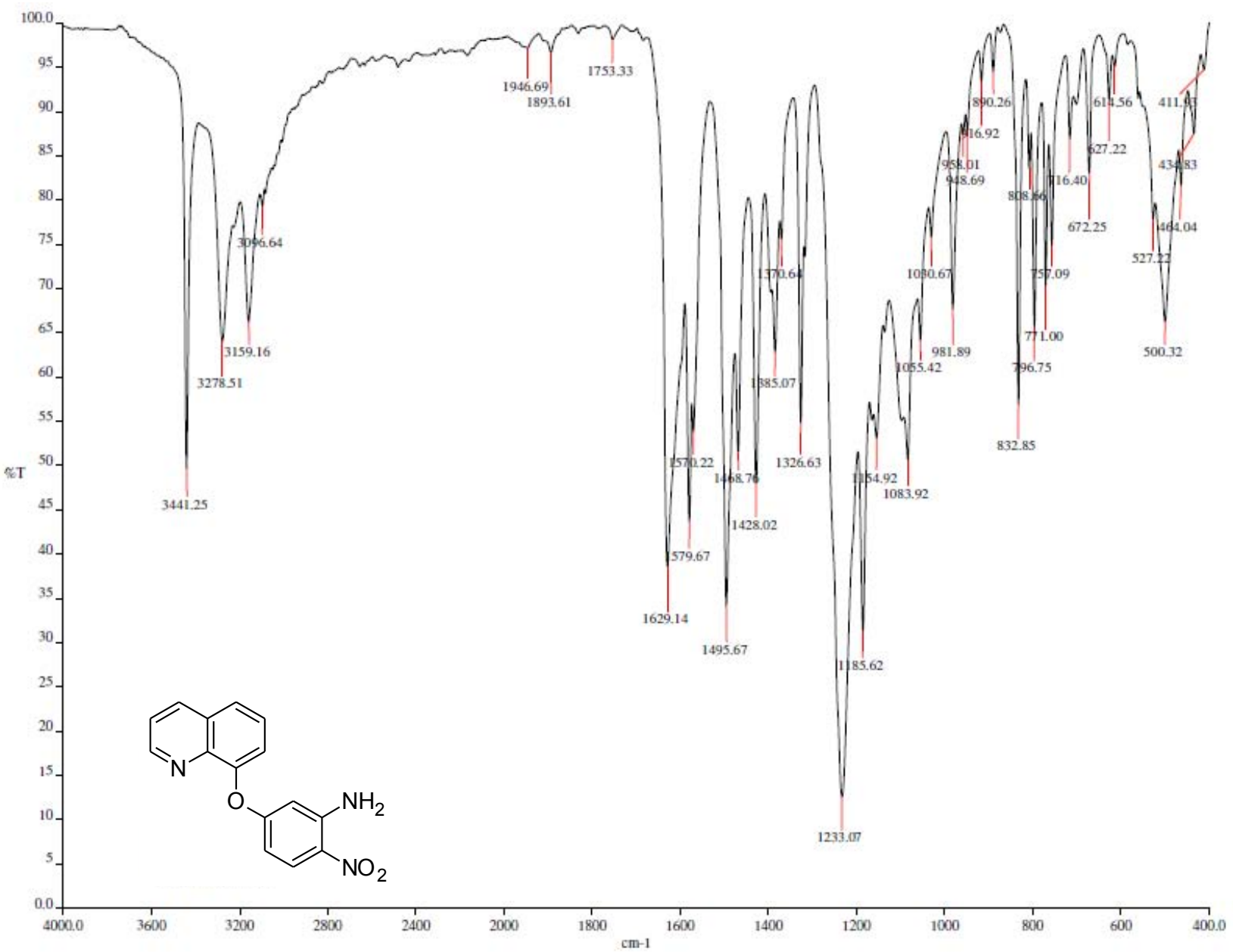
Espectro 4. EM (IE, m/z) del compuesto 5-(naftilen-1-iloxi)-2-nitroanilina (3a).

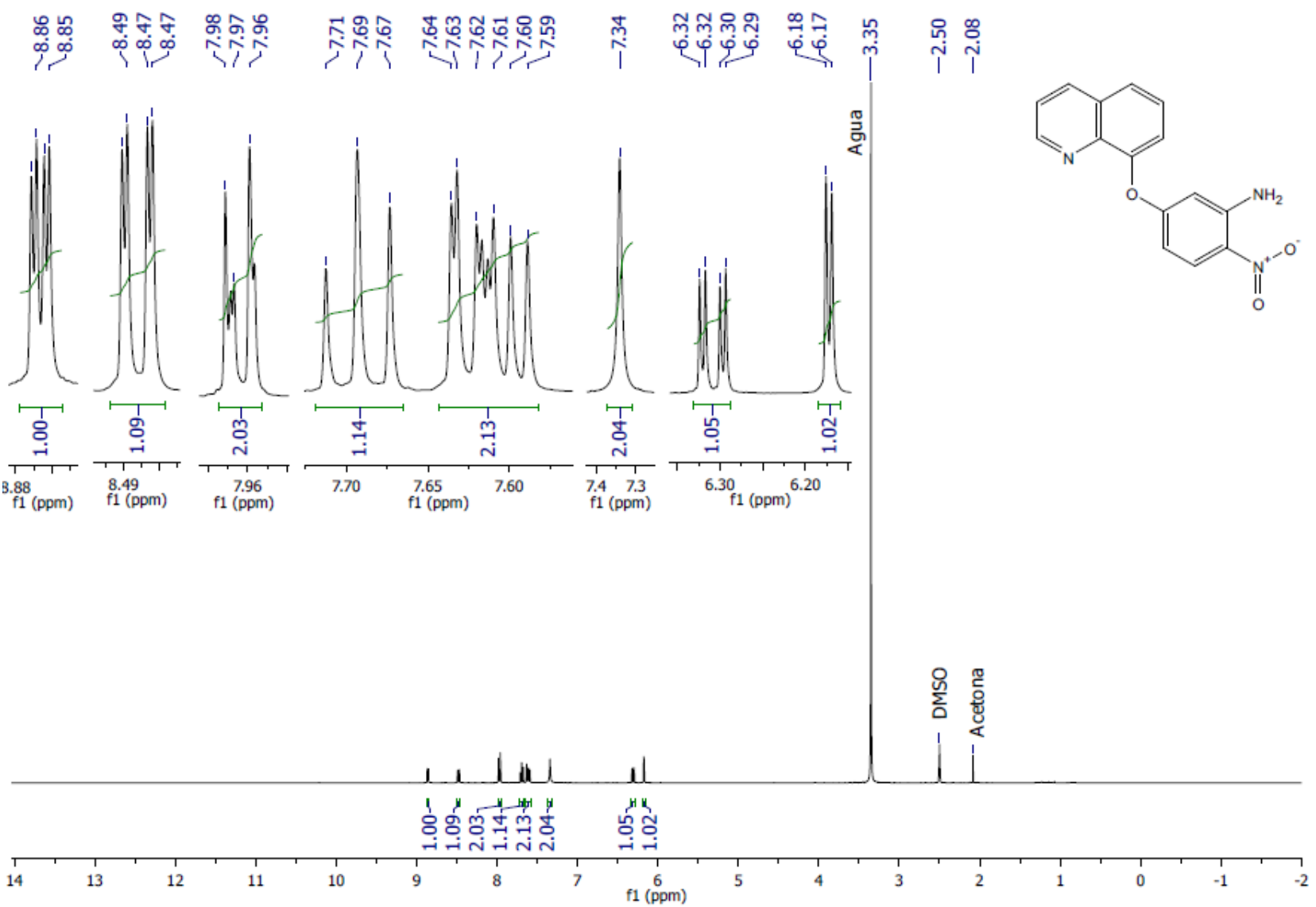
D:\Xcalibur\data\USA\ID\RMPL1H_1_1
szComment

10/28/2014 10:14:29 AM

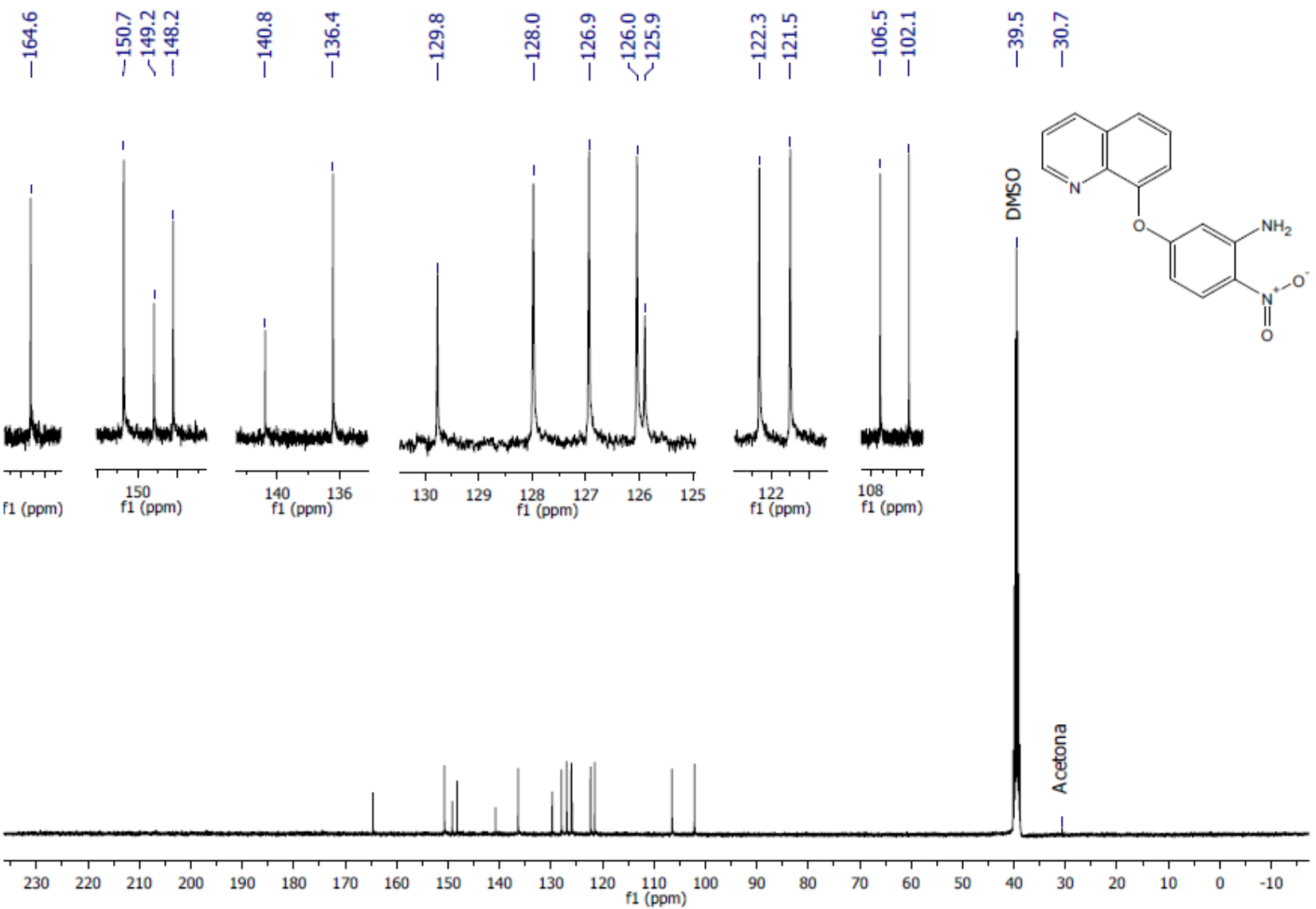
RMPL1H_1_1 #4-9 RT: 0.33-0.88 AV: 6 NL: 2.10E7
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]







Espectro 6. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(quinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**30**).



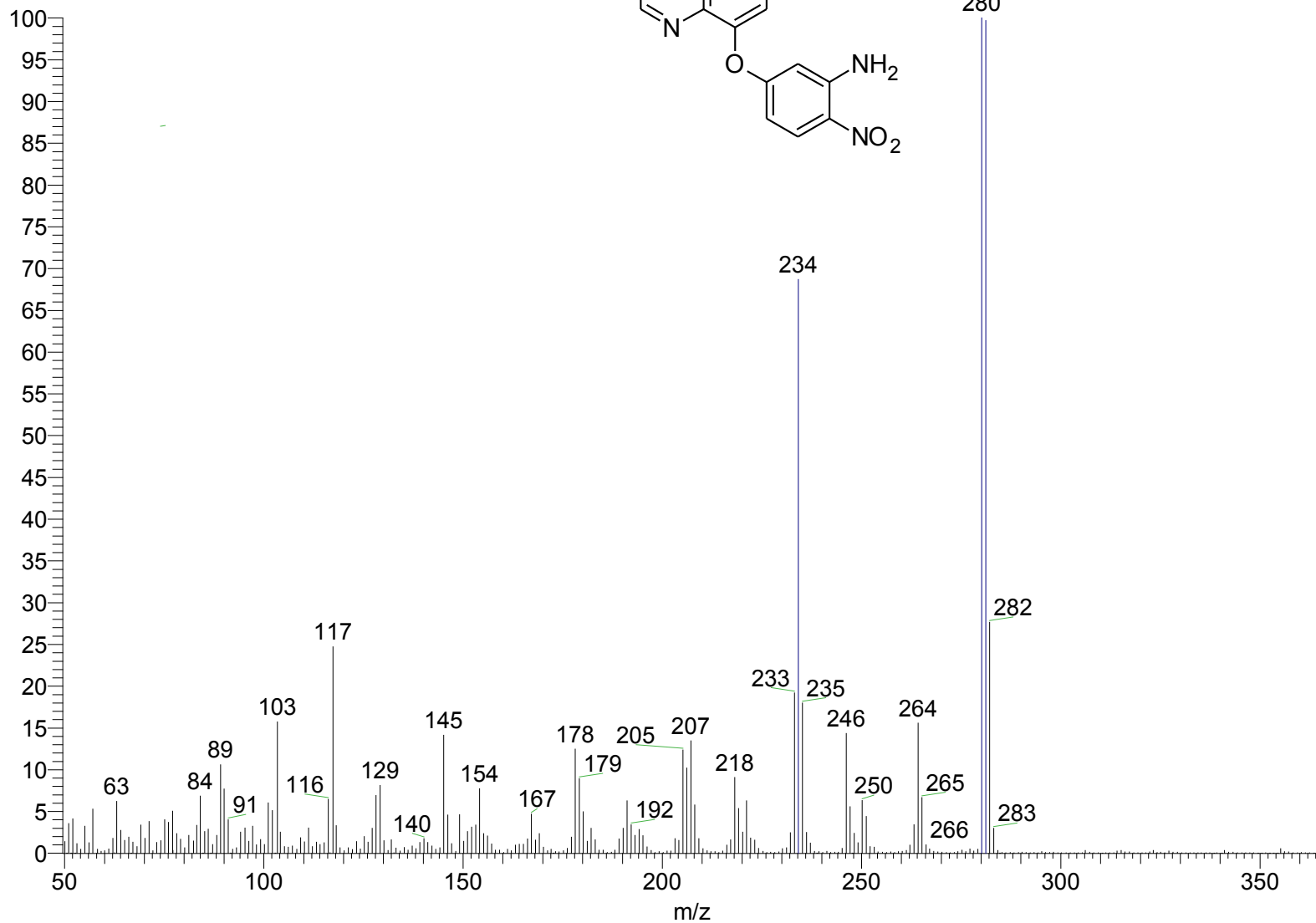
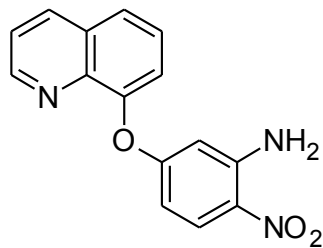
Espectro 7. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(quinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3b**).

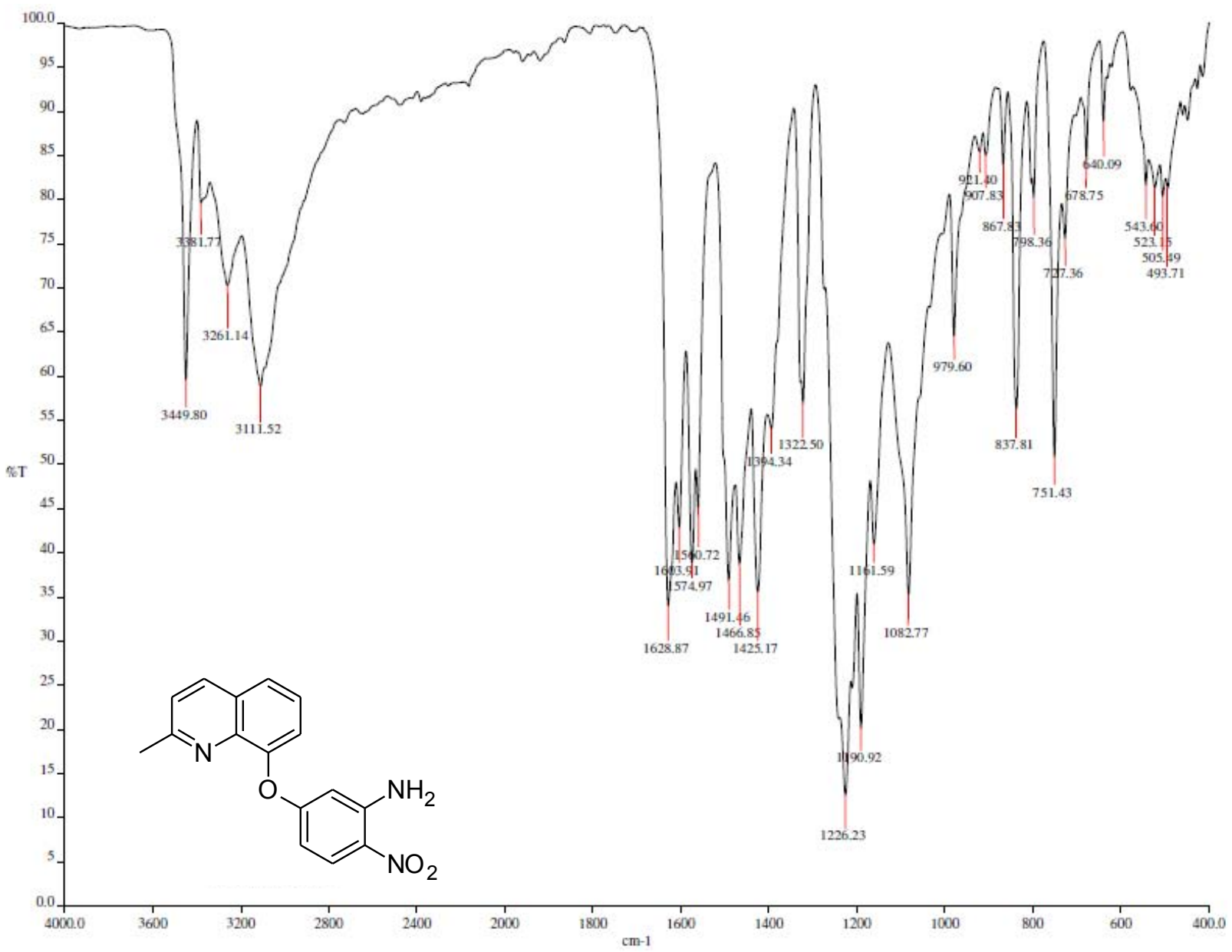
Espectro 8. EM (IE, m/z) del compuesto 5-(quinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3b**).

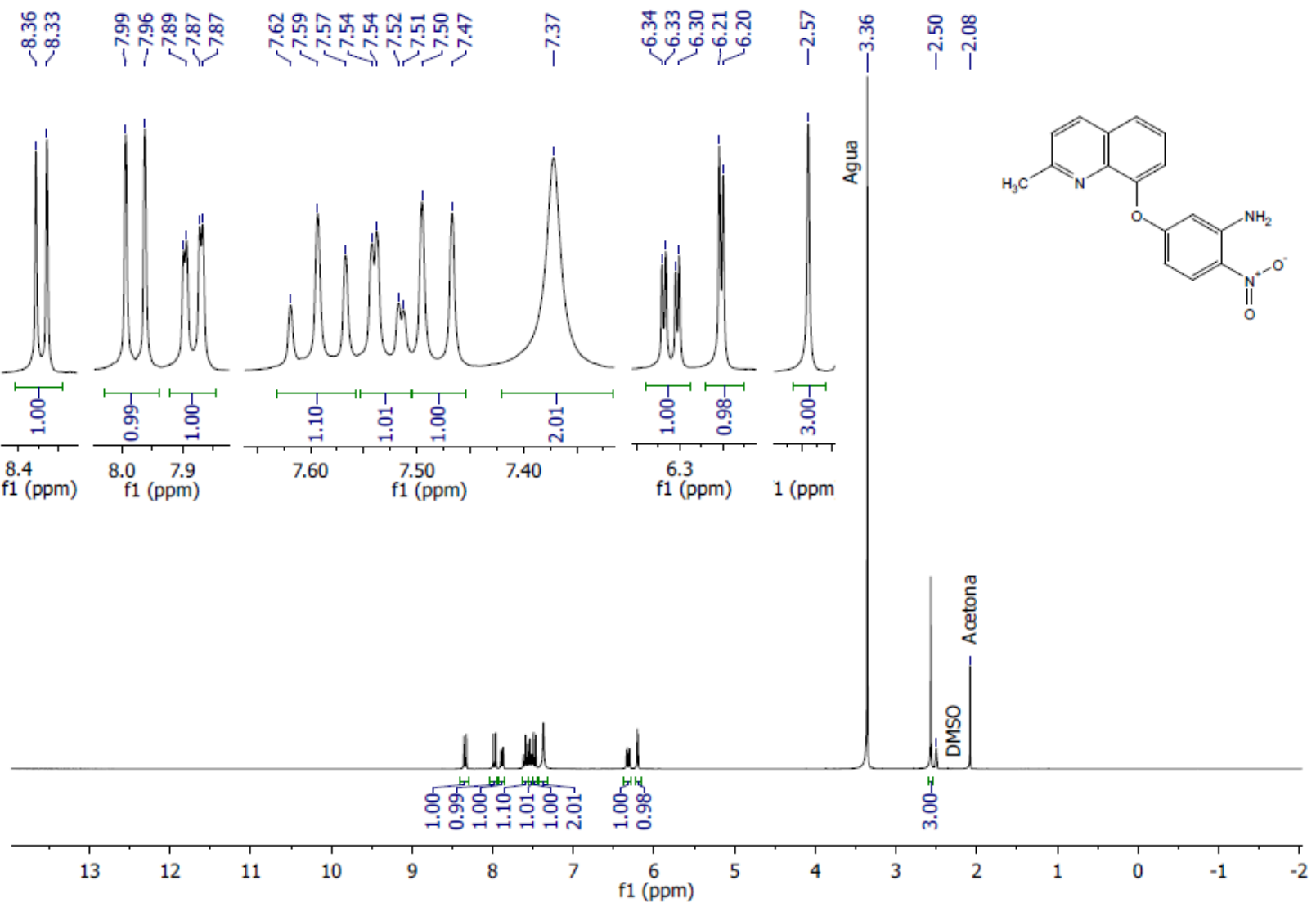
D:\Xcalibur\data\USA\IND\LCG2H__1
szComment

8/31/2015 12:28:52 PM

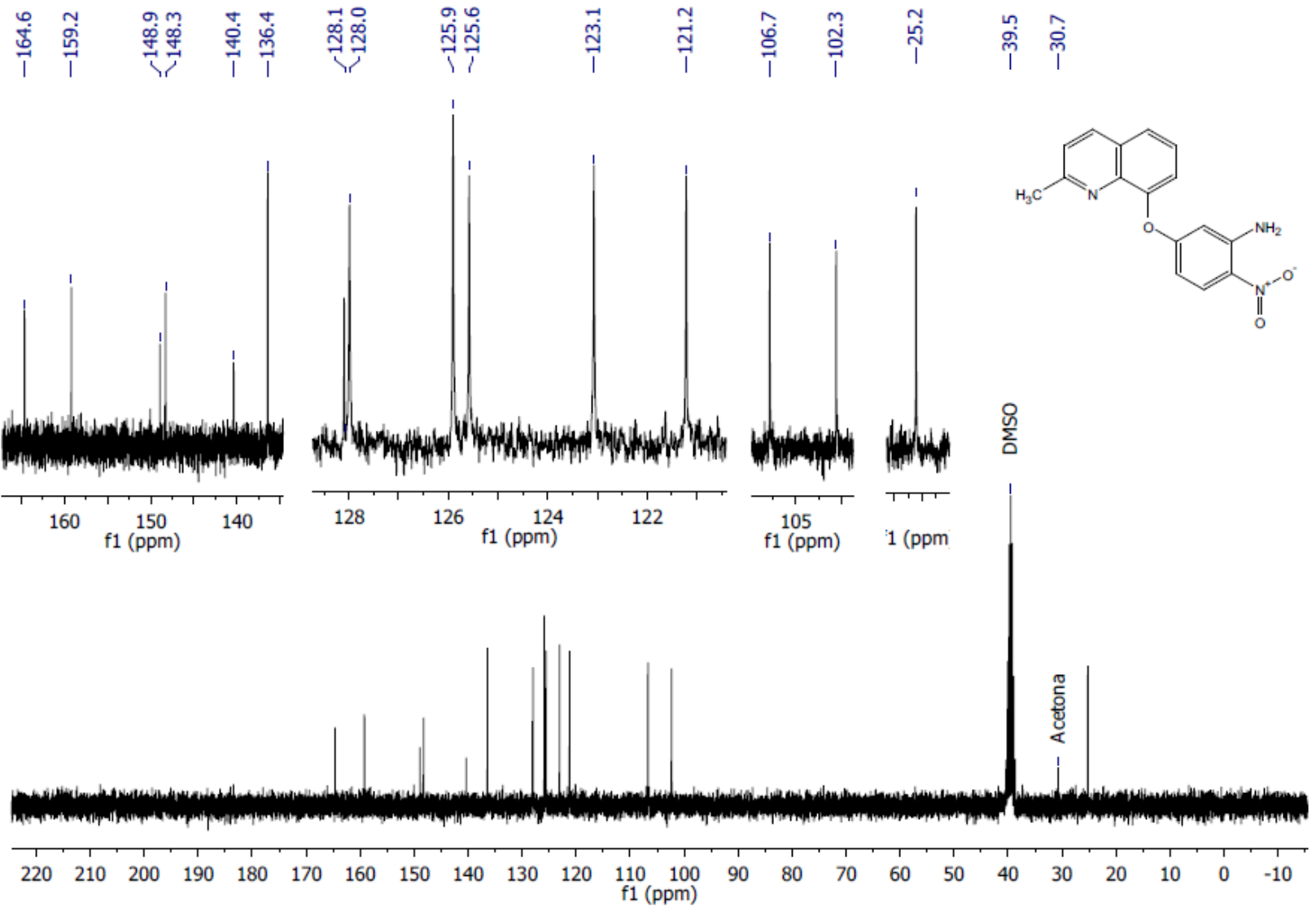
LCG2H__1 #1-8 RT: 0.00-0.66 AV: 8 NL: 9.90E7
T: + c EI Full ms [49.50-600.50]







Espectro 10. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3c**).



Espectro 11. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3c**).

Espectro 12. EM (IE, m/z) del compuesto 5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (3c).

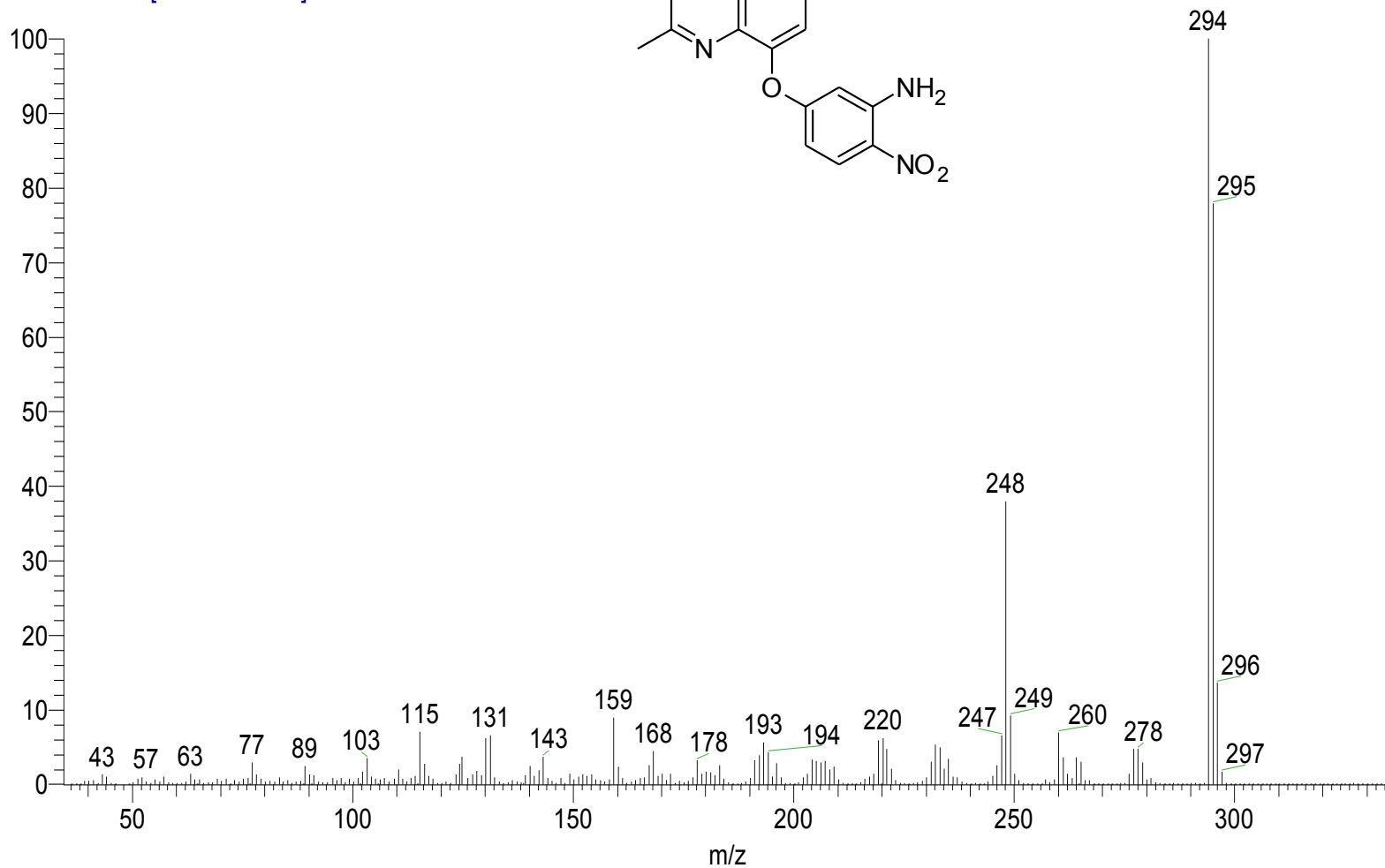
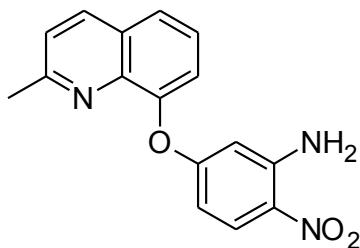
D:\Xcalibur\data\USA\ID\RMPL3H_1_1

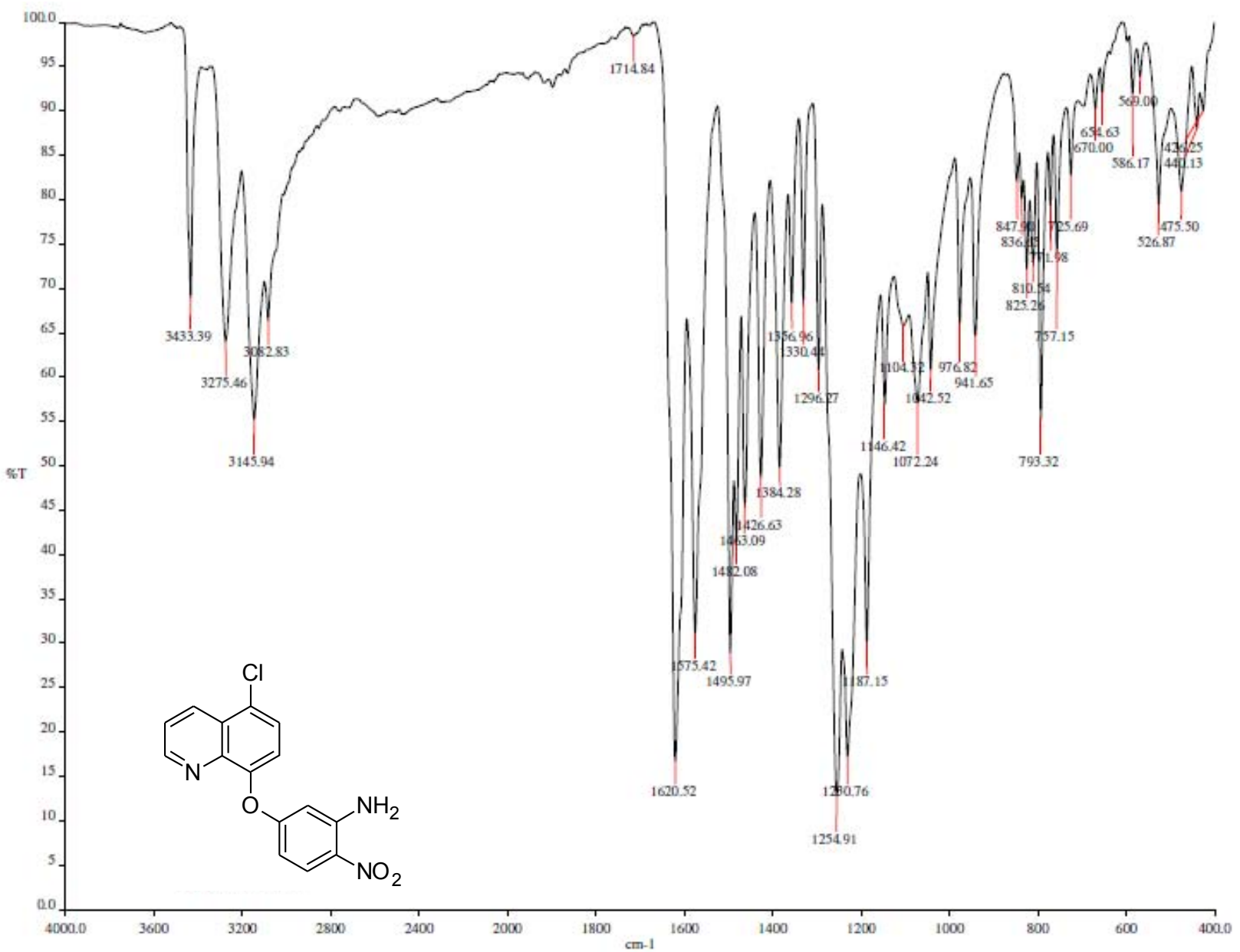
10/27/2014 3:16:15 PM

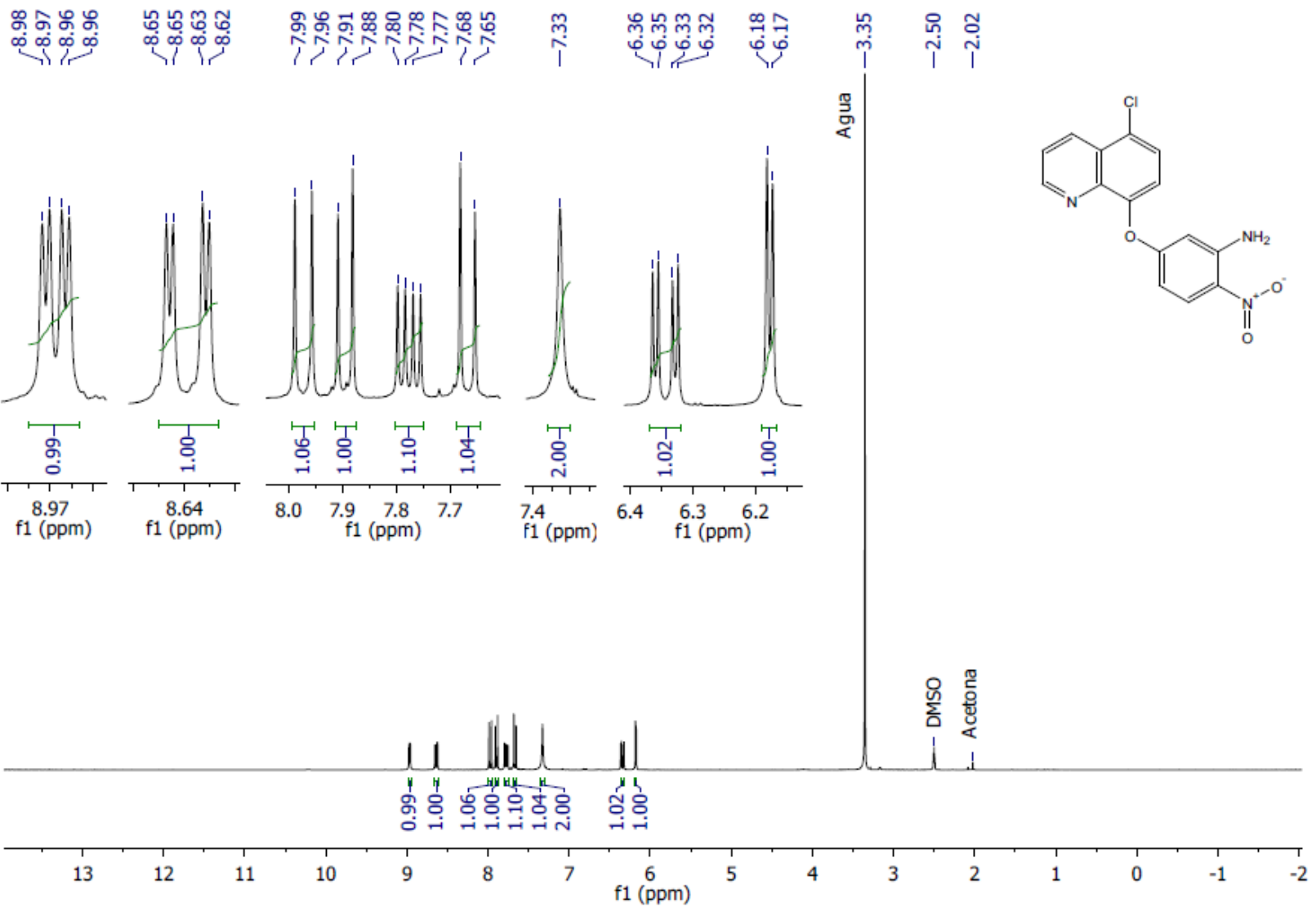
szComment

RMPL3H_1_1 #4-7 RT: 0.33-0.66 AV: 4 NI: 1.39F7

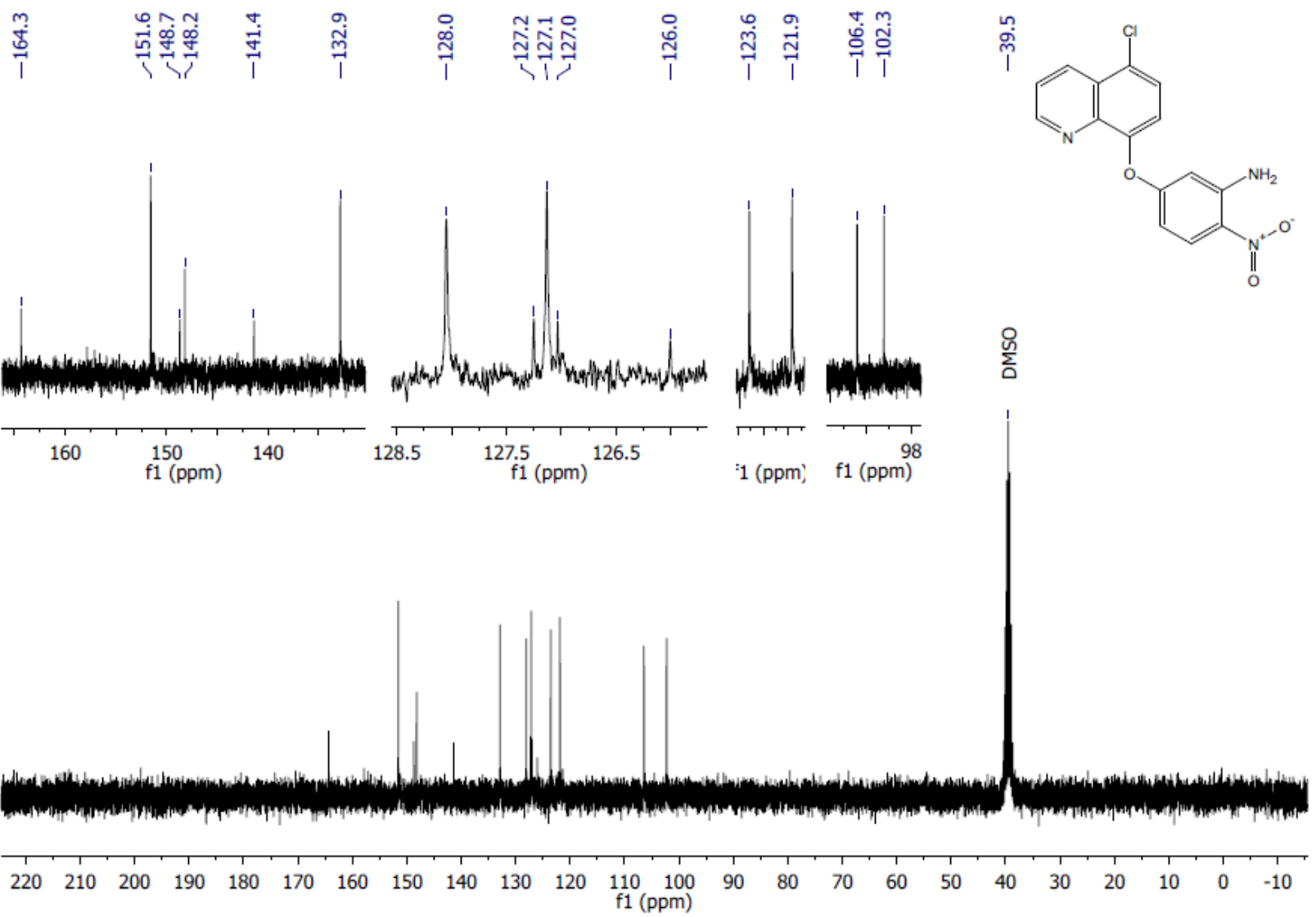
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]







Espectro 14. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3d**).



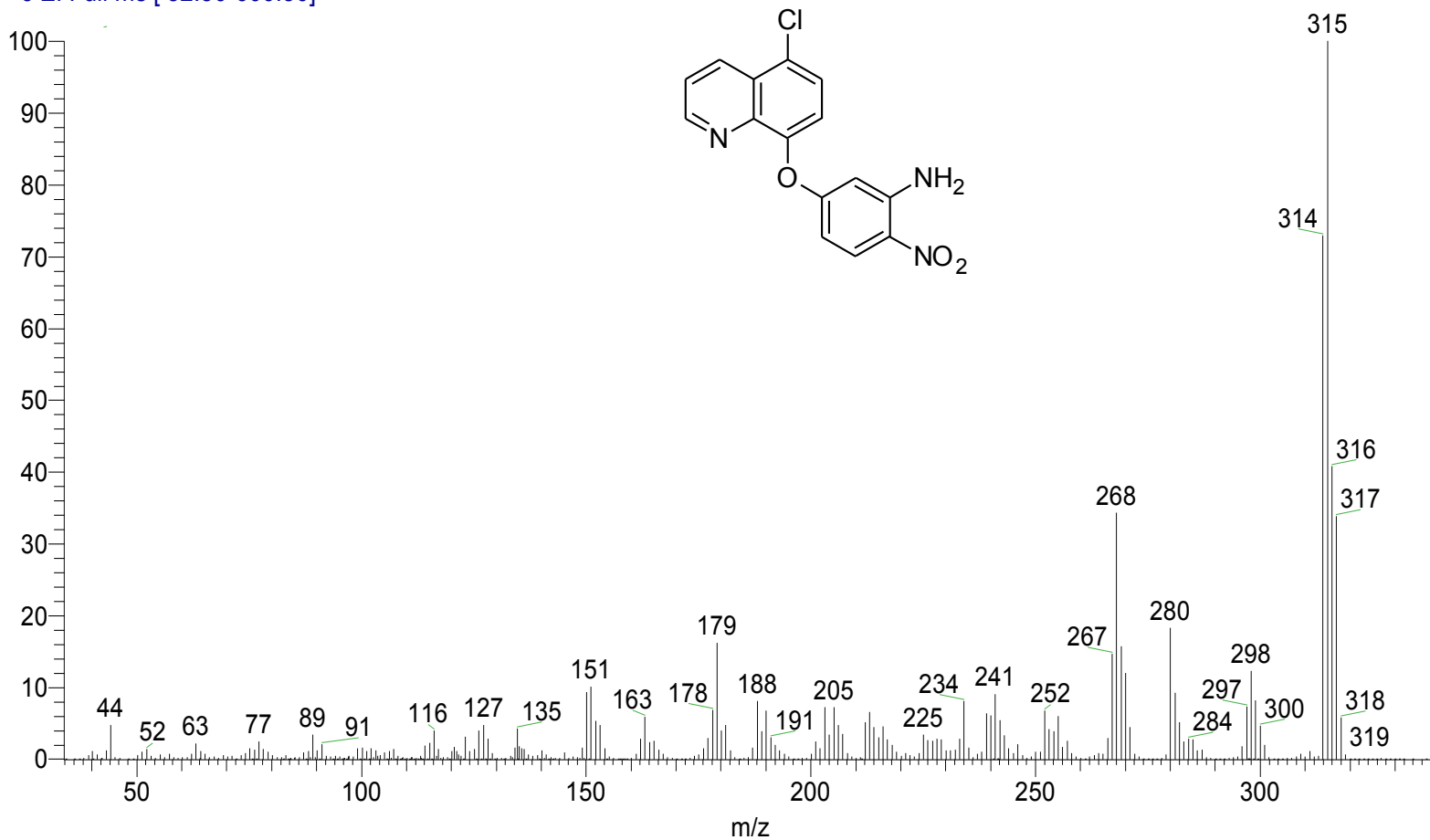
Espectro 15. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3d**).

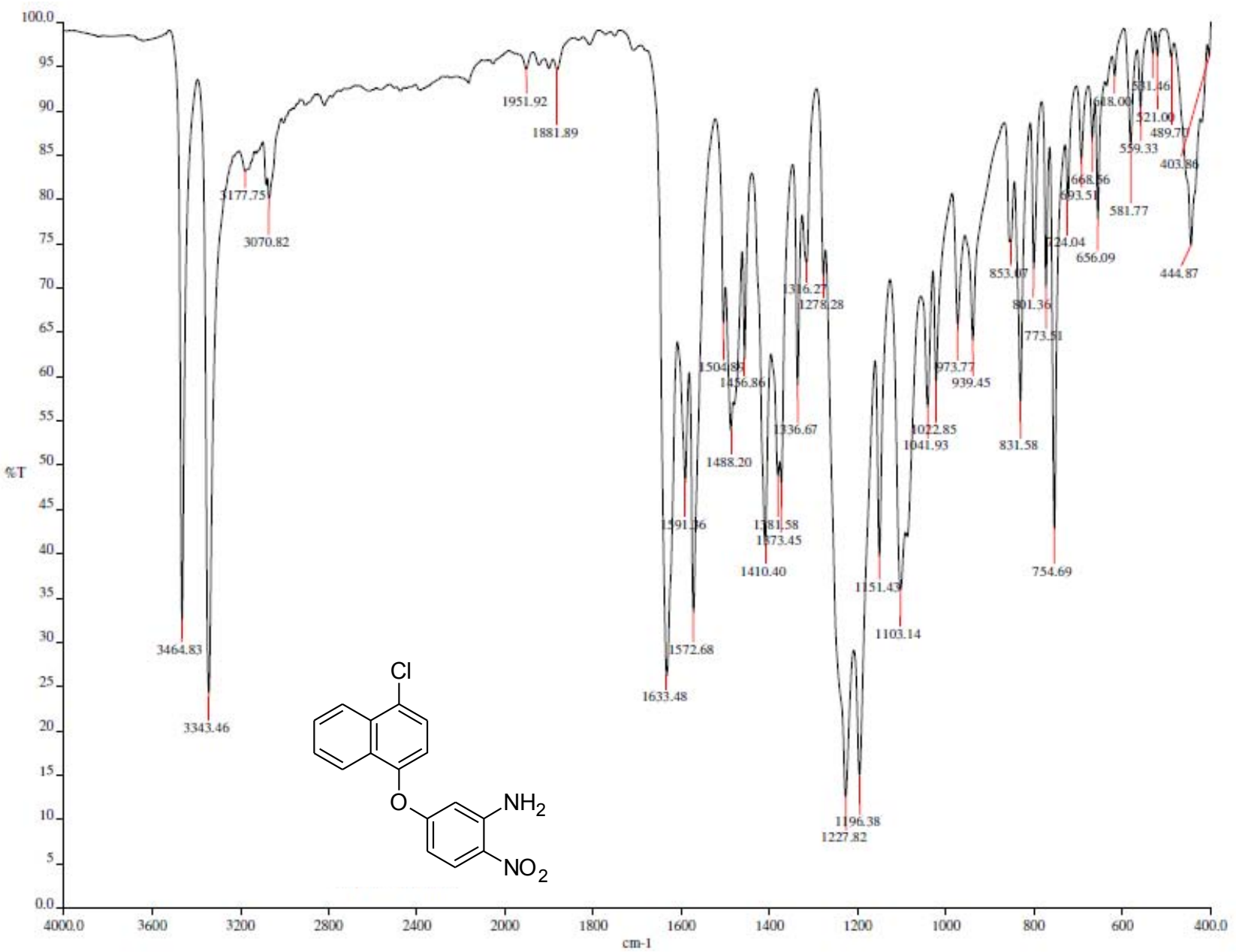
Espectro 16. EM (IE, m/z) del compuesto 5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-2-nitroanilina (**3d**).

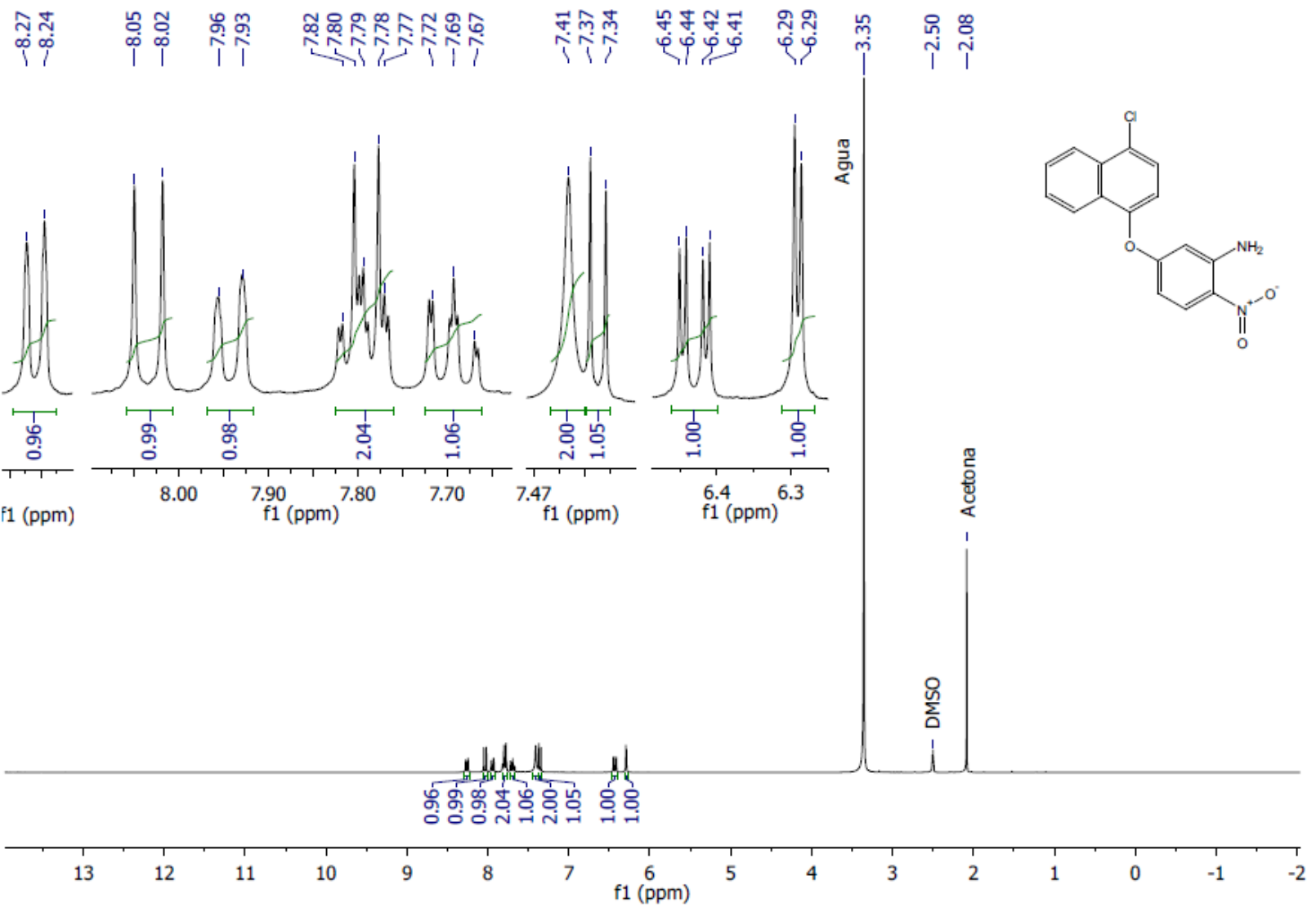
D:\Xcalibur\data\USA\NID\RMPL4H__1_1
szComment

10/27/2014 2:50:22 PM

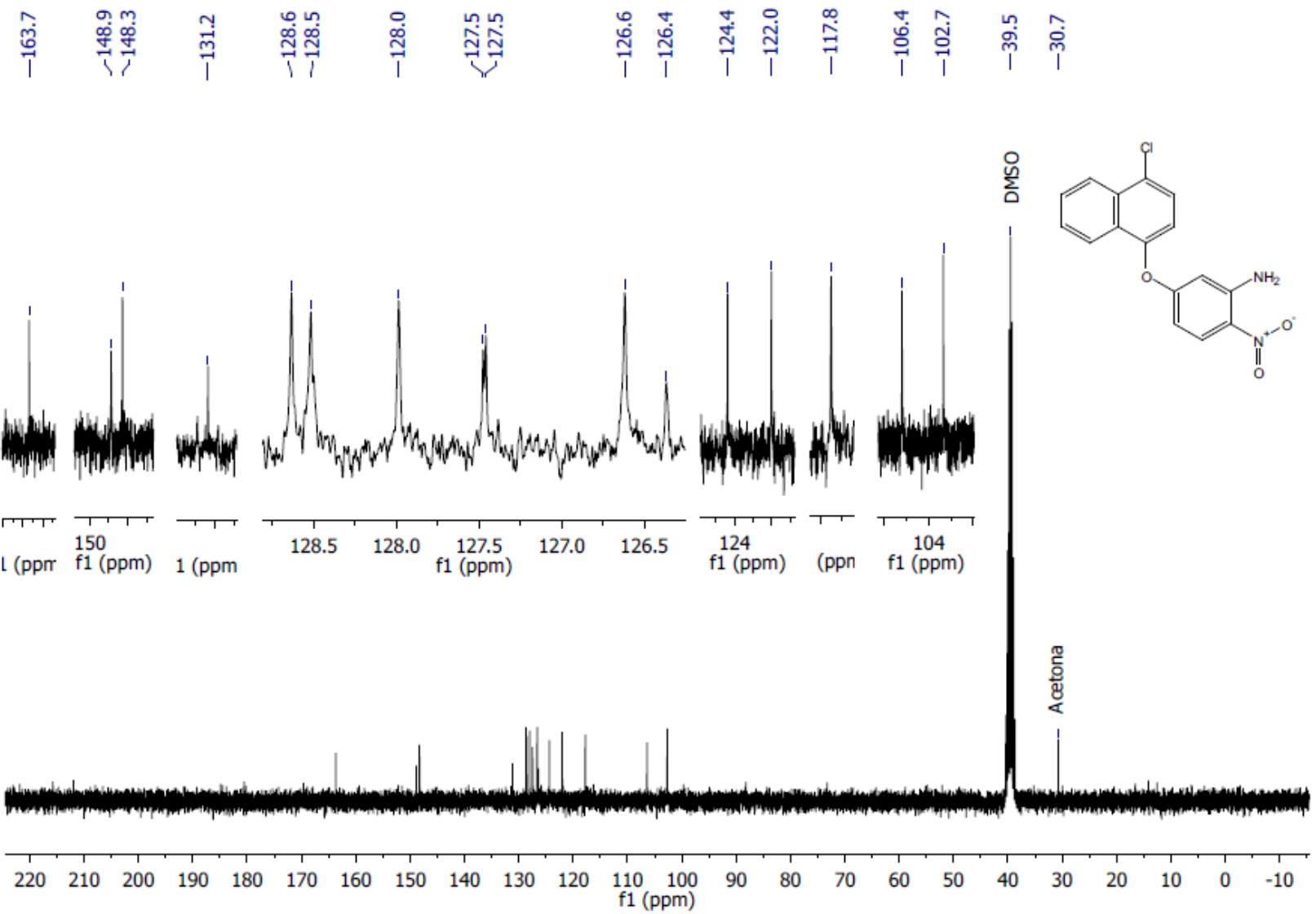
RMPL4H__1_1#8 RT: 0.77 AV: 1 NL: 6.92E6
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]







Espectro 18. RMN ¹H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(4-cloronafilen-1-iloxi)-2-nitroanilina (**3e**).



Espectro 19. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(4-clorofeniloxi)-2-nitroanilina (**3e**).

Espectro 20. EM (IE, m/z) del compuesto 5-(4-cloronafilen-1-iloxi)-2-nitroanilina (3e).

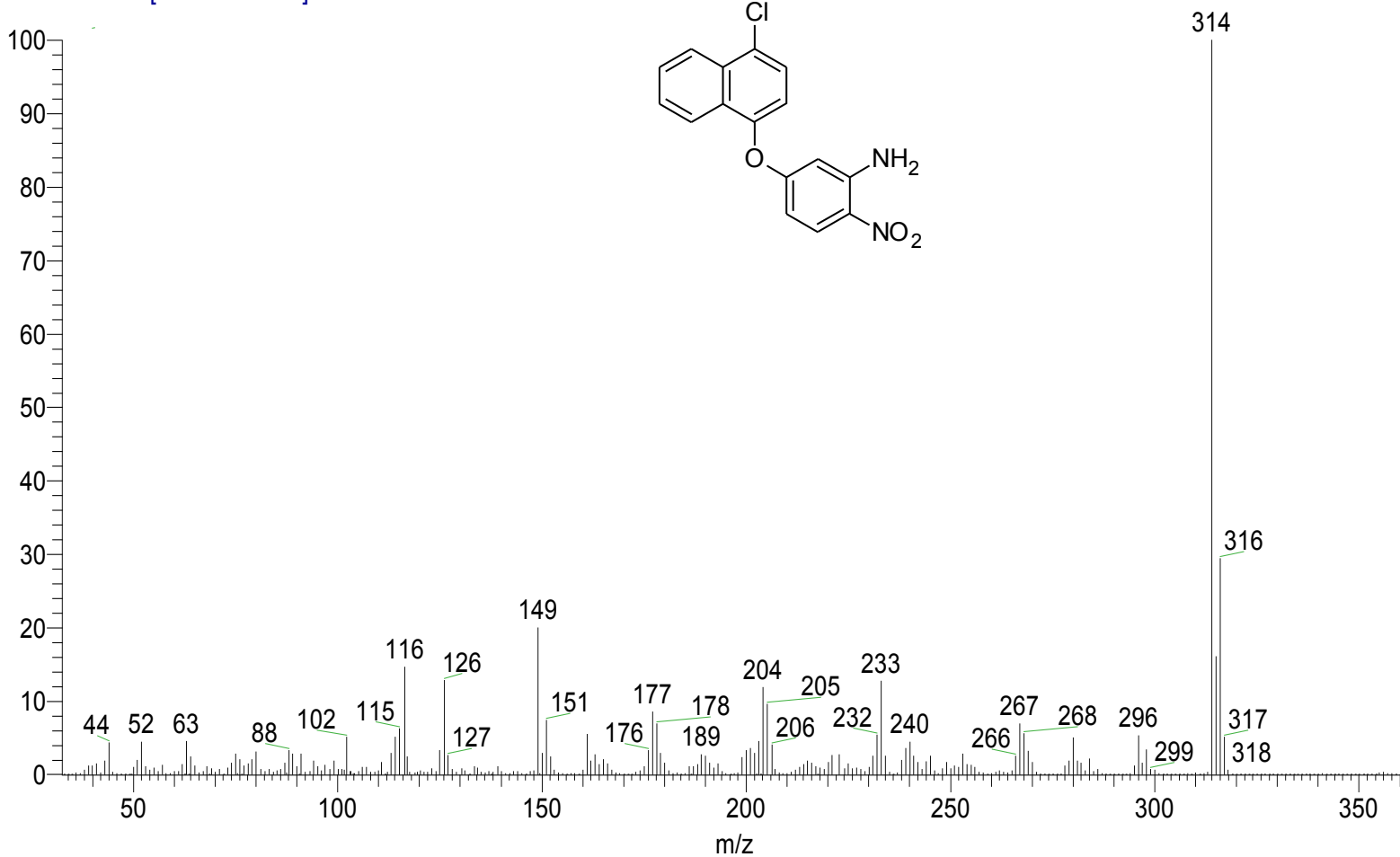
D:\Xcalibur\data\USA\IND\RMPL5H__1_1

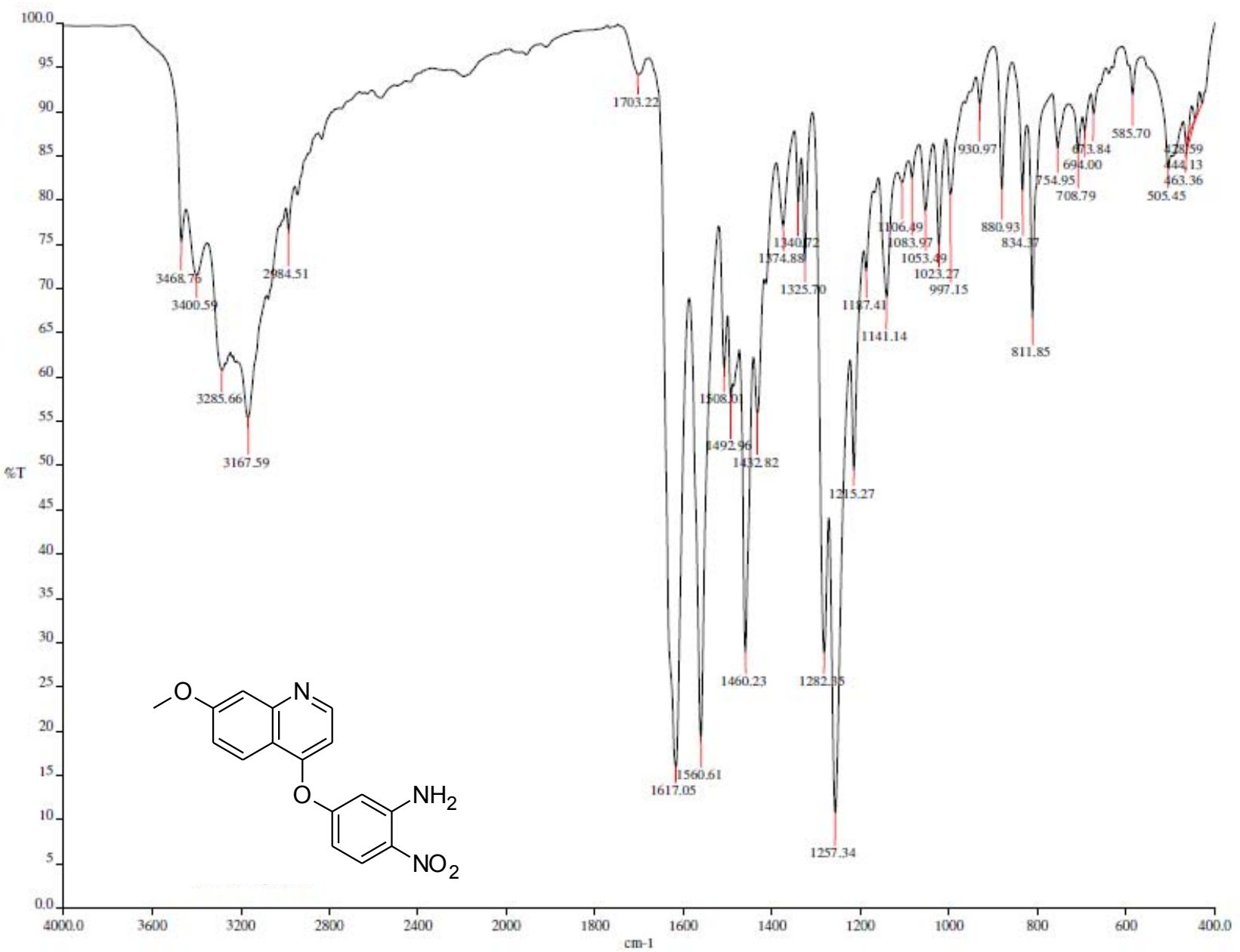
10/22/2014 2:47:45 PM

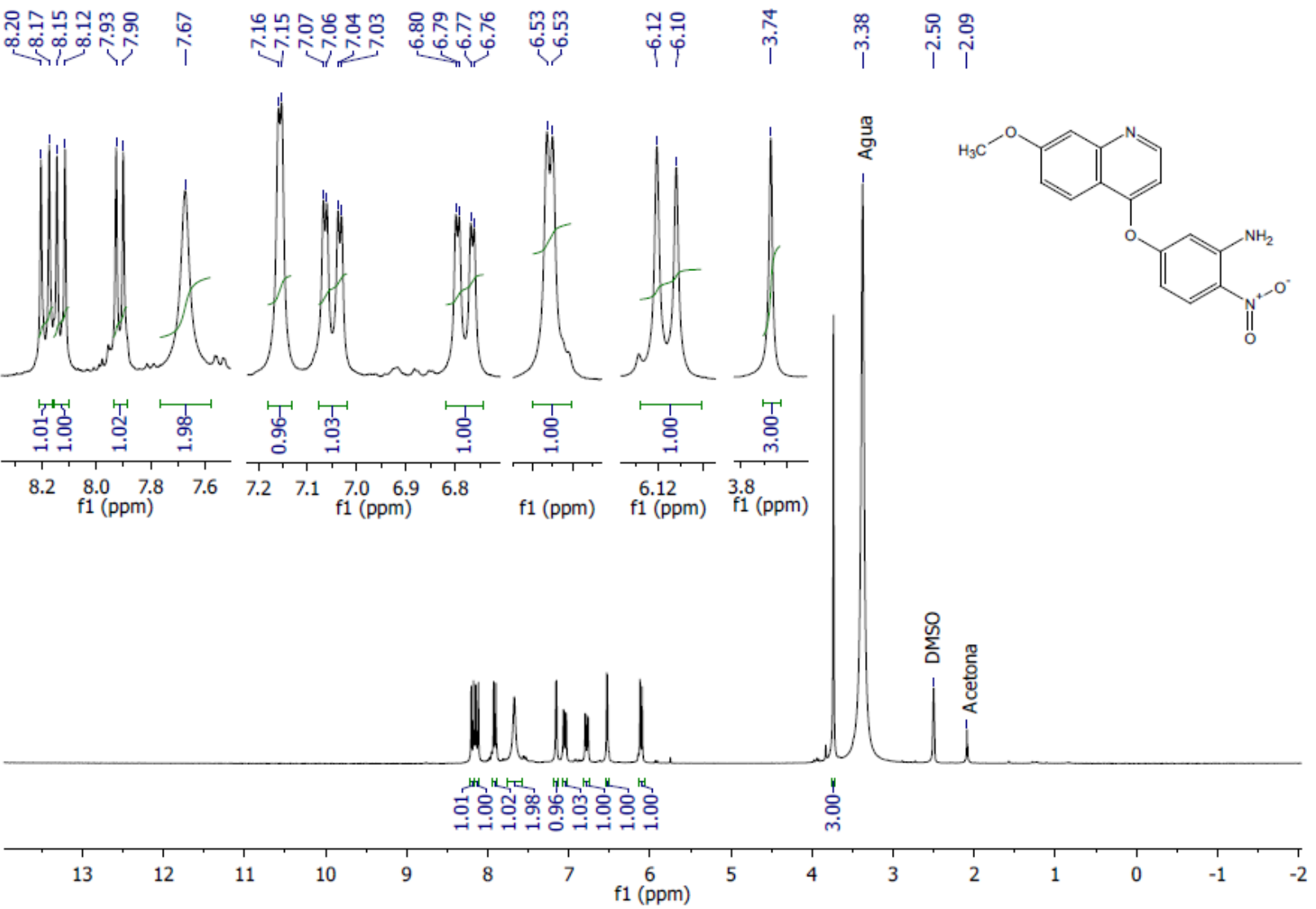
szComment

RMPL5H__1_1 #7-8 RT: 0.66-0.77 AV: 2 NL: 3.71E7

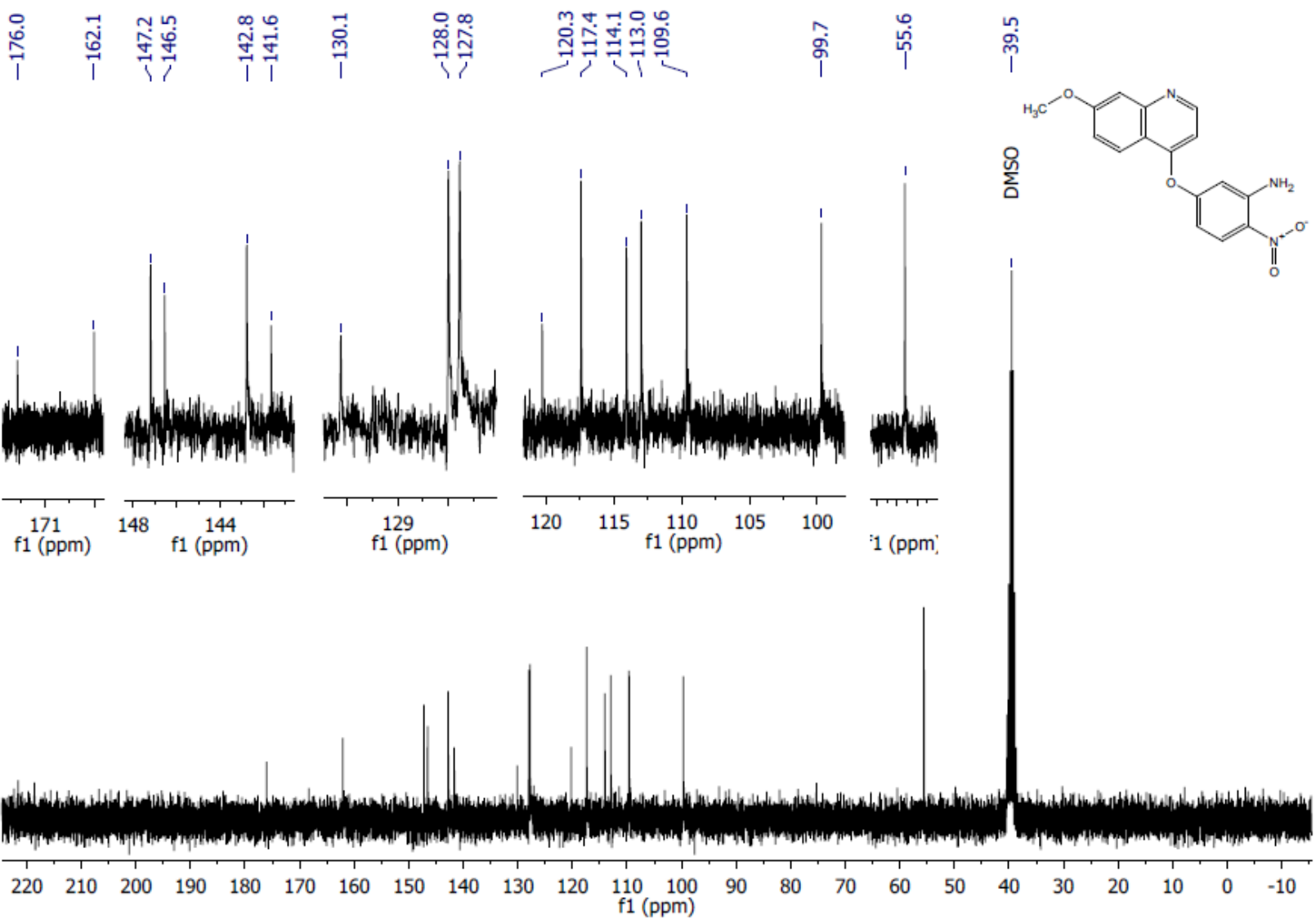
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]







Espectro 22. RMN ¹H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroanilina (3f).



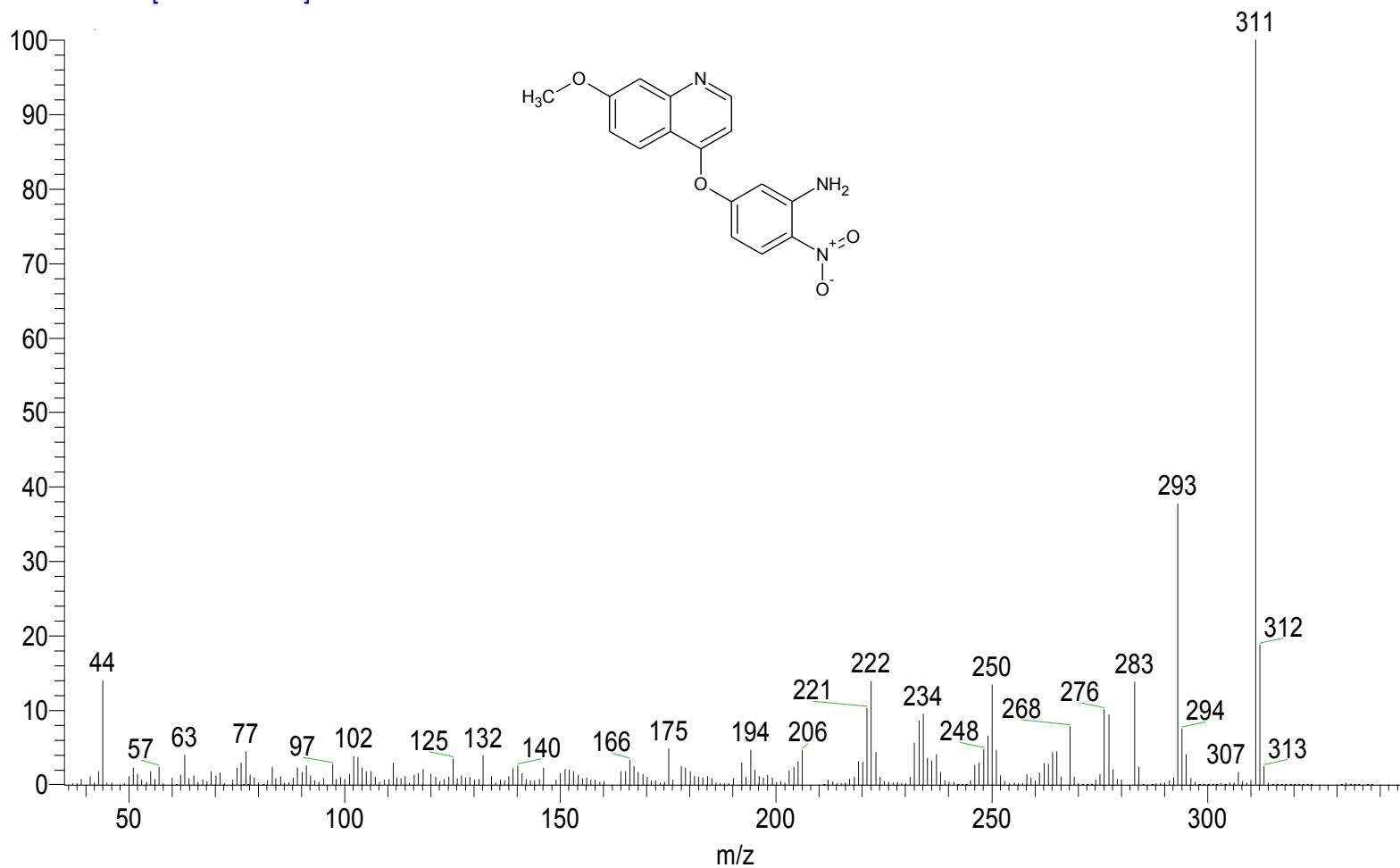
Espectro 23. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto 5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroanilina (3f).

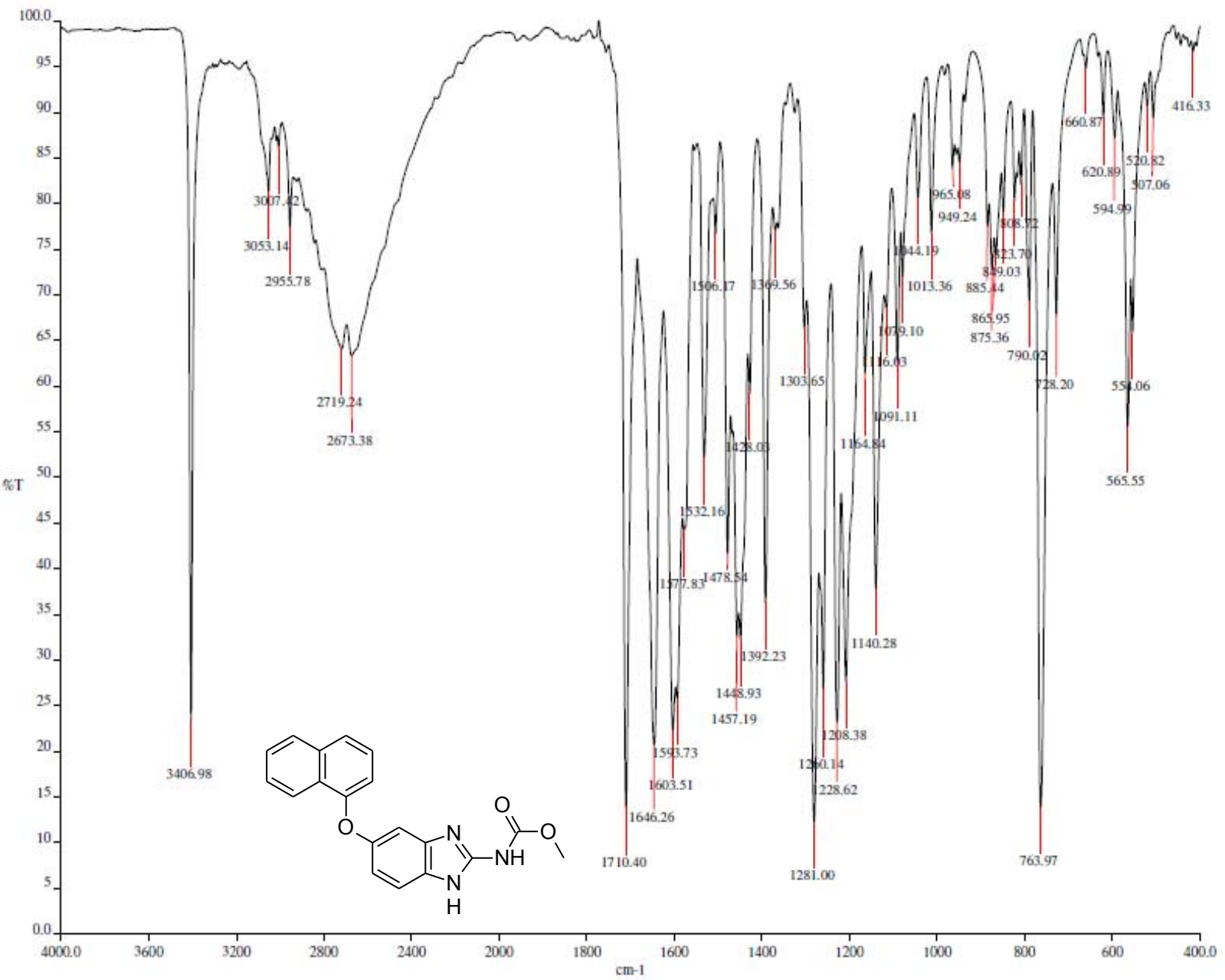
Espectro 24. EM (IE, m/z) del compuesto 5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-2-nitroanilina (**3f**).

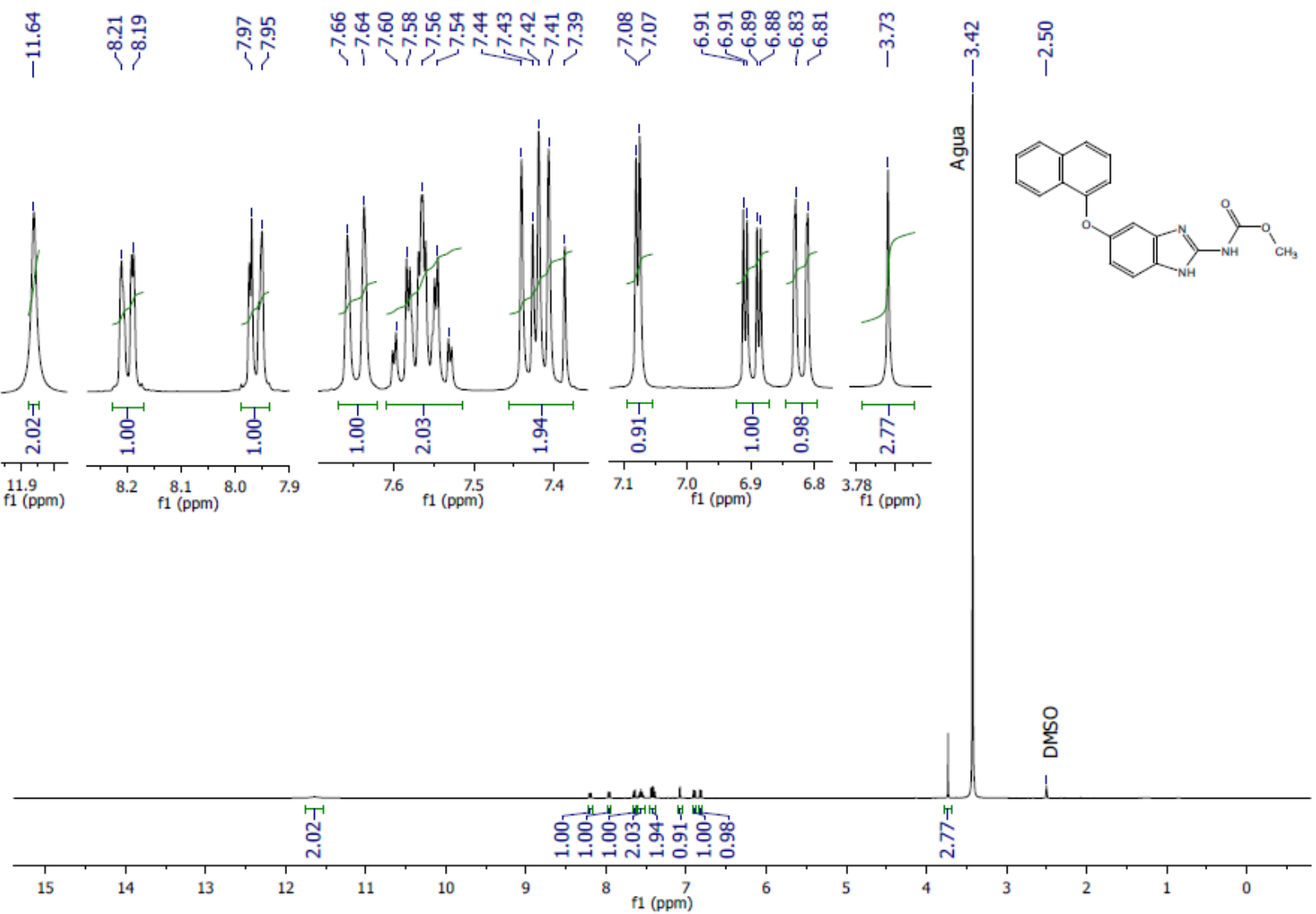
D:\Xcalibur\data\USA\ID\RMLPL7H_1_1
szComment

10/21/2014 10:54:29 AM

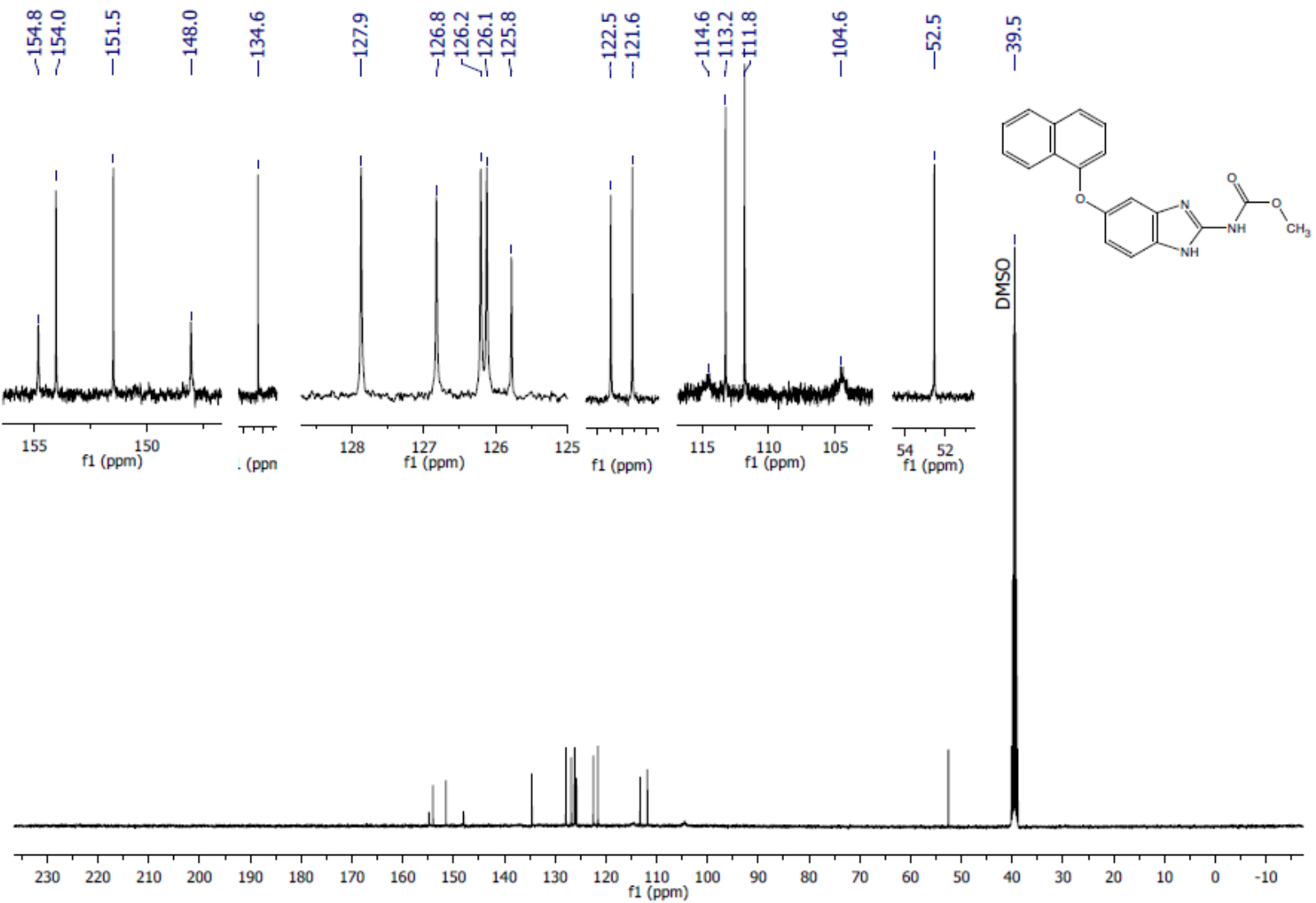
RMLPL7H_1_1 #15-16 RT: 1.53-1.64 AV: 2 SB: 9 3.06-3.93 NL: 2.02E6
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]



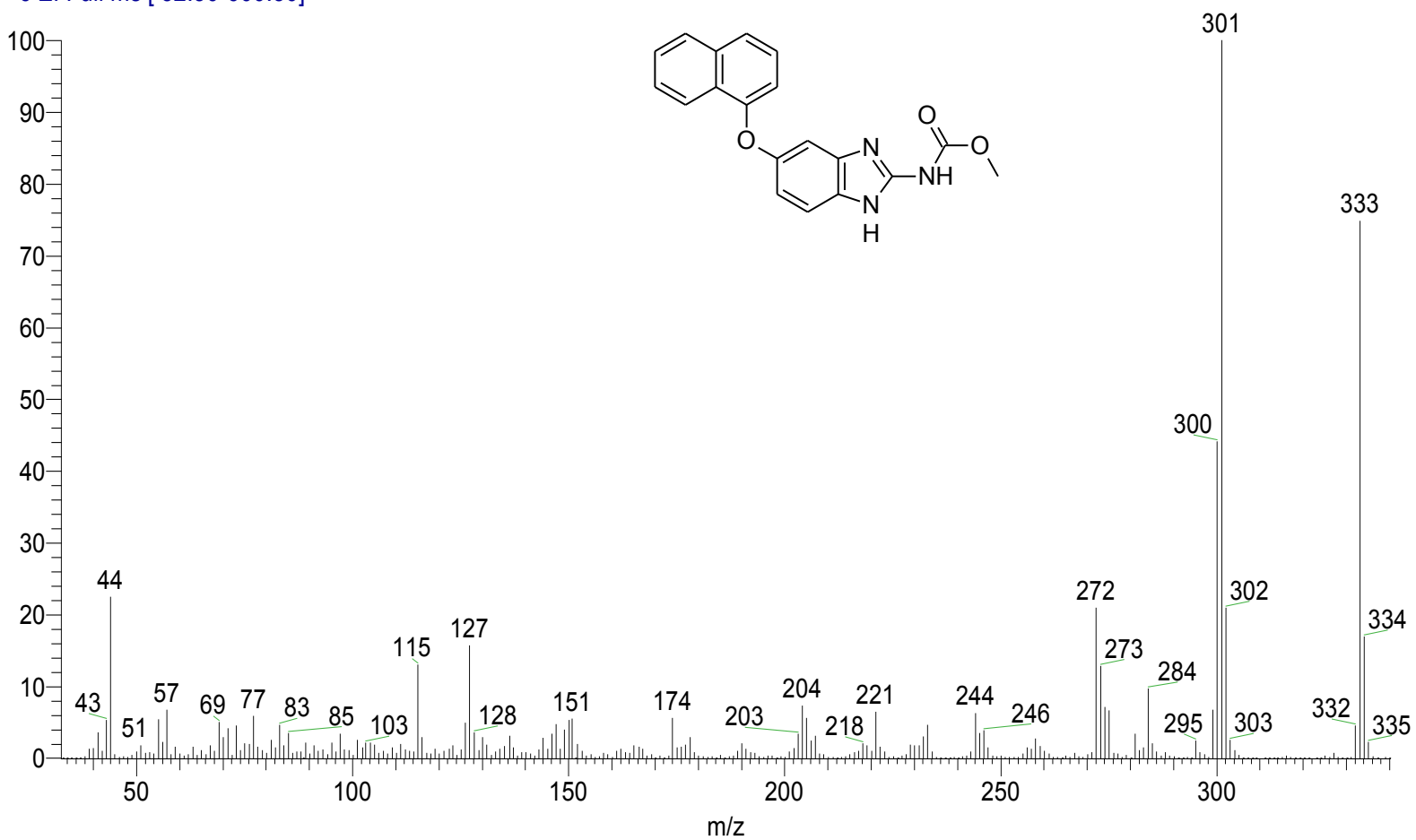
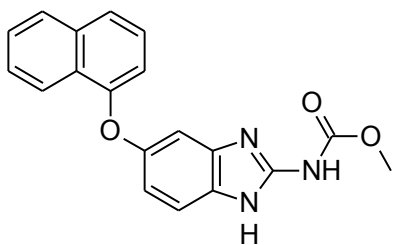




Espectro 26. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(naphthalen-1-iloxy)-1H-imidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG1).



Espectro 27. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5-(nafileno-1-il)oxi)-1*H*-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (**LCG1**).

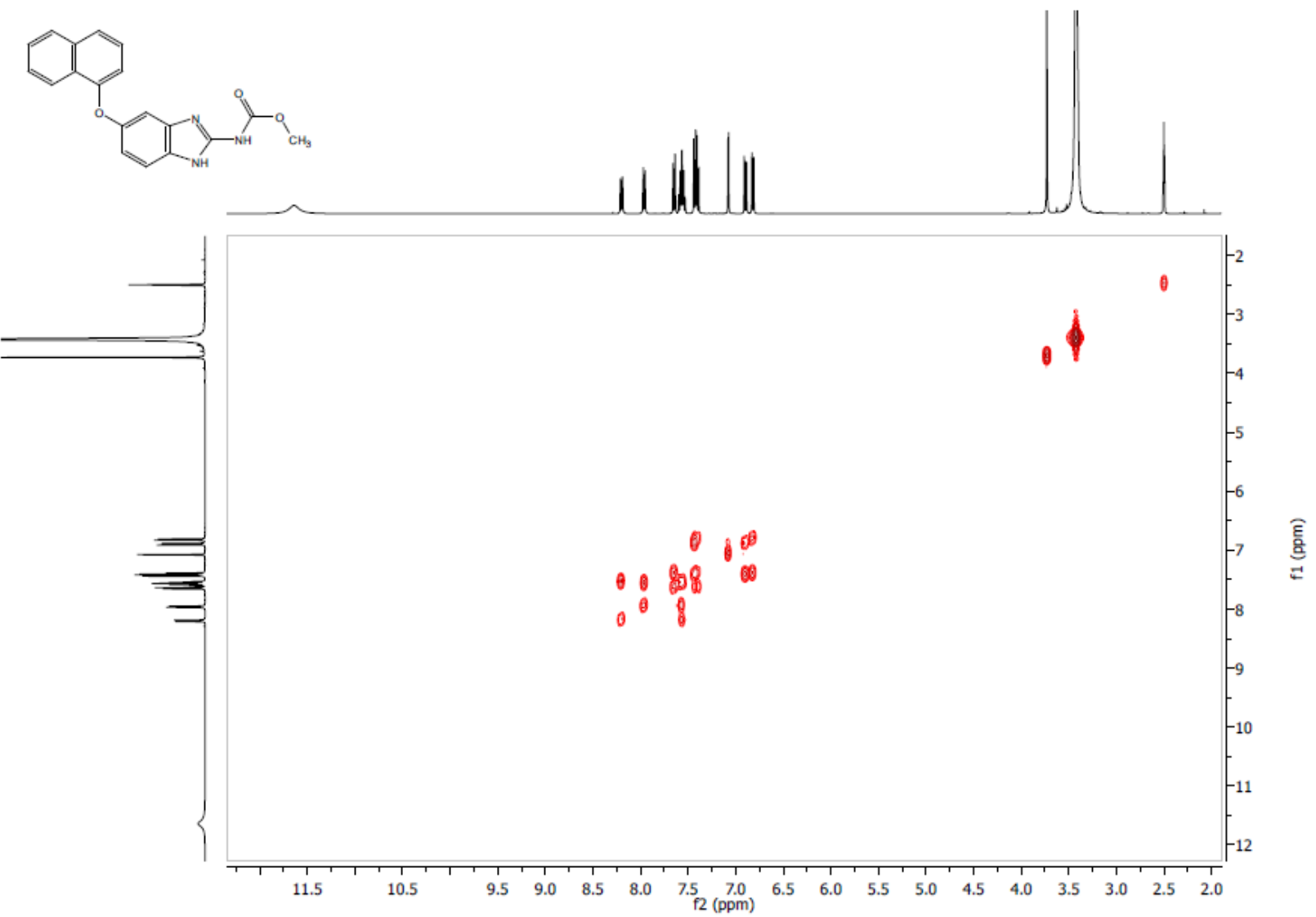


Espectro 28. EM (IE, m/z) del compuesto N-[5-(naffilen-1-iloxy)-1H-bencimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG1).

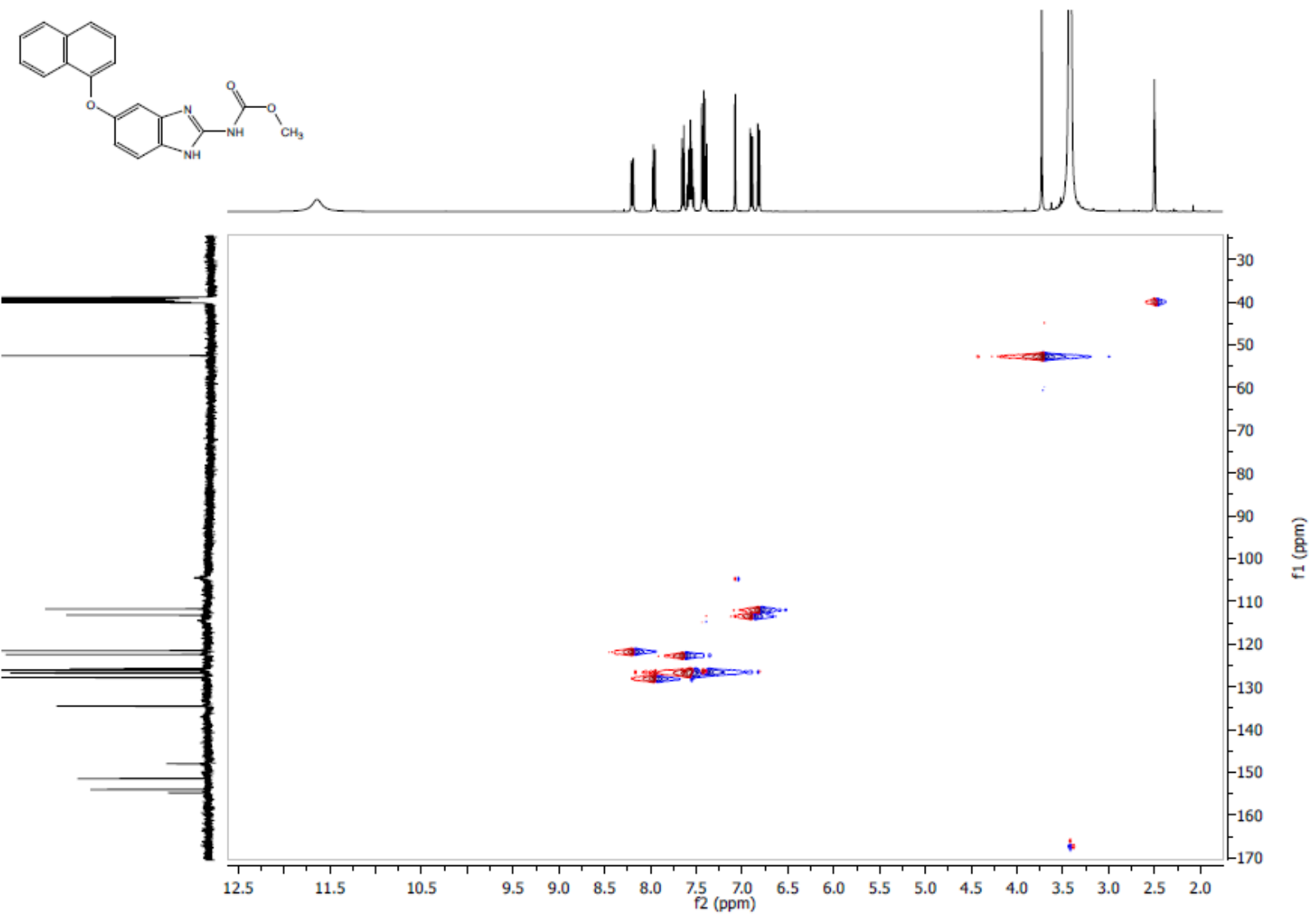
D:\Xcalibur\data\USAND\RMLPL1_1_1
szComment

10/21/2014 1:34:21 PM

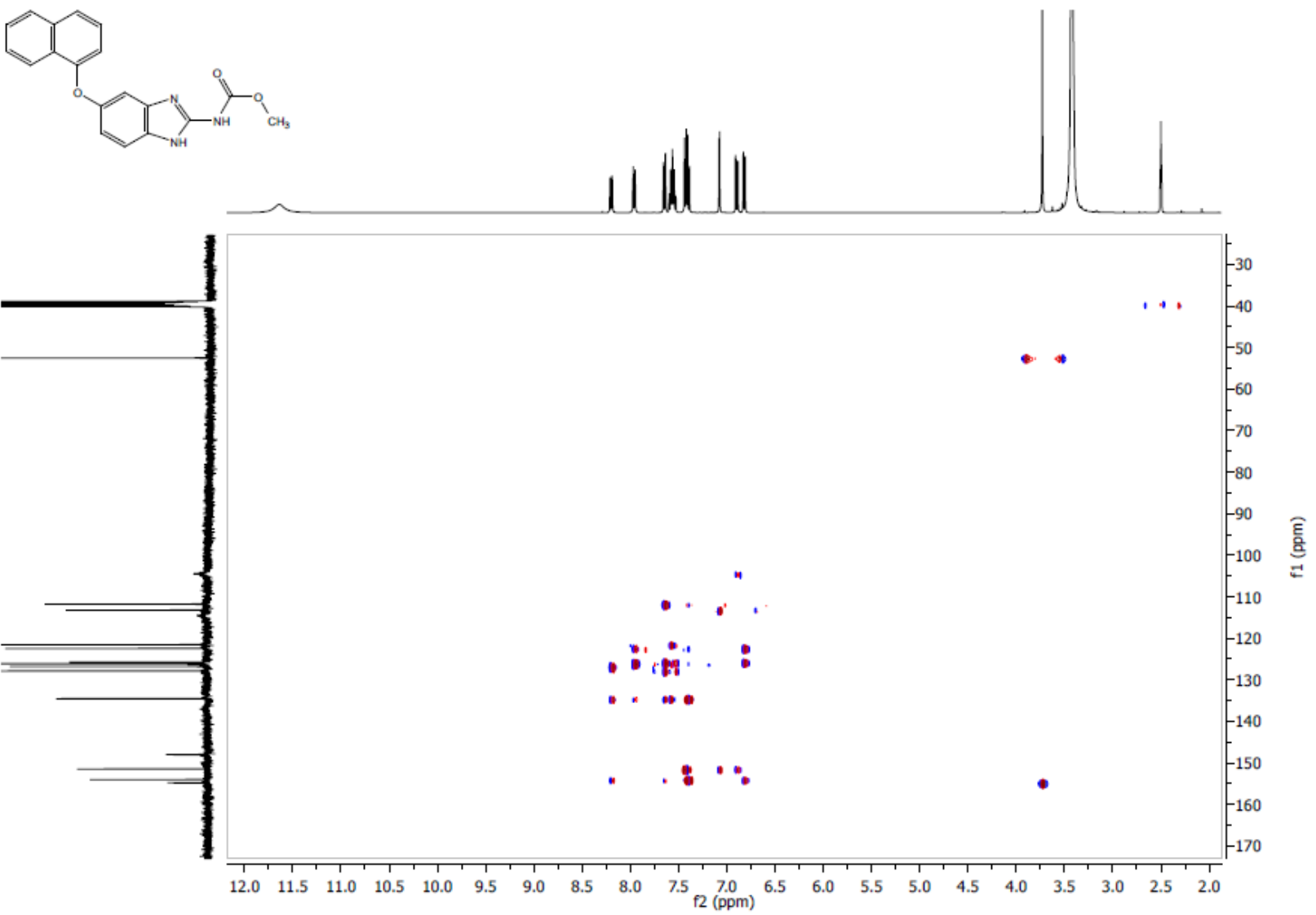
RMLPL1_1_1 #9 RT: 0.88 AV: 1 SB: 11 2.08-3.17 NL: 2.30E6
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]



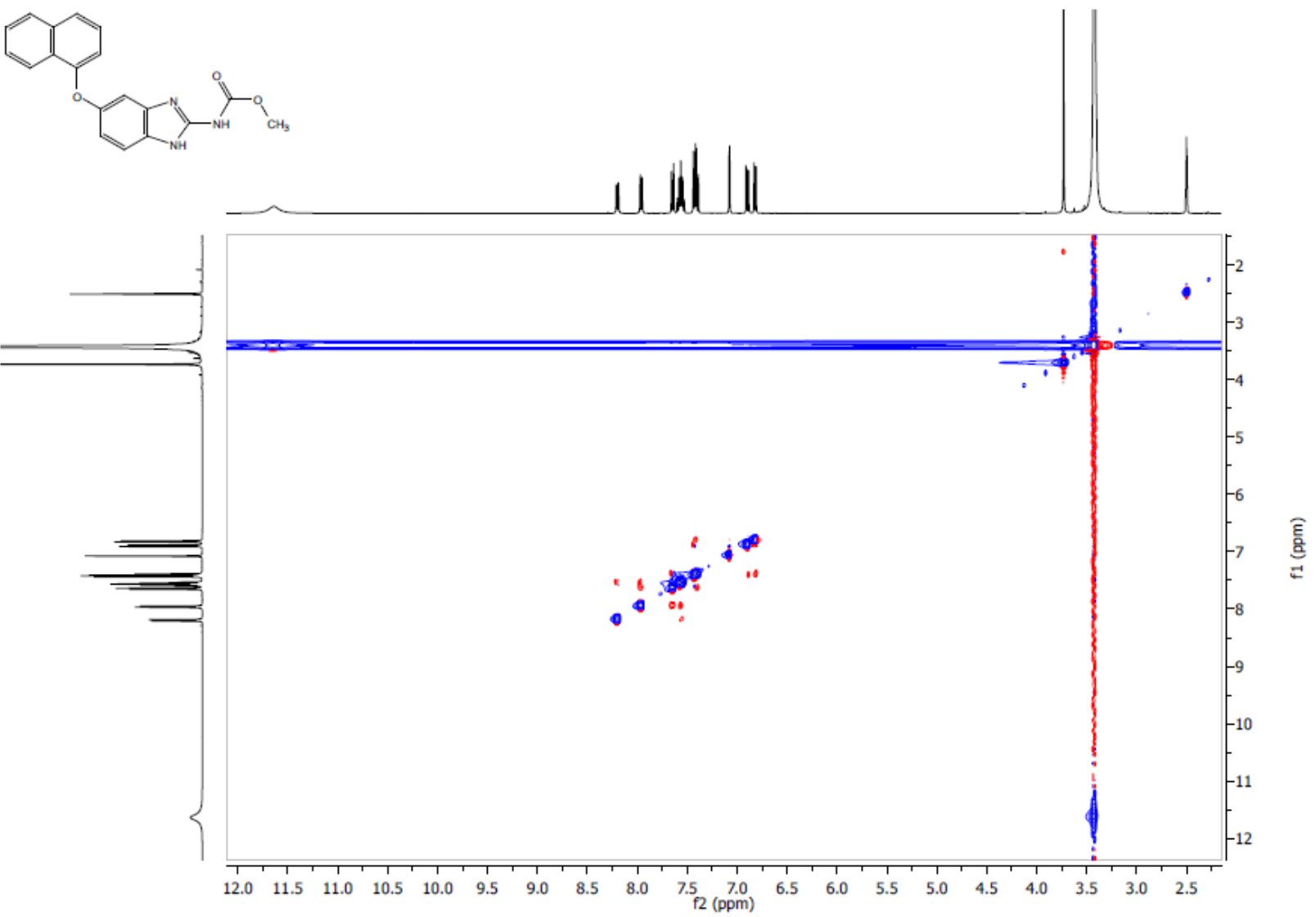
Espectro 29. Experimento COSY del compuesto *N*-[5-(naftilén-1-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG1).



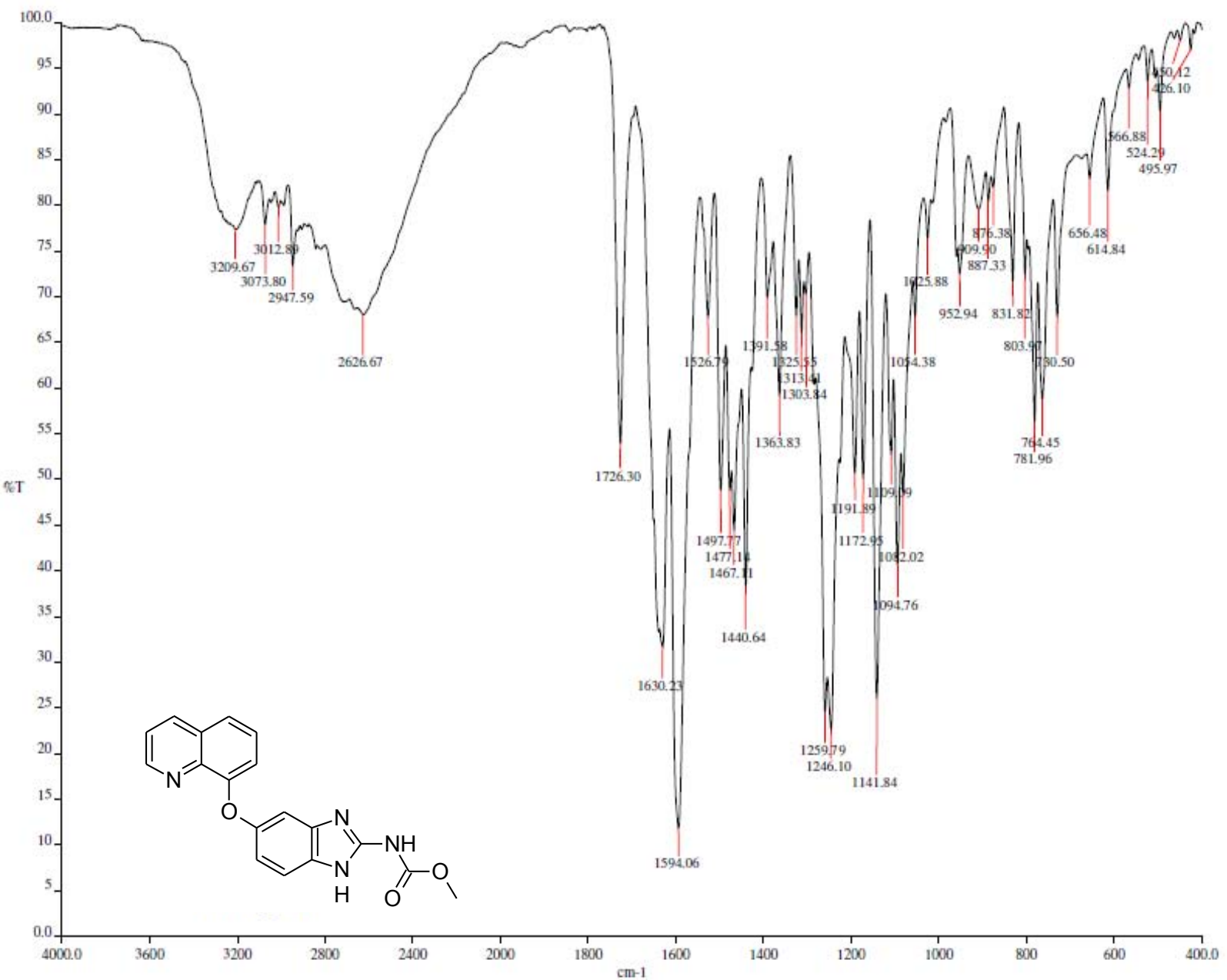
Espectro 30. Experimento HSQC del compuesto *N*-[5-(naflien-1-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-*il*]carbamato de metilo (LCG1).



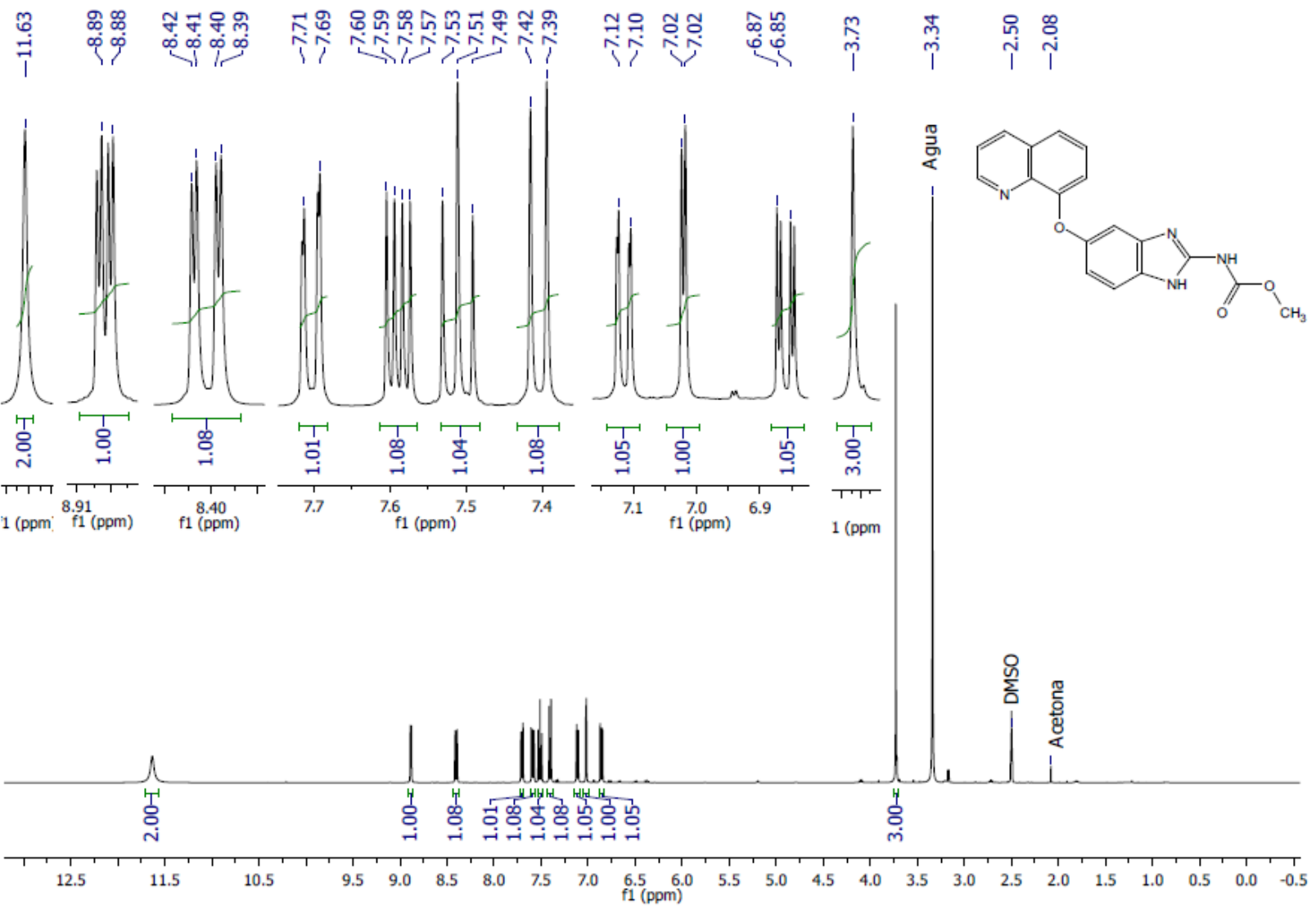
Espectro 31. Experimento HMBC del compuesto *N*-[5-(naphthalen-1-iloxi)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG1).



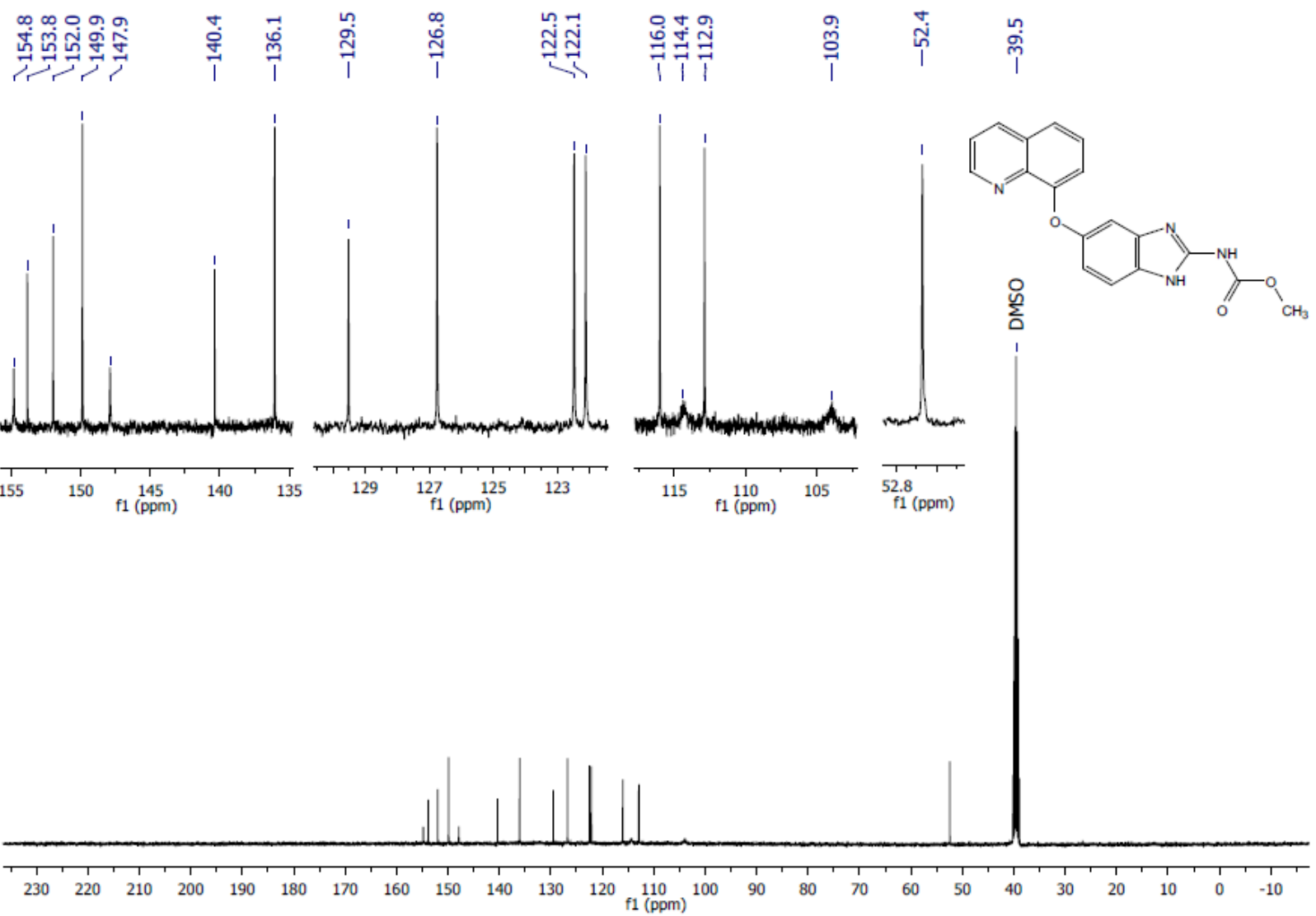
Espectro 32. Experimento NOESY del compuesto *N*-[5-(nattien-1-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG1).



Espectro 33. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto *N*-[5-(quinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG2).



Espectro 34. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(quinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG2**).



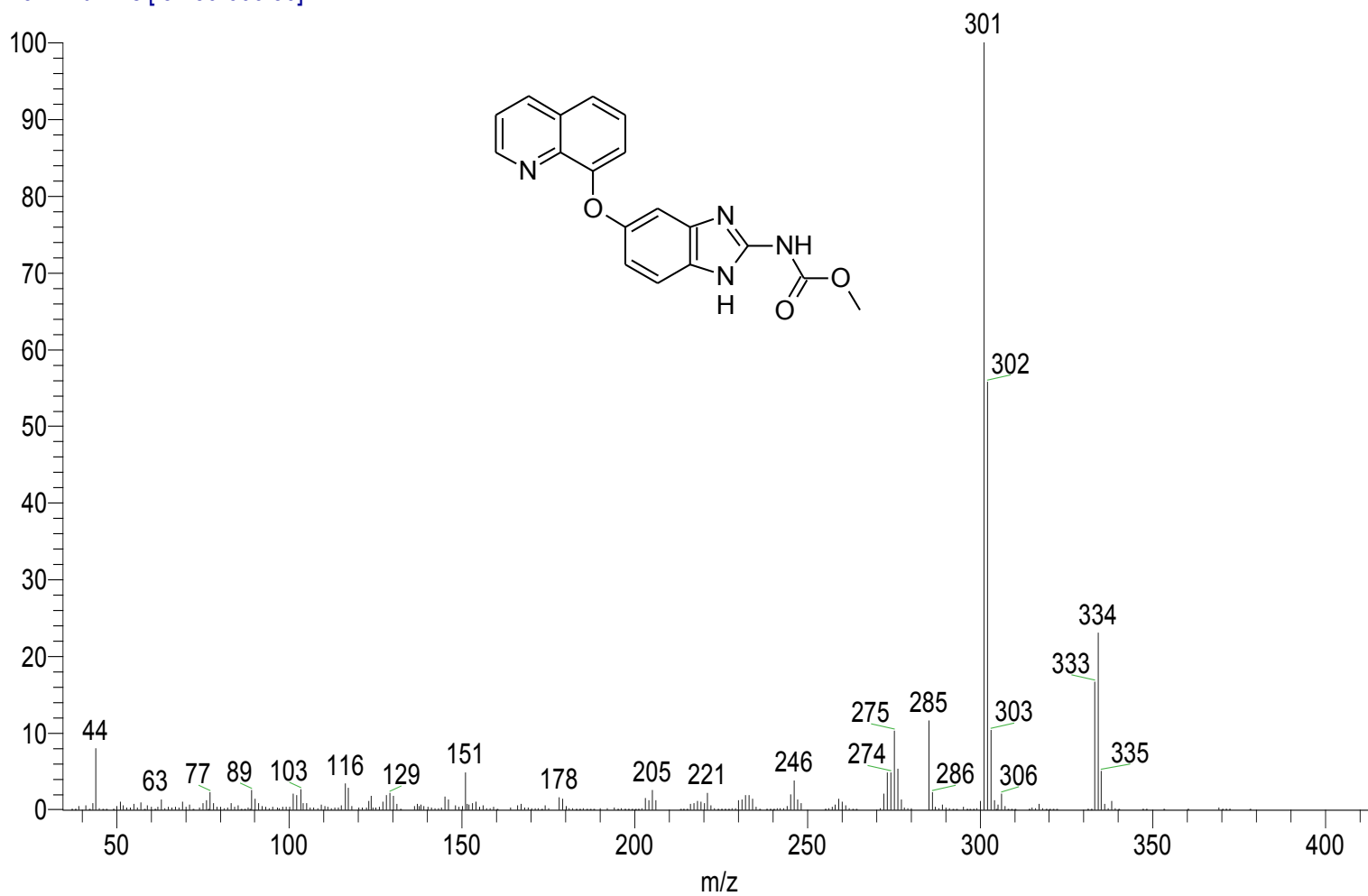
Espectro 35. RMN ¹³C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(5-(quinolin-8-iloxy)-1H-benzimidazol-2-yl)carbamato de metilo (LCG2).

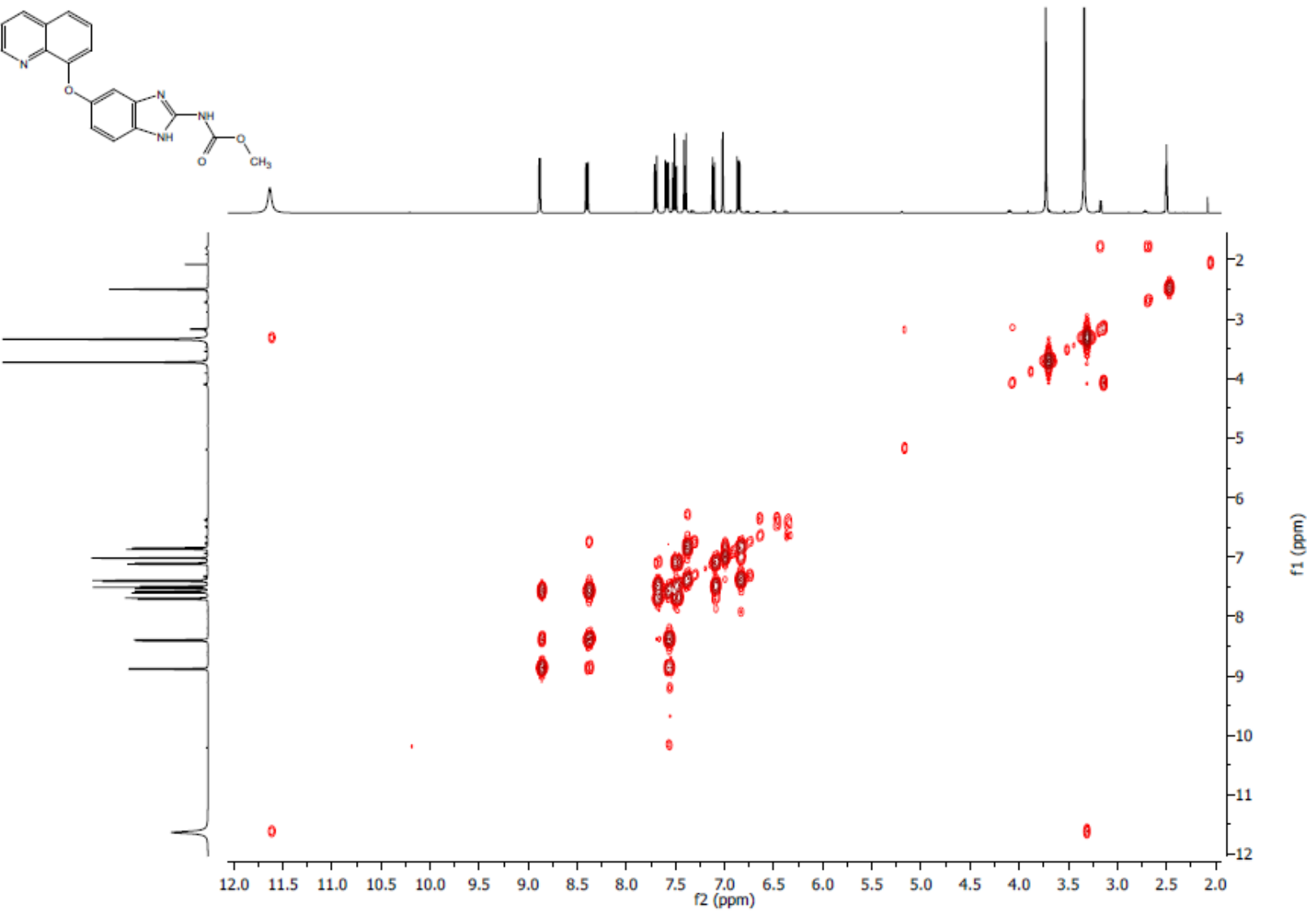
Espectro 36. EM (IE, m/z) del compuesto *N*-[5-(quinolin-8-iloxy)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG2).

D:\Xcalibur\data\USAIND\RMLPL2__1_1
szComment

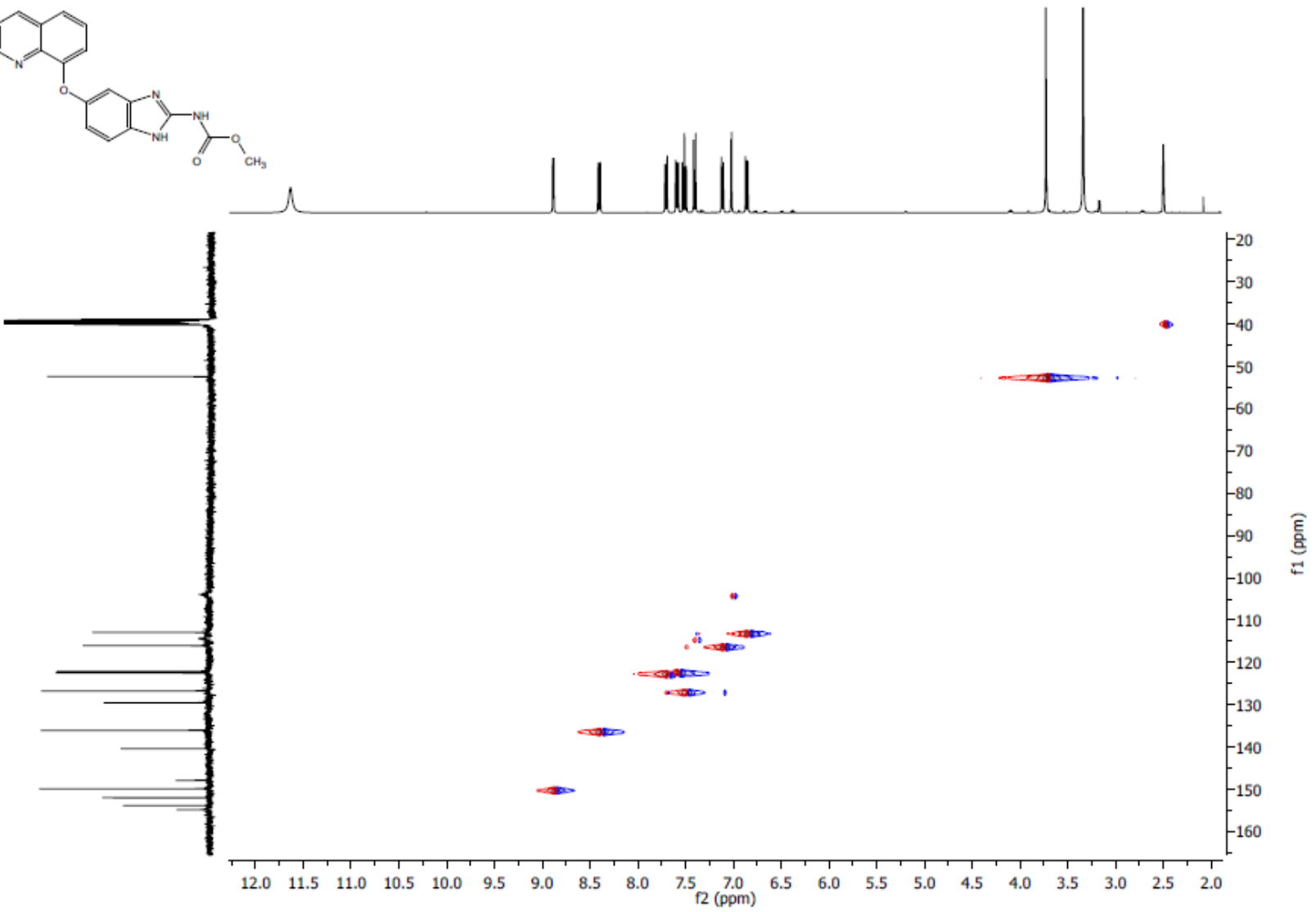
10/21/2014 2:07:50 PM

RMLPL2__1_1 #11-13 RT: 1.09-1.31 AV: 3 SB: 11 3.71-4.80 NL: 4.39E6
T: + c EI Full ms [32.50-600.50]

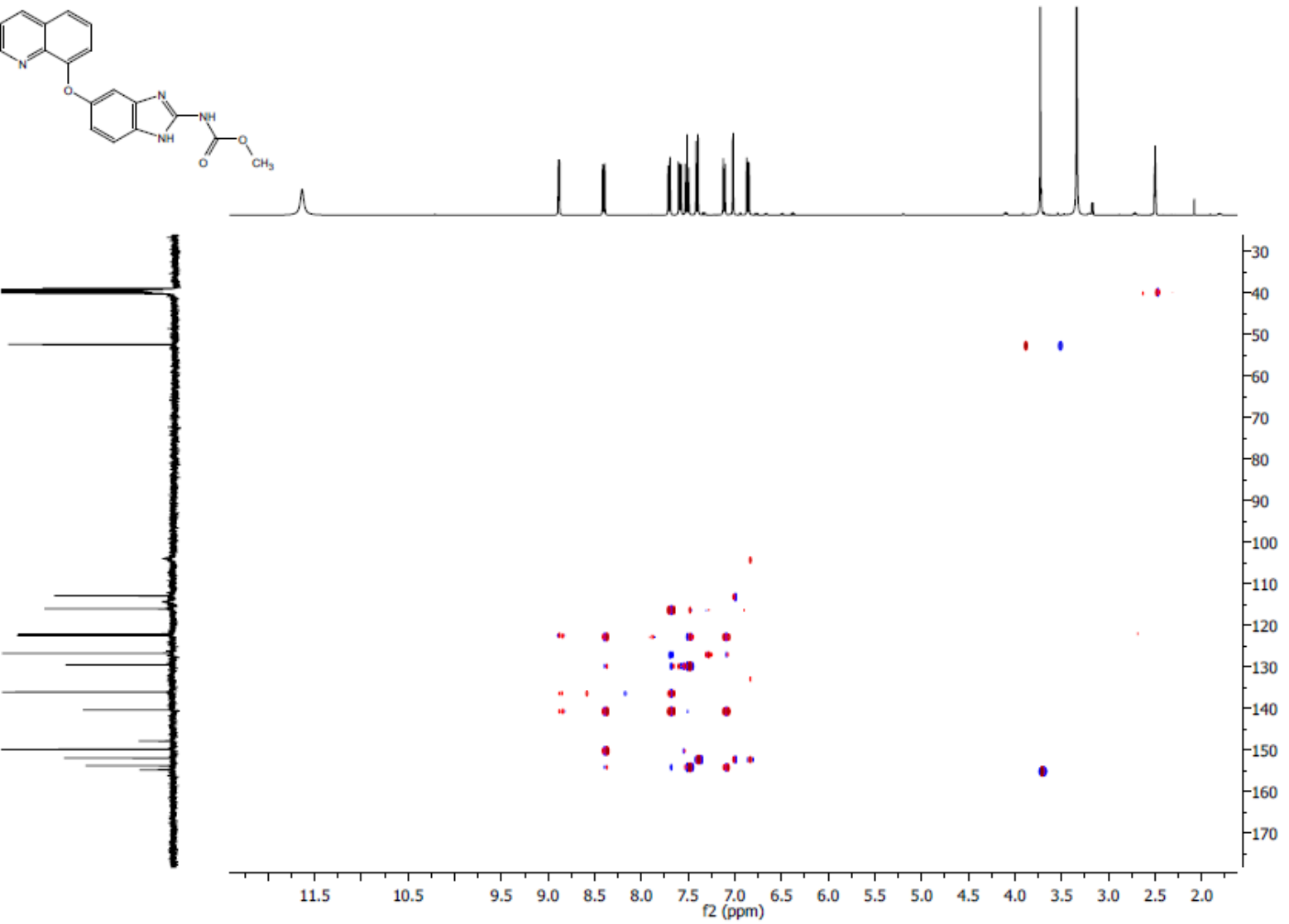




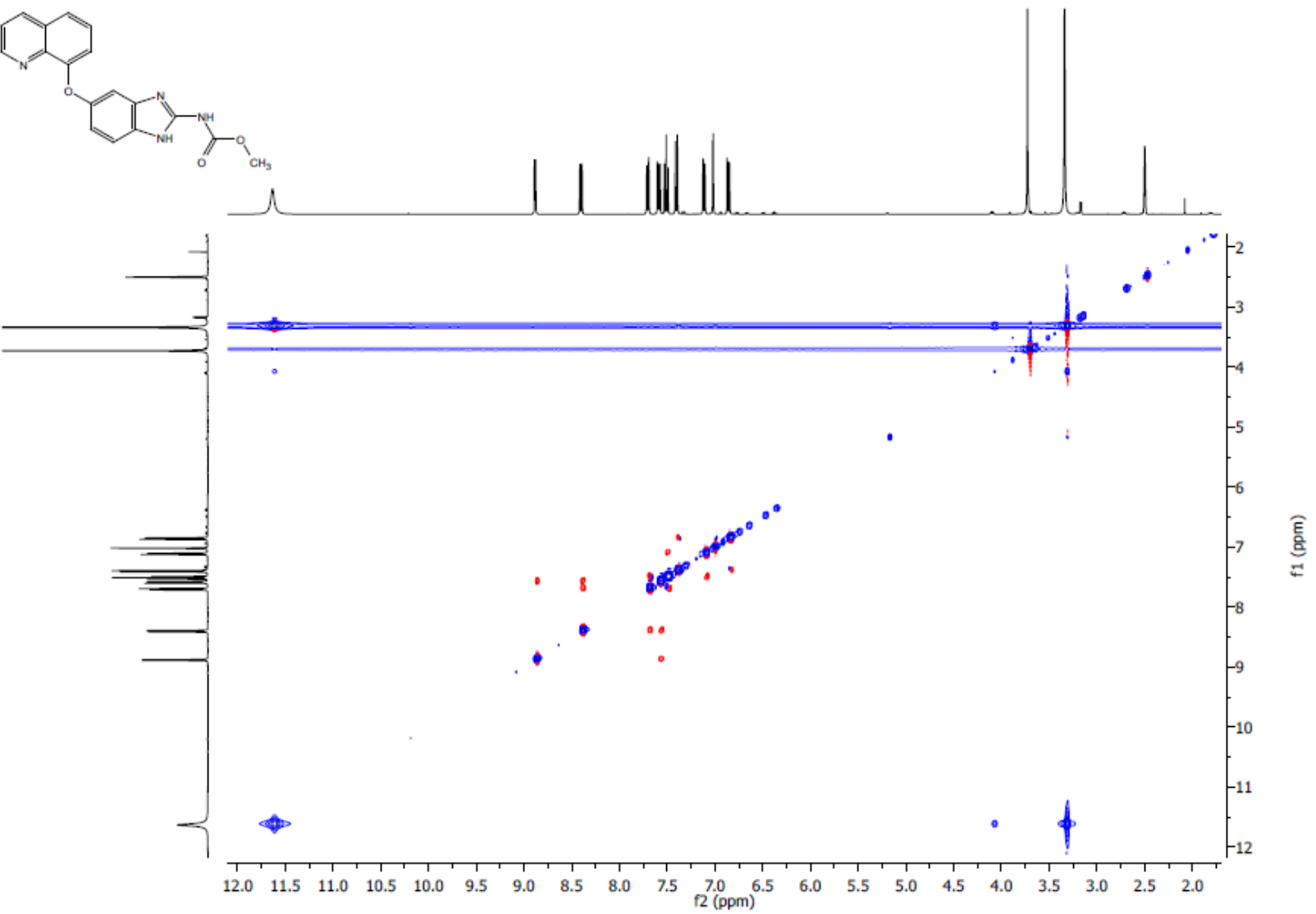
Espectro 37. Experimento COSY del compuesto N-[5-(quinolin-8-iloxi)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG2).



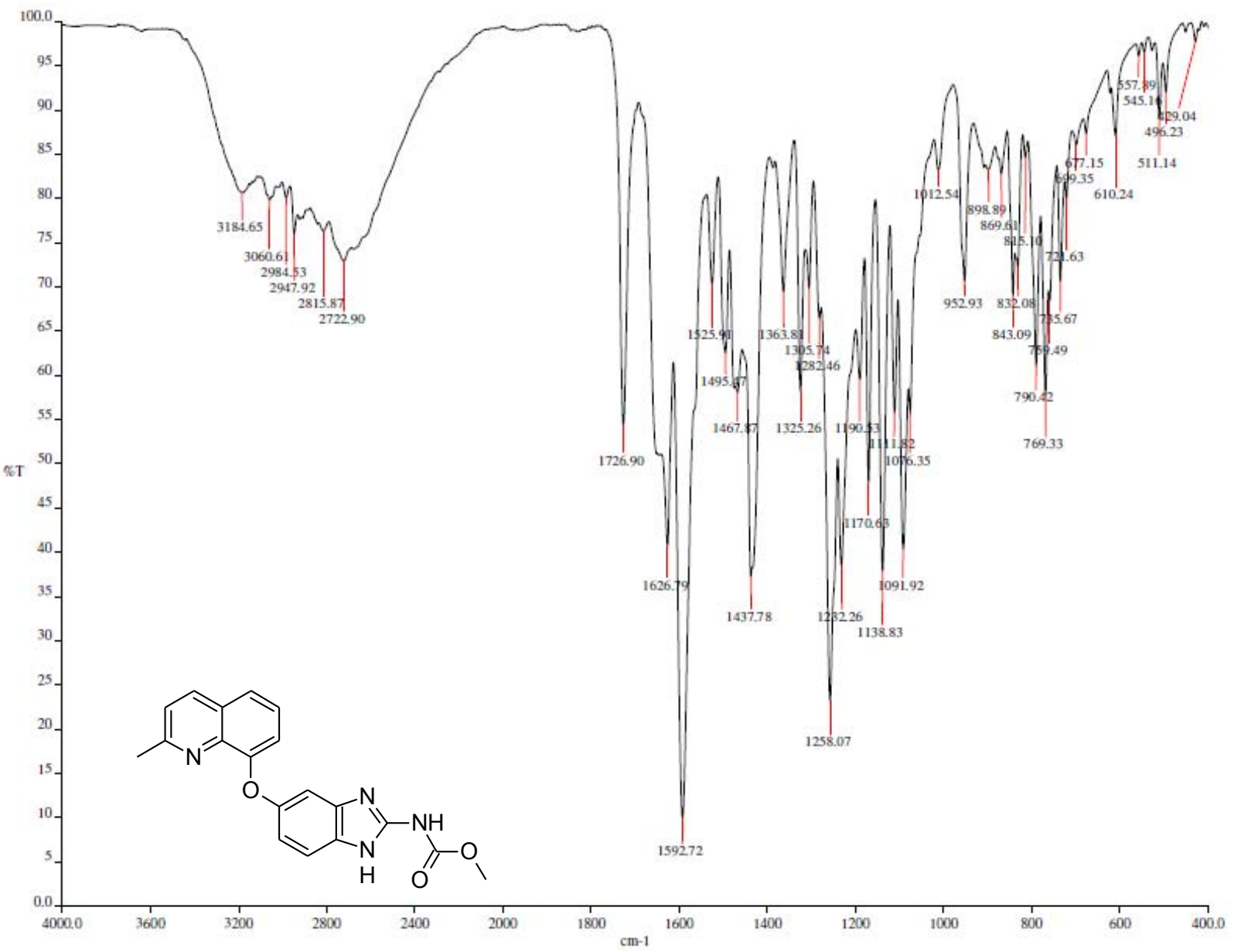
Espectro 38. Experimento HSQC del compuesto *N*-[5-(quinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG2).



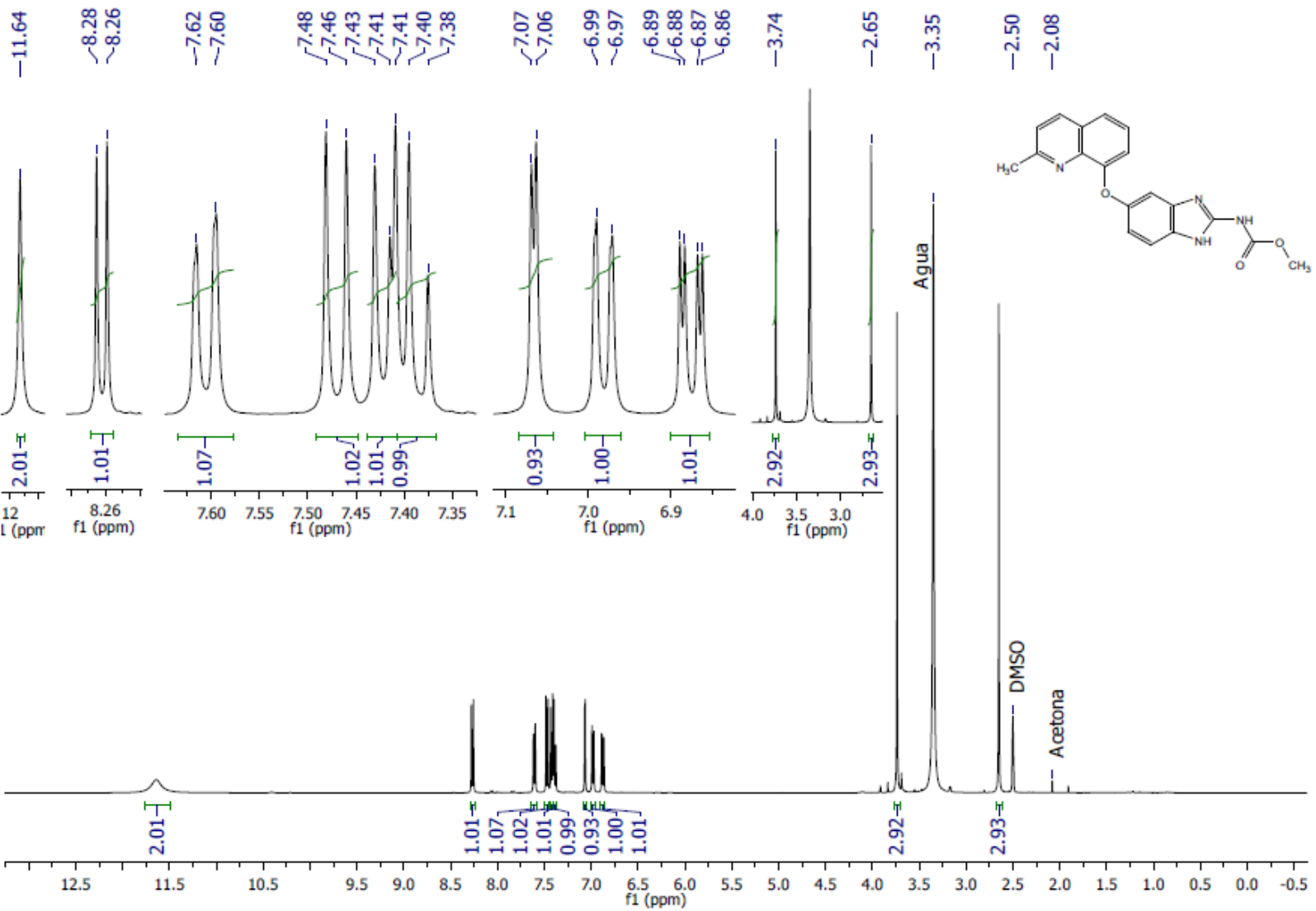
Espectro 39. Experimento HMBC del compuesto *N*-(5-(quinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-yl)carbamato de metilo (LCG2).



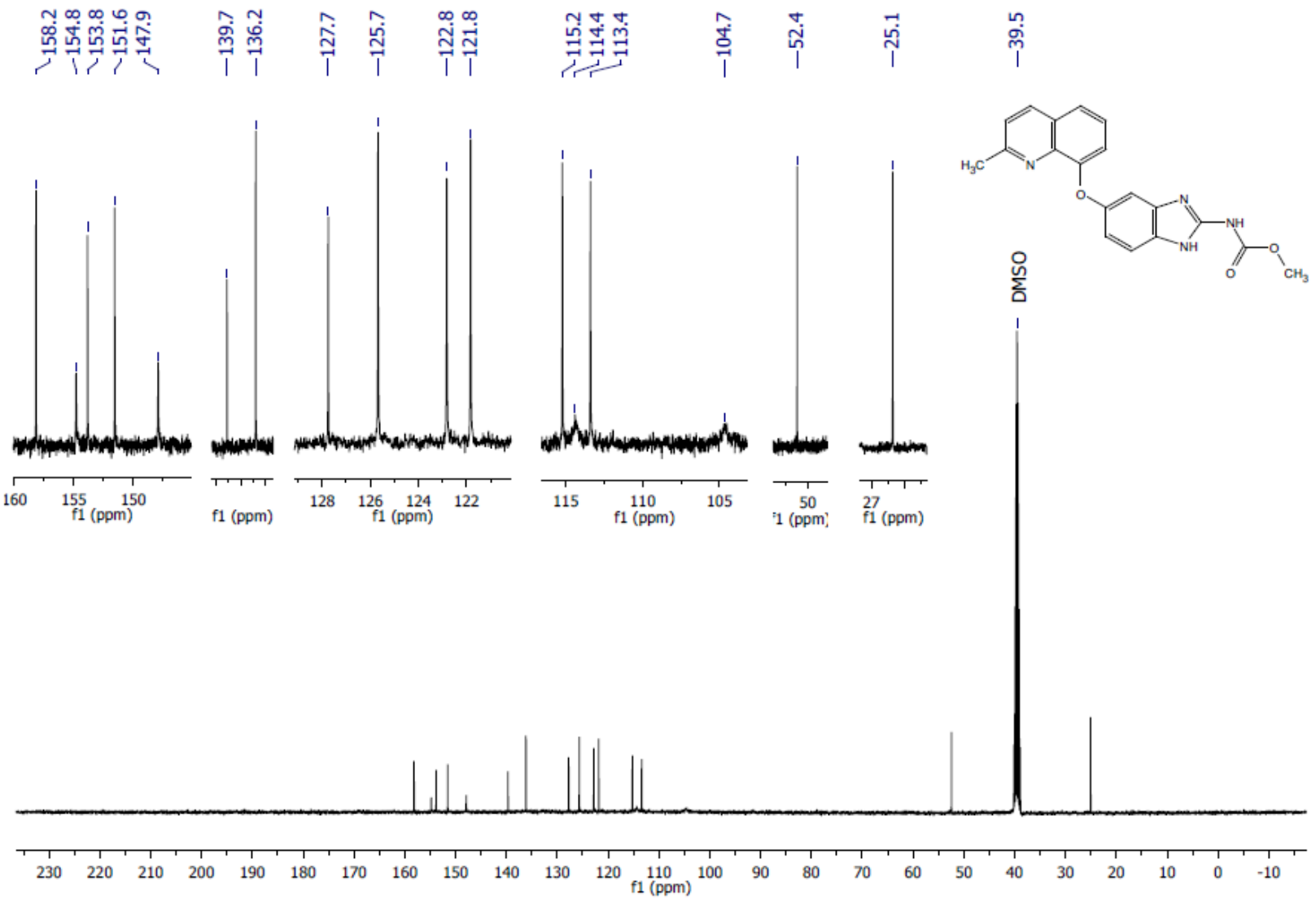
Espectro 40. Experimento NOESY del compuesto *N*-[5-(quinolin-8-iloxy)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG2).



Espectro 41. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG3).

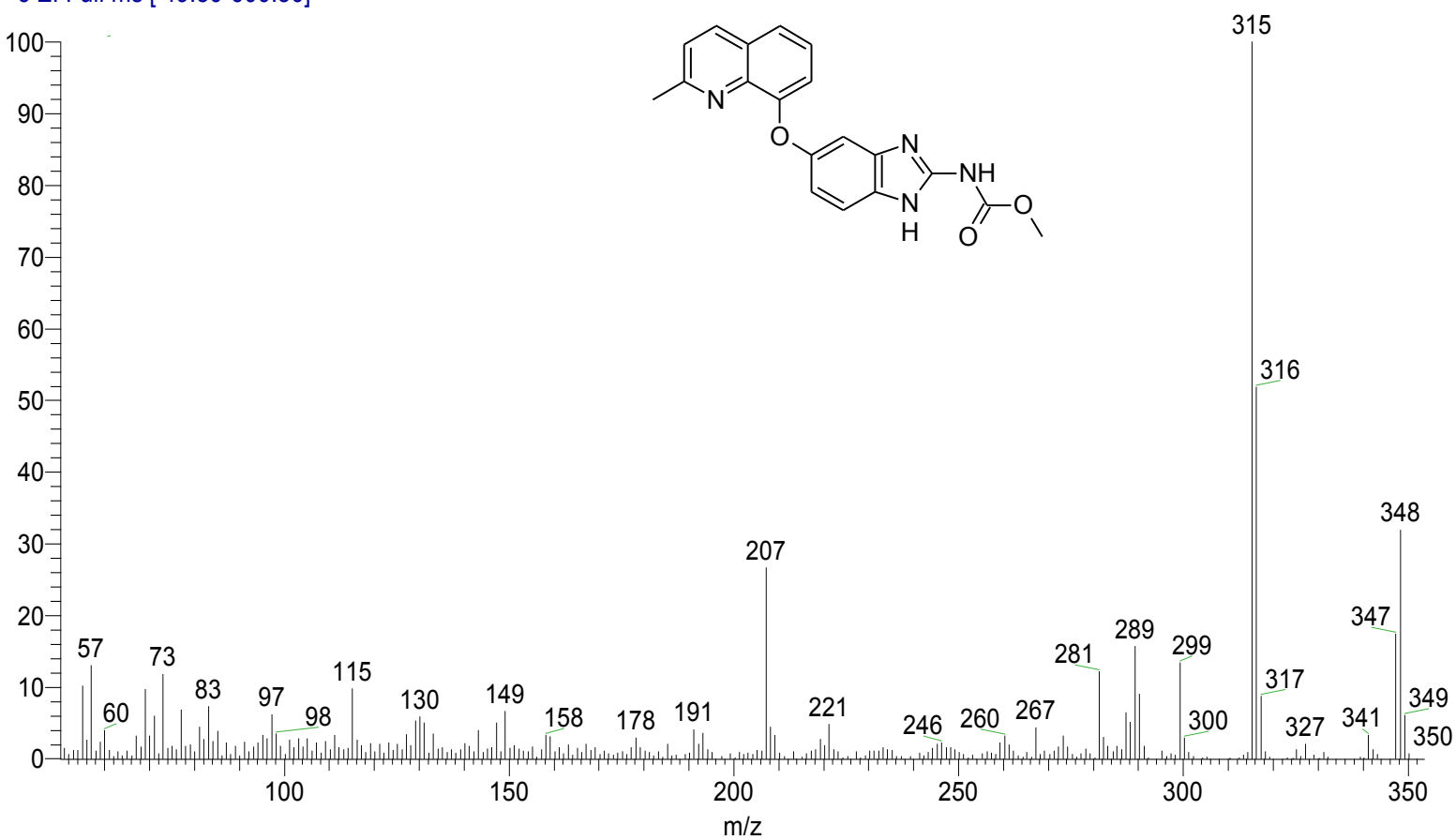
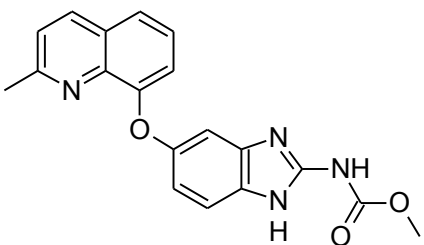


Espectro 42. RMN ¹H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG3**).

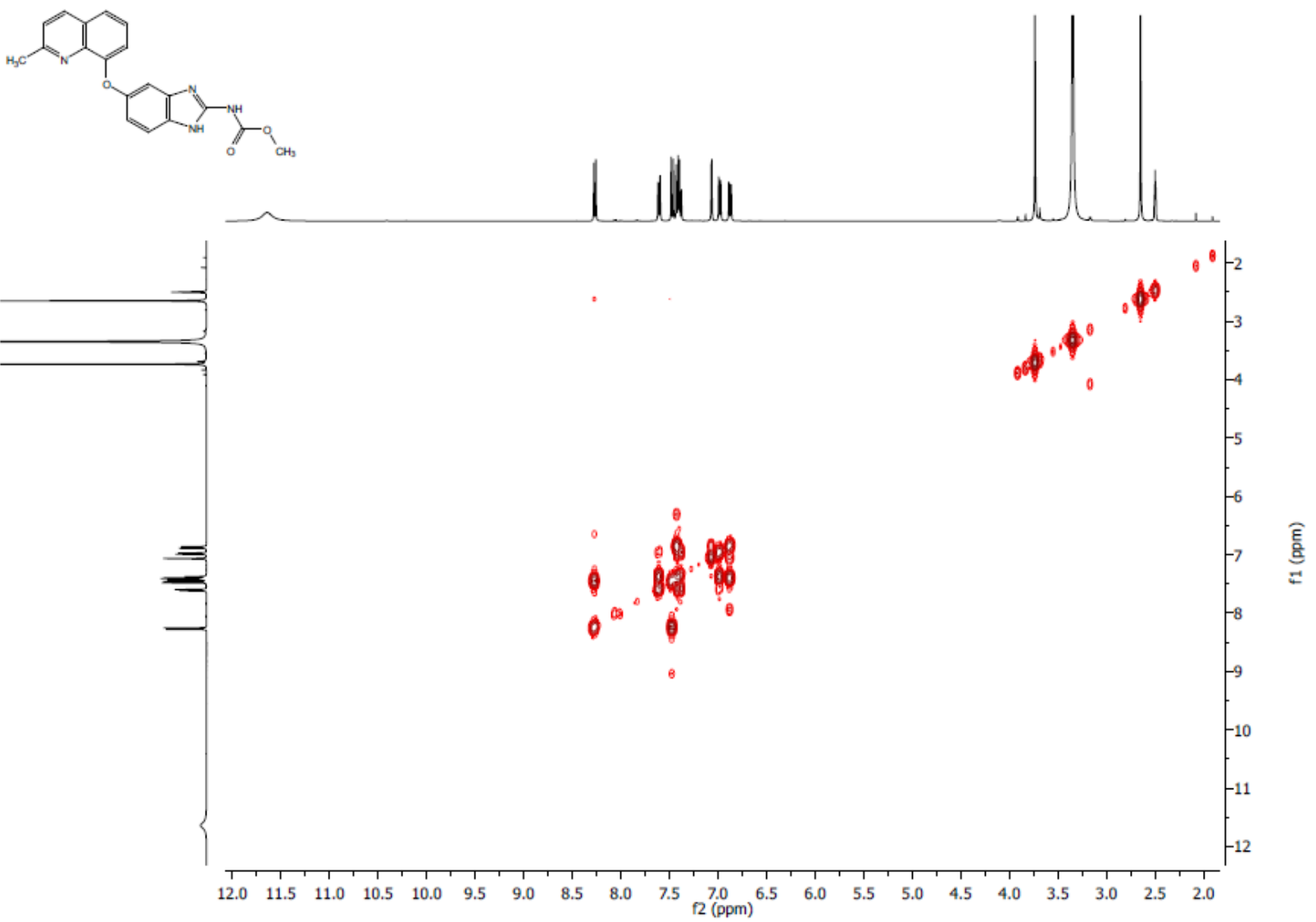


Espectro 43. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG3**).

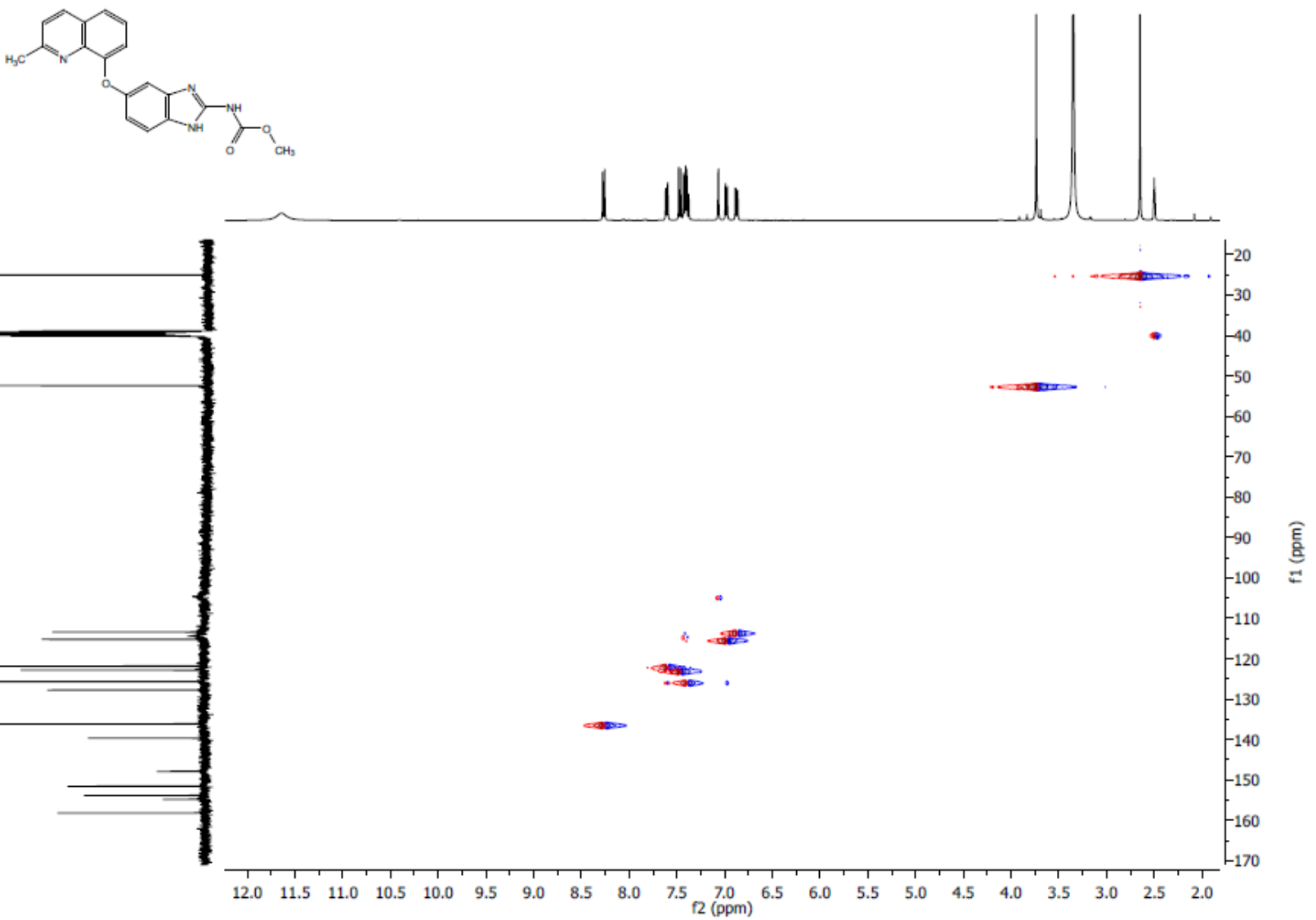
1/27/2015 3:49:30 PM

D:\Xcalibur\data\USA\ID\LCG03__1
szCommentLCG03__1 #12-14 RT: 1.04-1.23 AV: 3 NL: 1.29E5
T: + c EI Full ms [49.50-600.50]

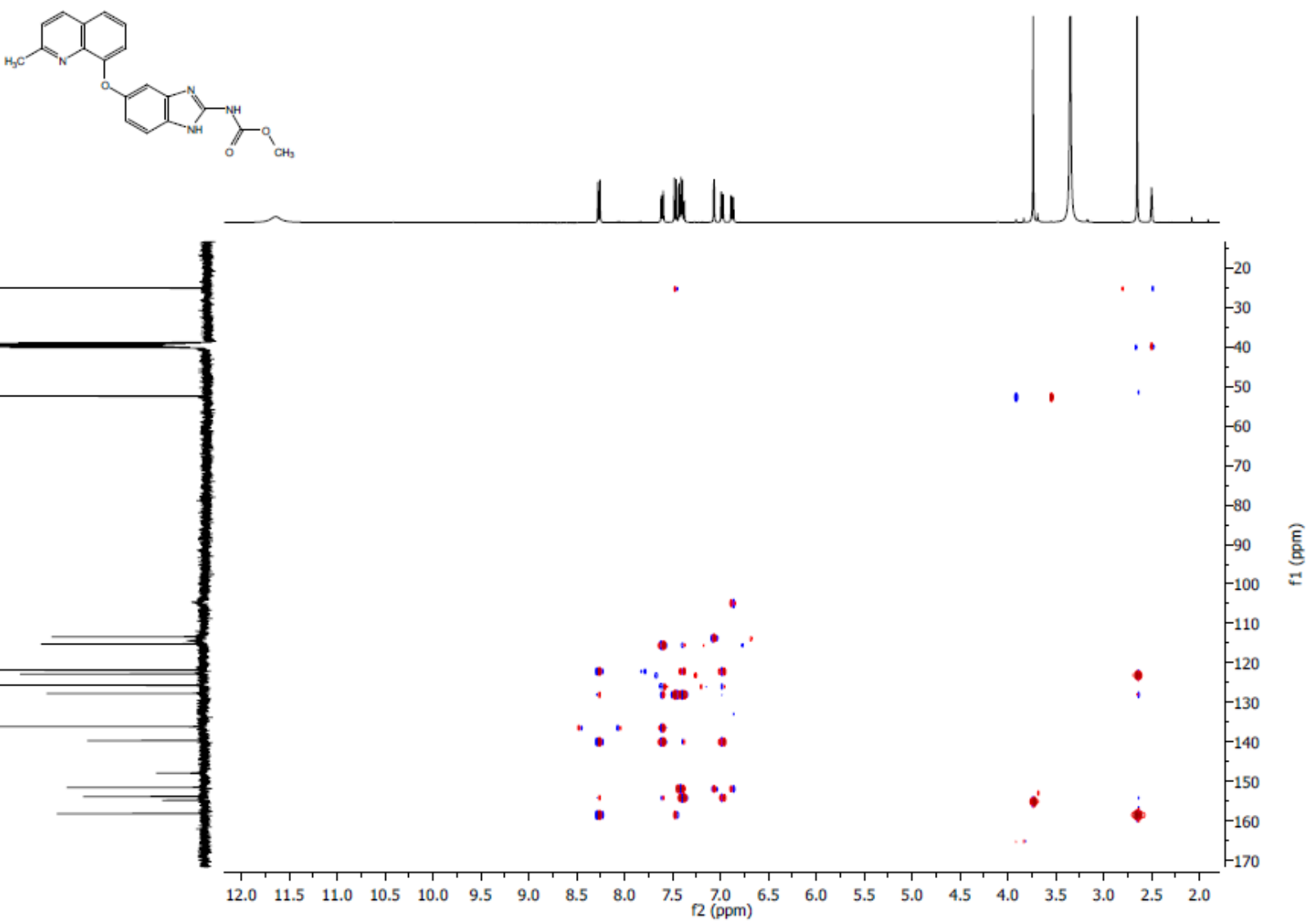
Espectro 44. EM (IE, m/z) del compuesto N-[5-(2-metilquinolin-8-iloxy)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG3).



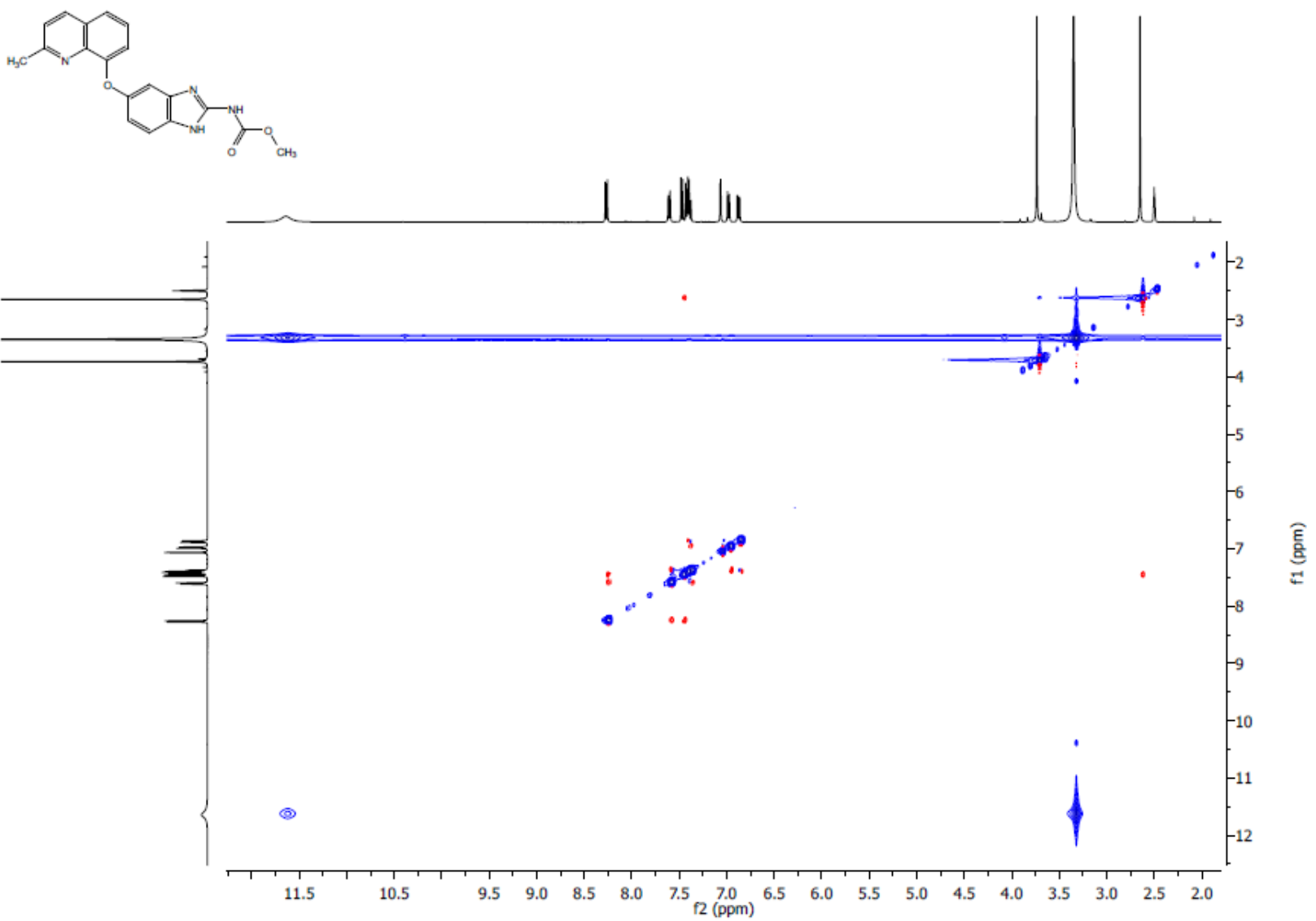
Espectro 45. Experimento COSY del compuesto *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG3).



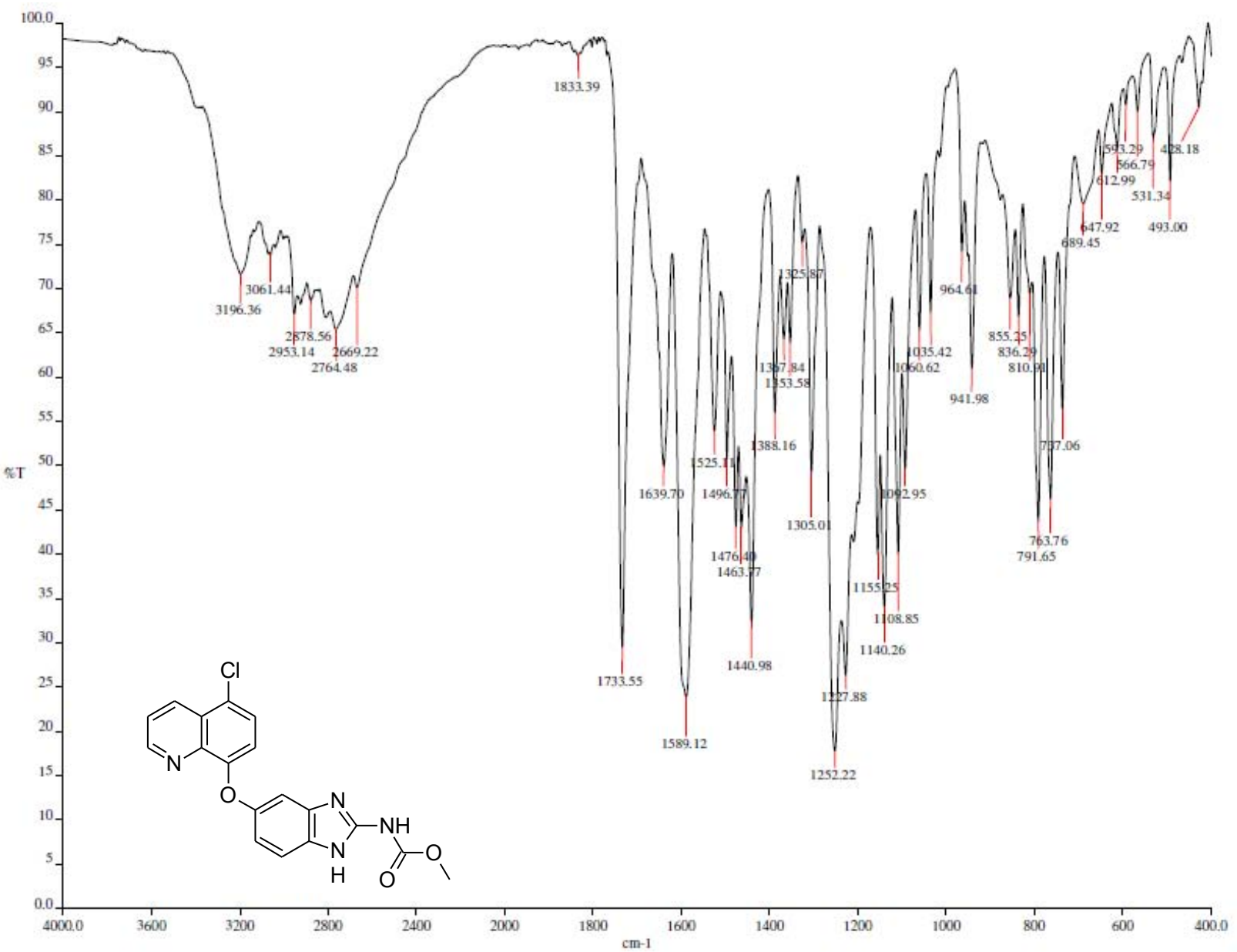
Espectro 46. Experimento HSQC del compuesto *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG3).



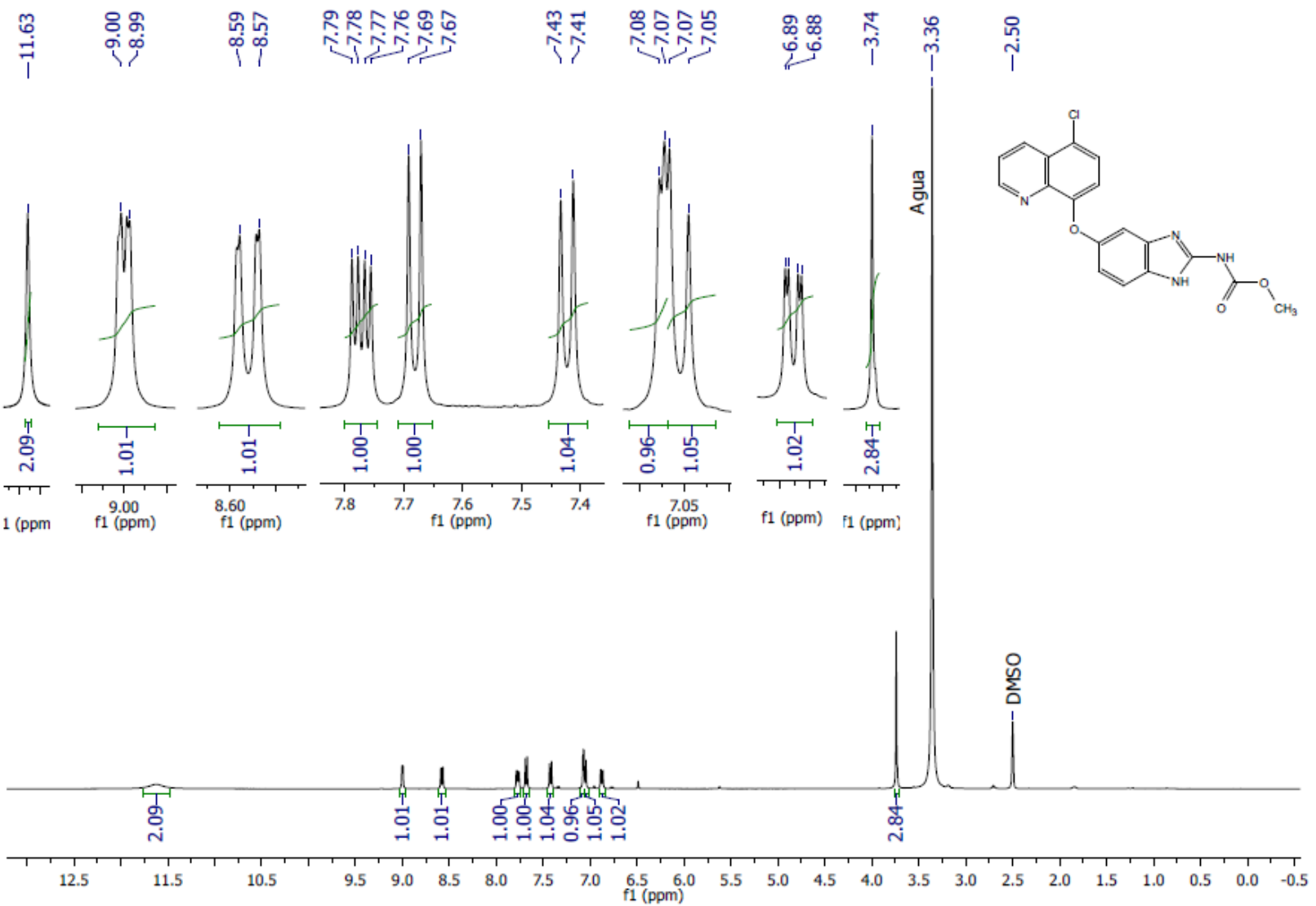
Espectro 47. Experimento HMBC del compuesto N-[5-(2-metilquinolin-8-iloxy)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG3).



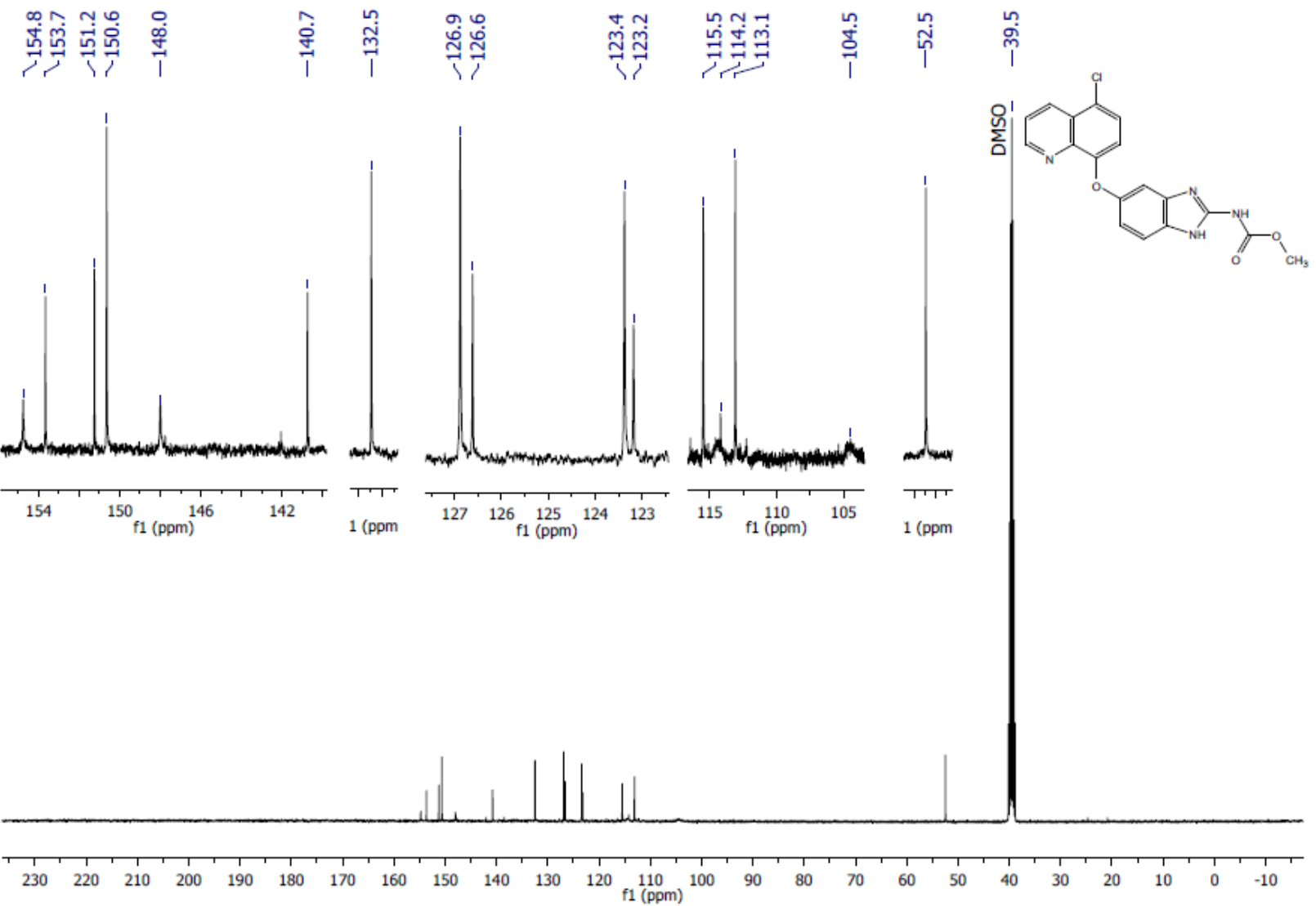
Espectro 48. Experimento NOESY del compuesto *N*-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG3).



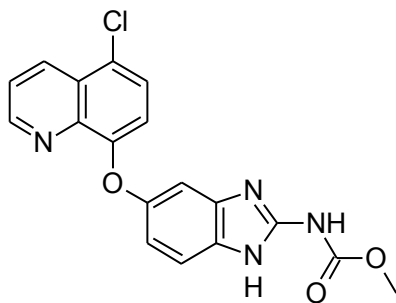
Espectro 49. IR (ATR, cm^{-1}) del compuesto *N*-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG4).



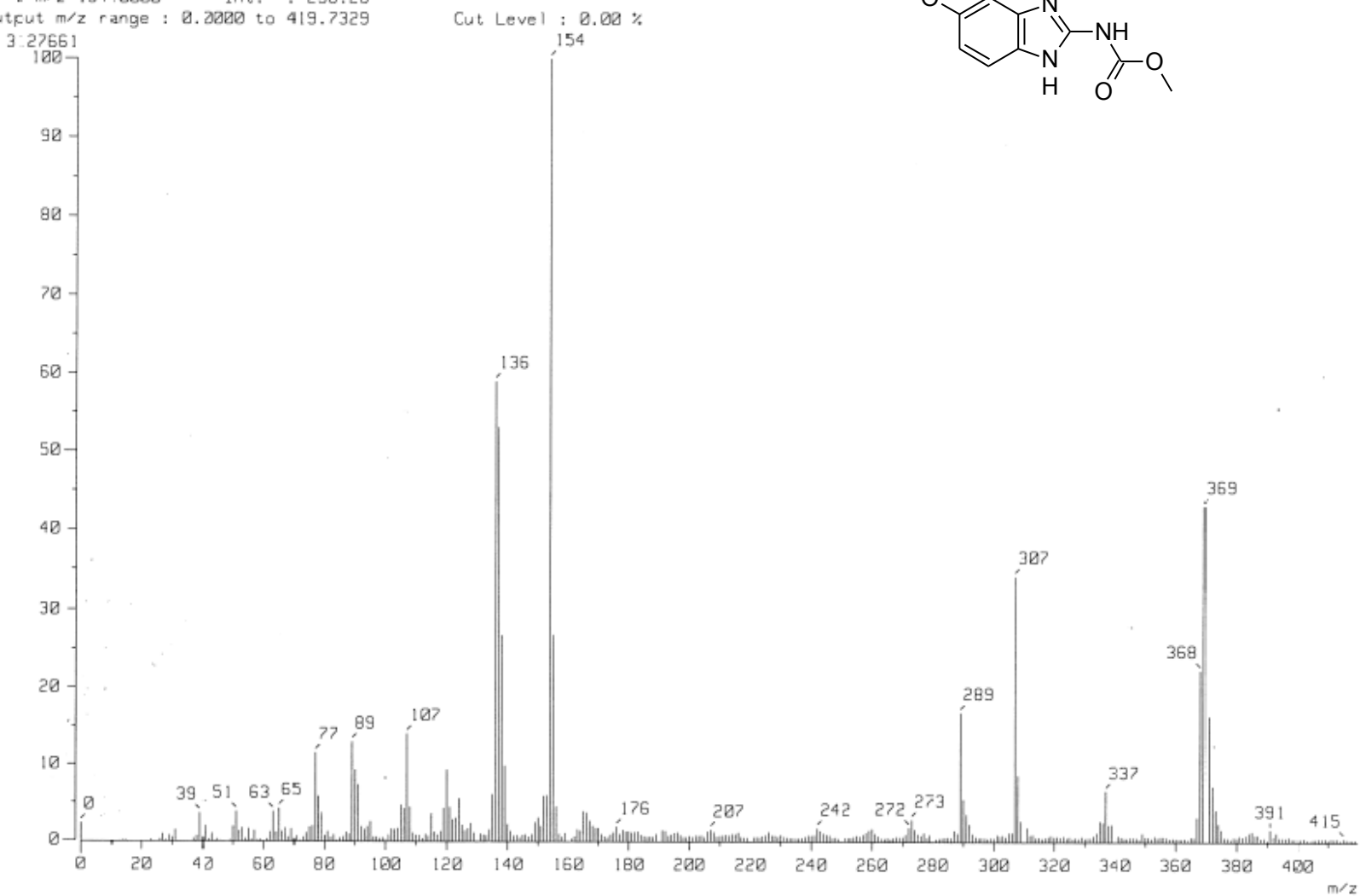
Espectro 50. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxy)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG4).



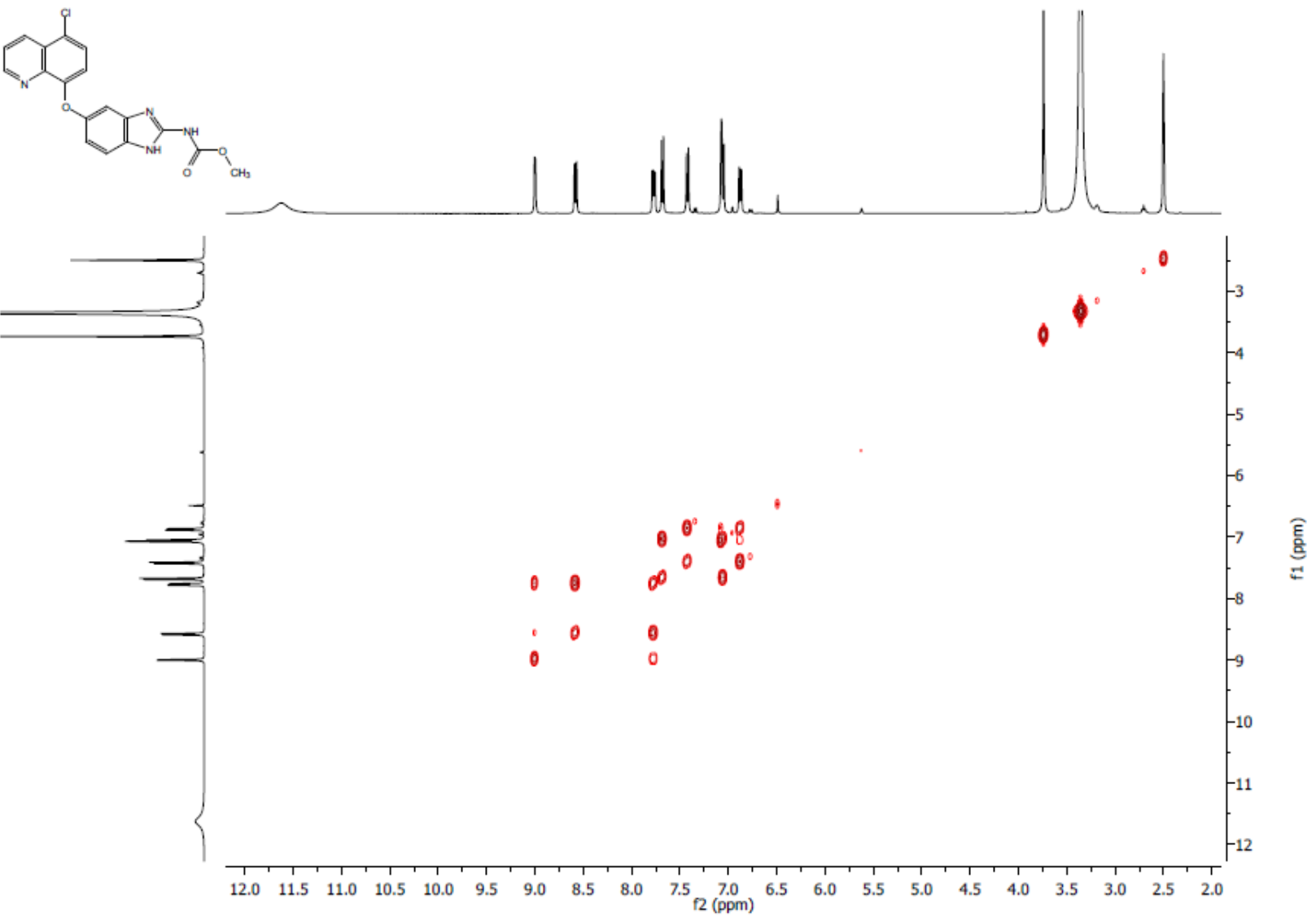
Espectro 51. RMN ¹³C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG4).



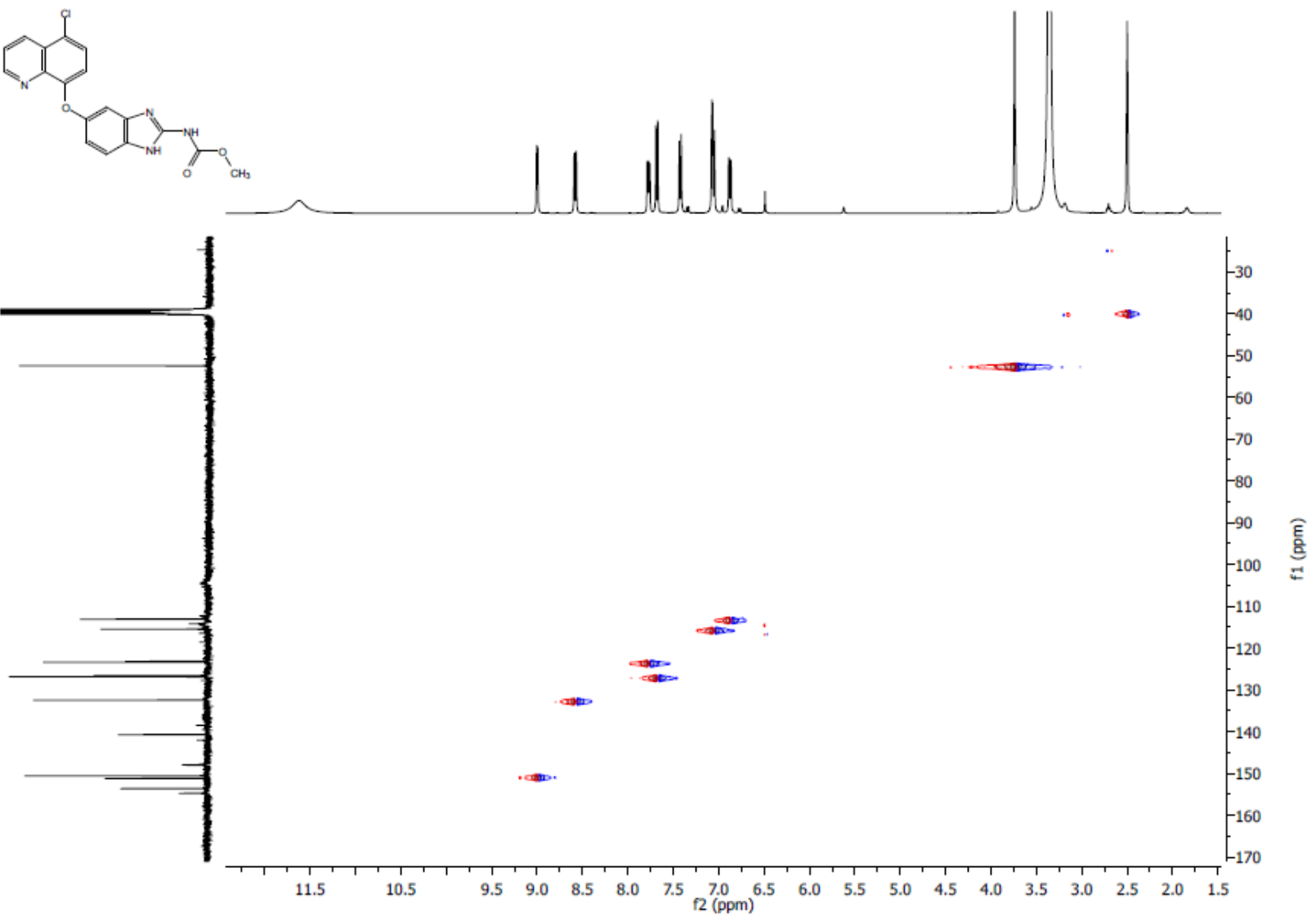
[Mass Spectrum]
Data : Dr-Rafael-Castillo004 Date : 11-Feb-2015 19:46
Sample: 290-5TE-4886 LCG4
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.24 min Scan# : (2,8)
BP : m/z 154.0000 Int. : 298.28
Output m/z range : 0.2000 to 419.7329



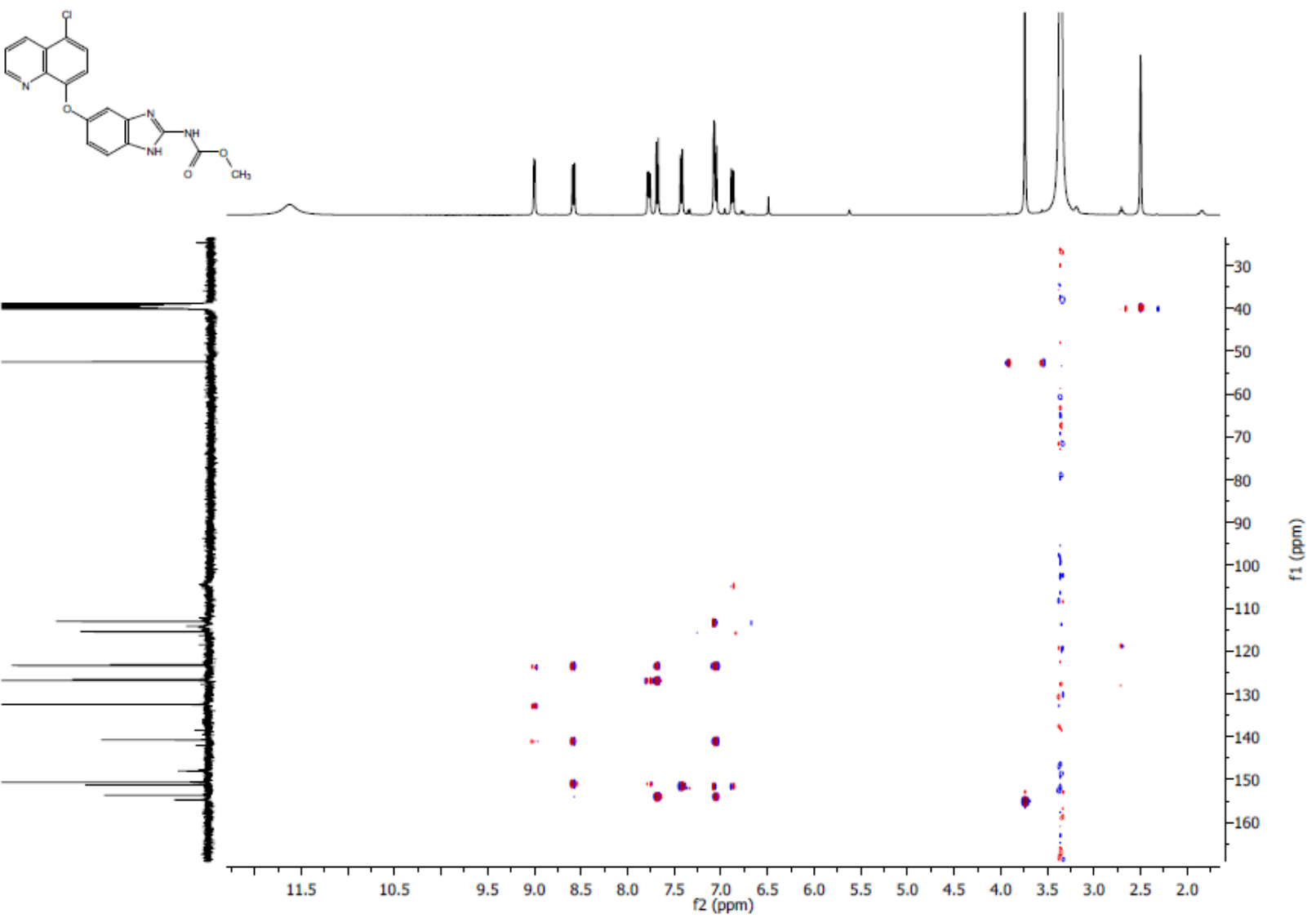
Espectro 52. EM (FAB⁺, m/z) del compuesto N-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG4).



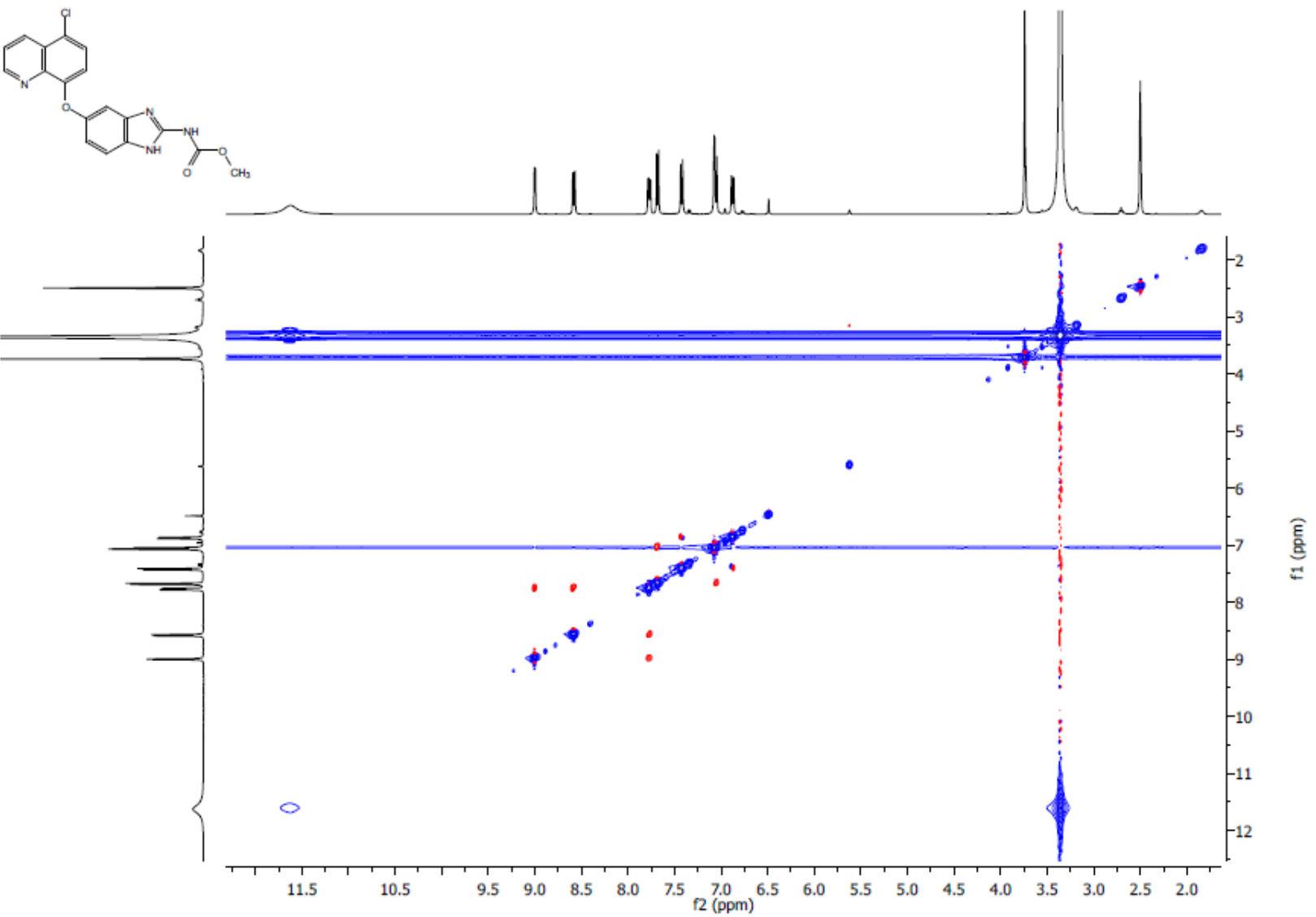
Espectro 53. Experimento COSY del compuesto *N*-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG4**).



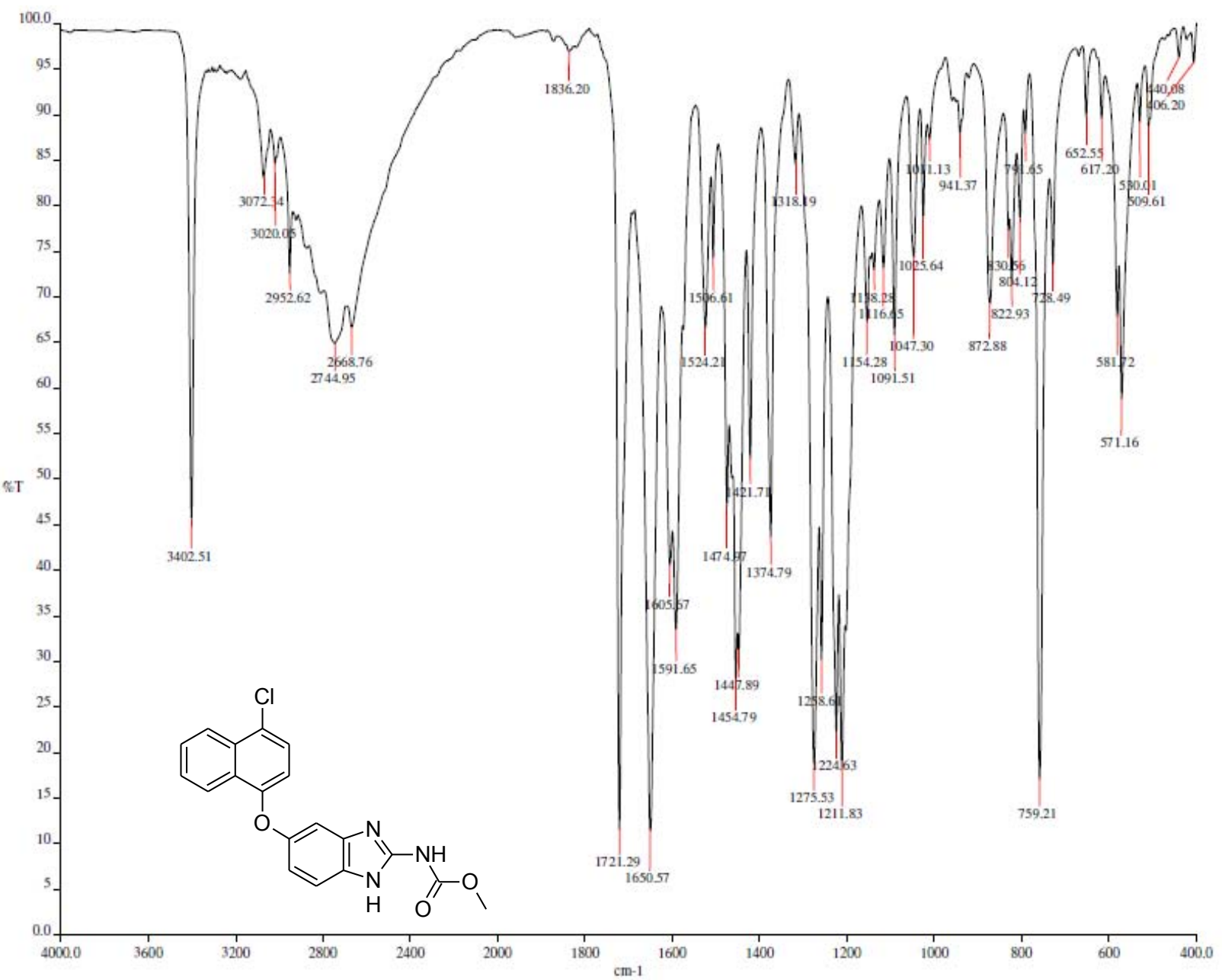
Espectro 54. Experimento HSQC del compuesto *N*-(5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-yl)carbamato de metilo (LCG4).



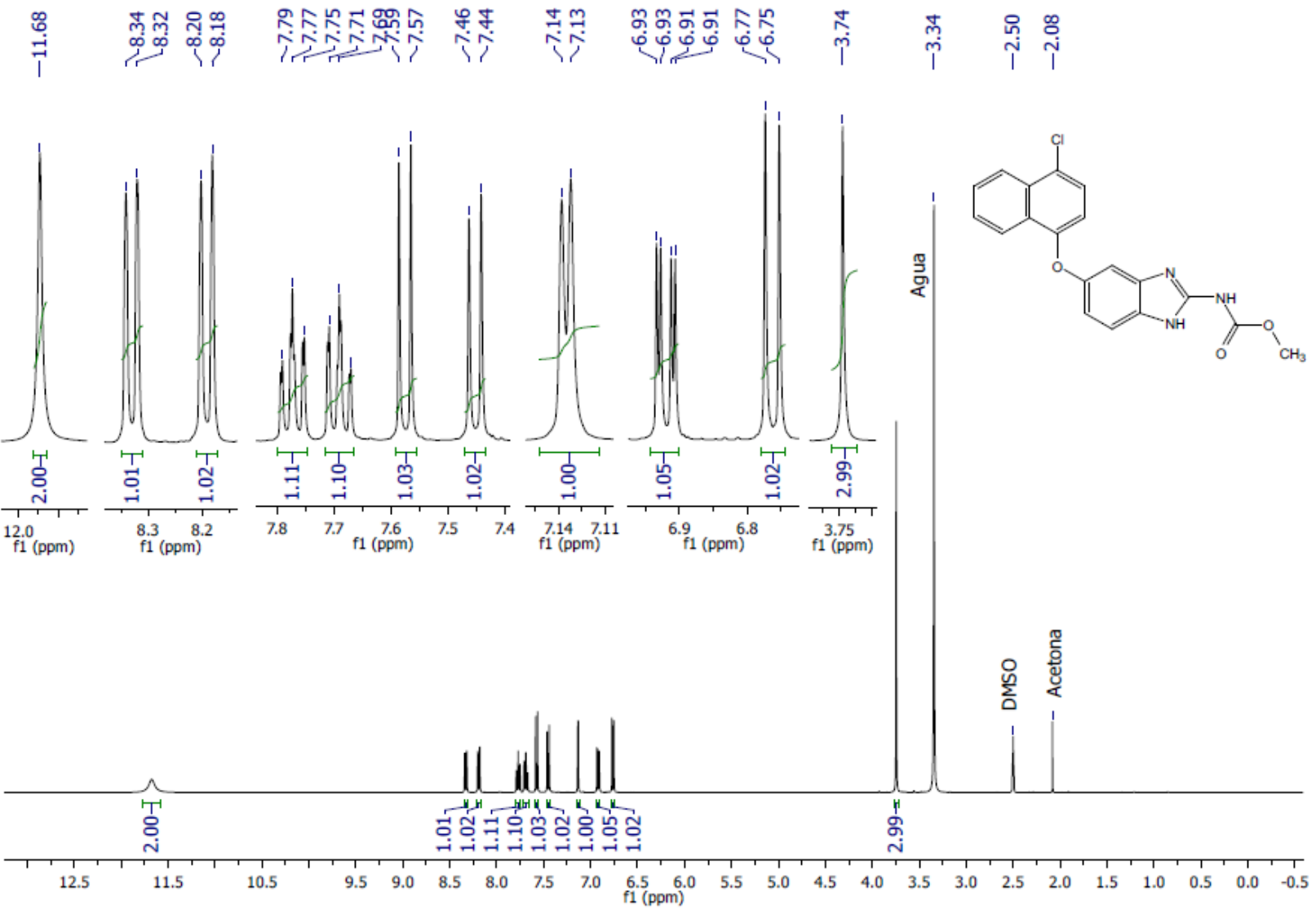
Espectro 55. Experimento HMBC del compuesto *N*-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG4).



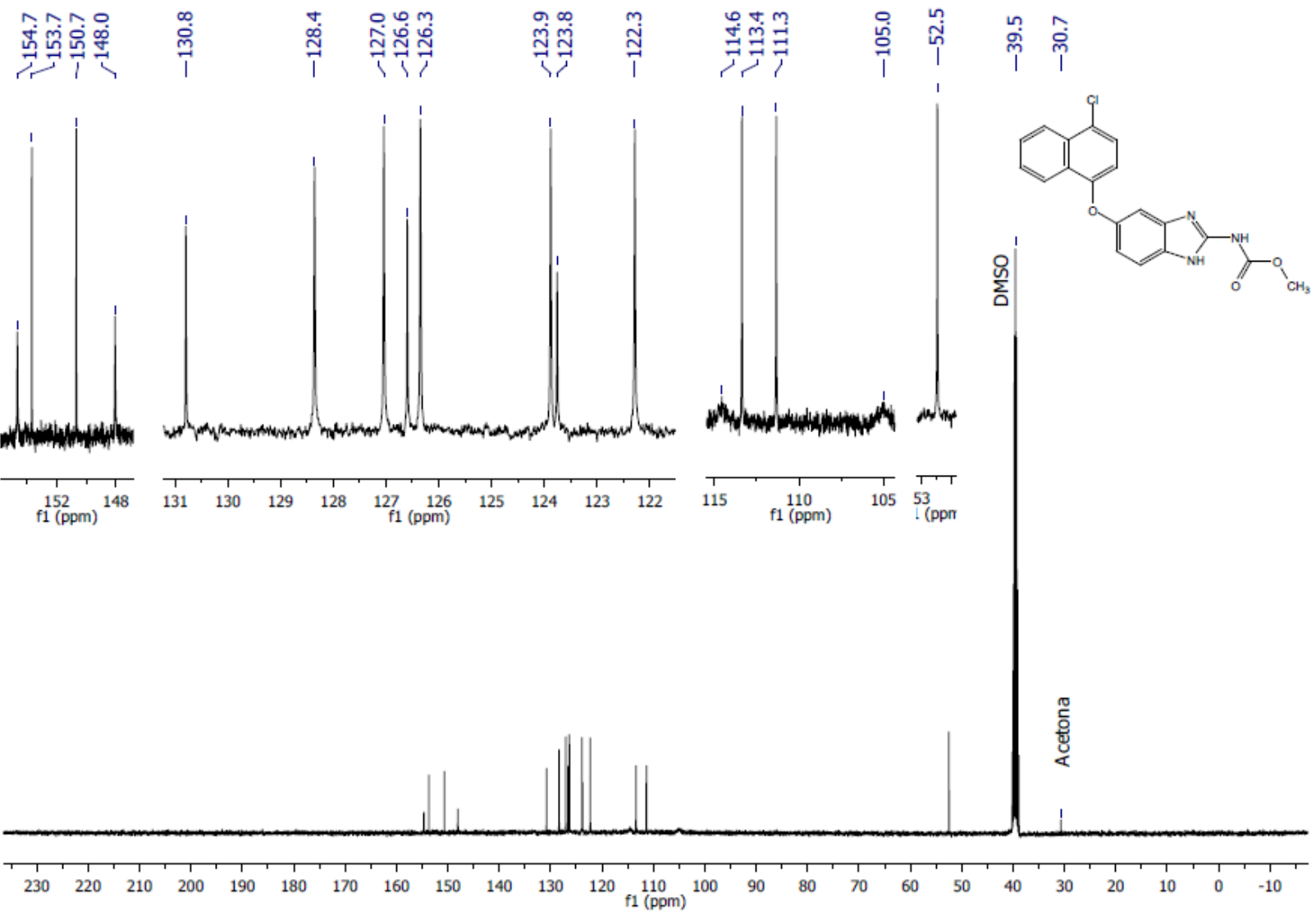
Espectro 56. Experimento NOESY del compuesto *N*-(5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (LCG4).



Espectro 57. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto M-[5-(4-clorofenil)-1-iloxi]-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5).



Espectro 58. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(4-clorofenil)-1-iloxi]-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5).



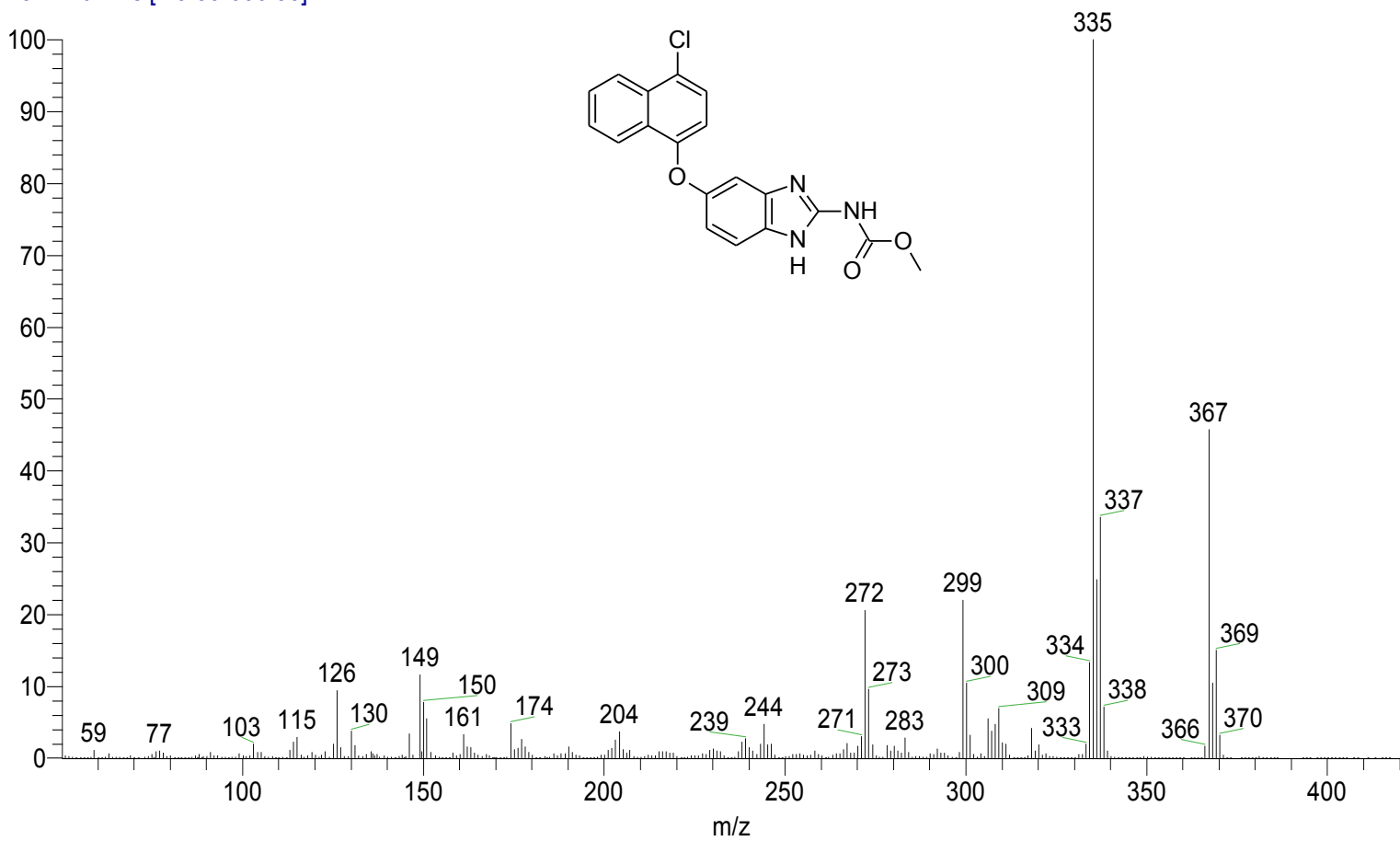
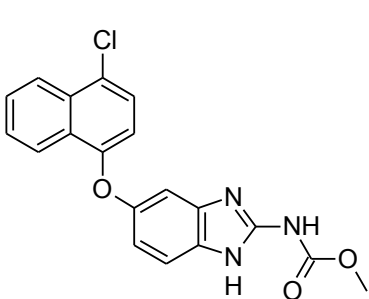
Espectro 59. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(4-clorofenil)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG5).

1/16/2015 1:49:18 PM

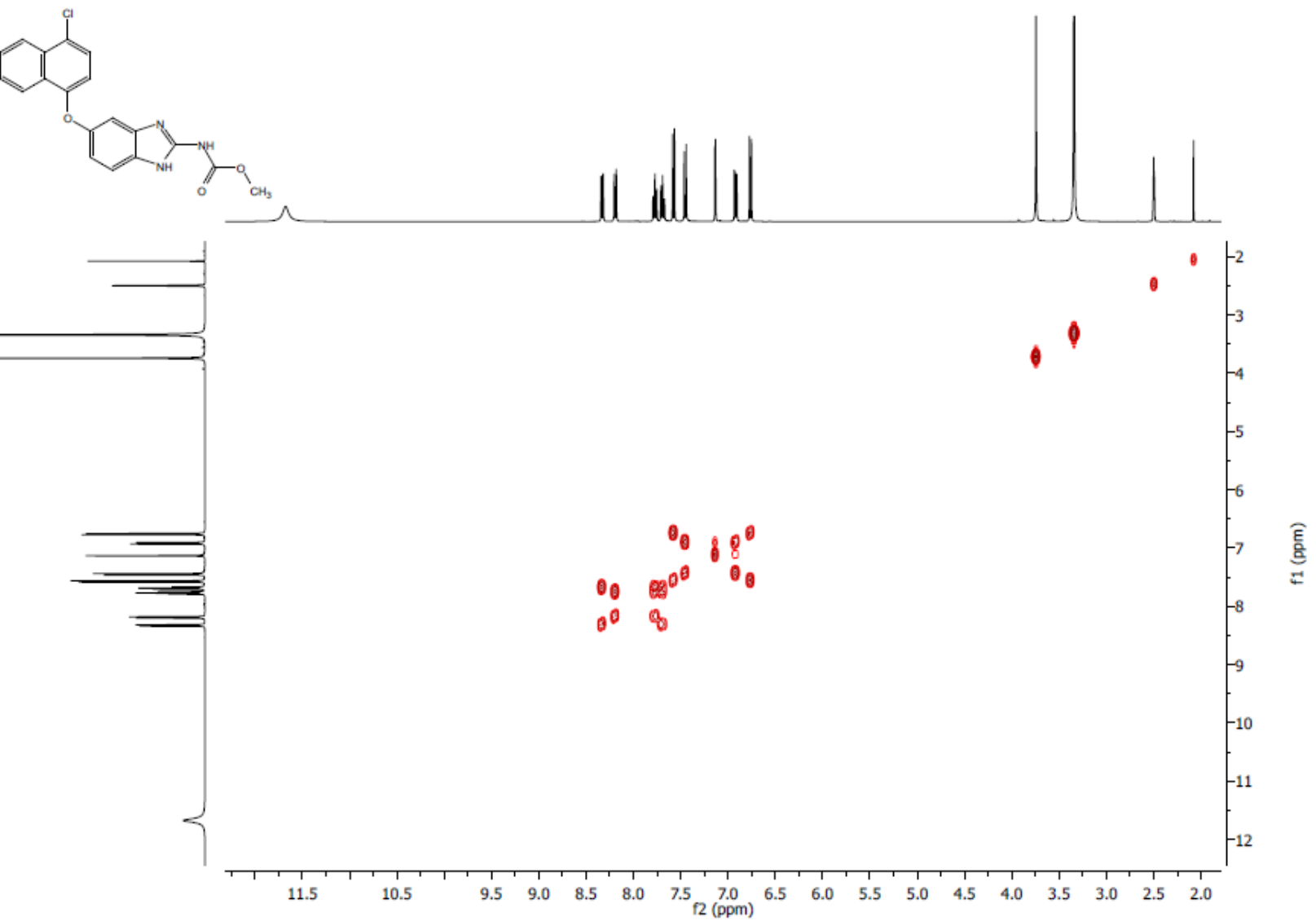
D:\Xcalibur\data\USAIND\LCG5__1_1
szComment

LCG5__1_1 #10-11 RT: 0.85-0.94 AV: 2 NL: 9.25E6

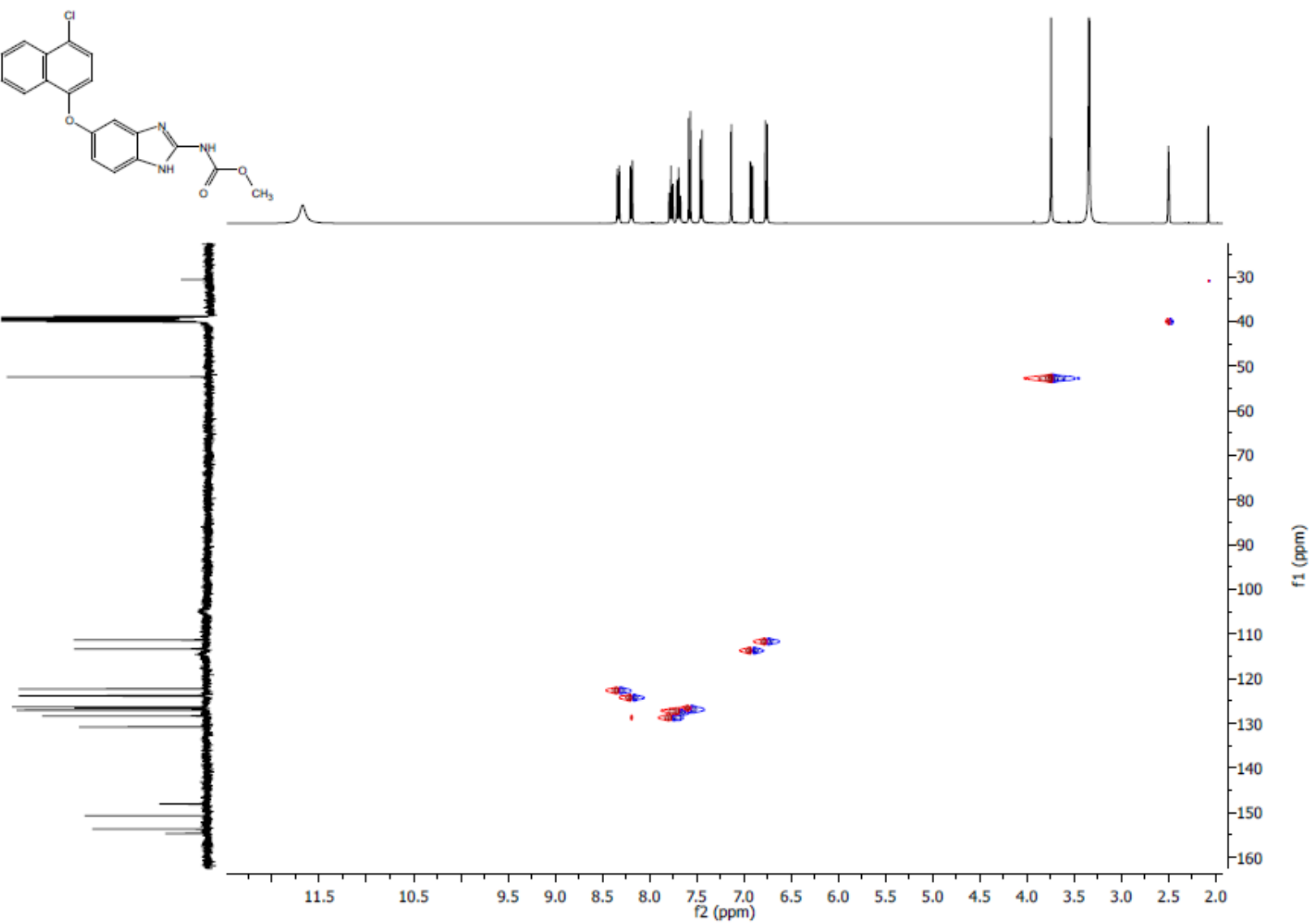
T: + c EI Full ms [49.50-600.50]



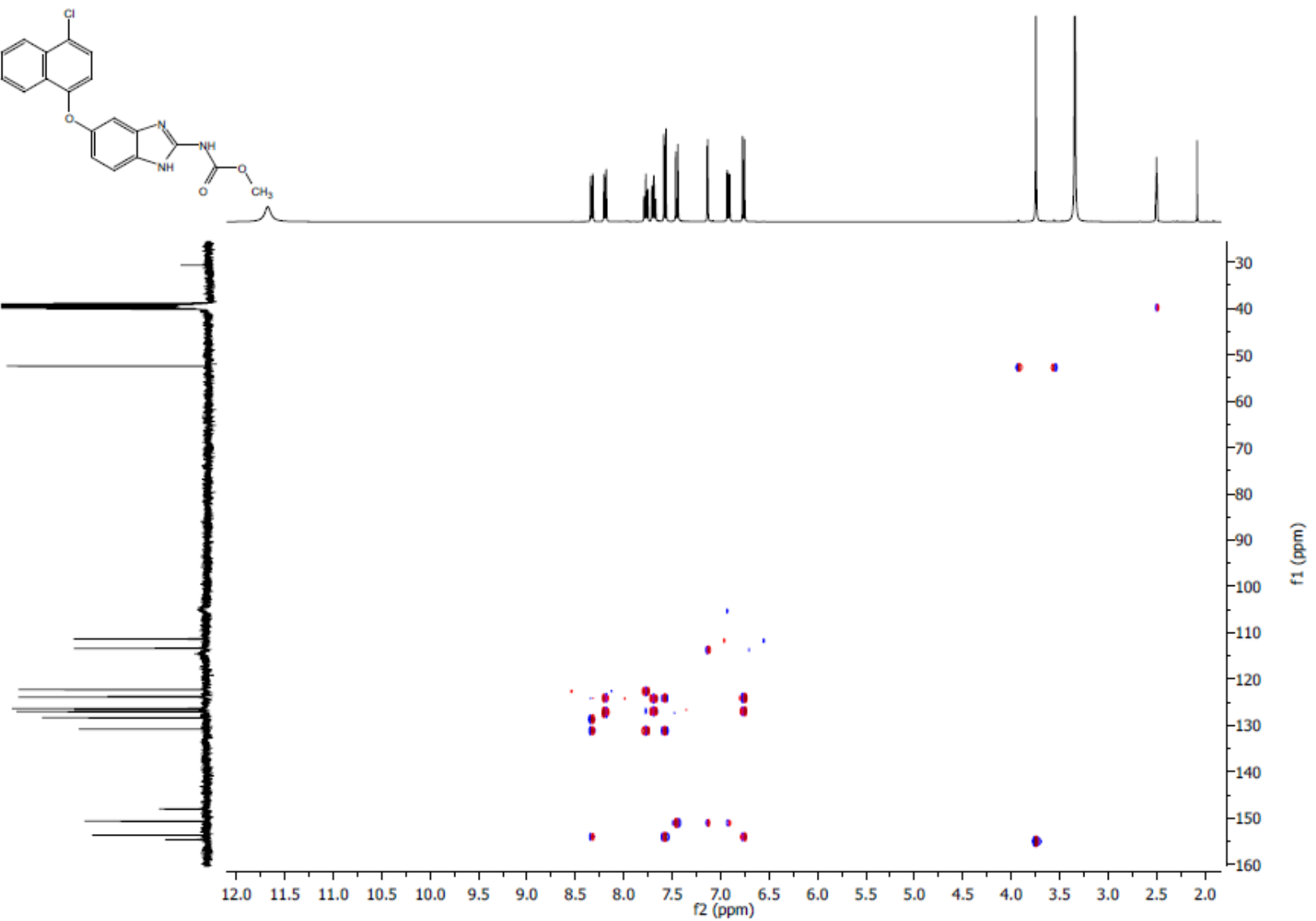
Espectro 60. EM (IE, m/z) del compuesto N-[5-(4-cloronafilen-1-iloxi)-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5).



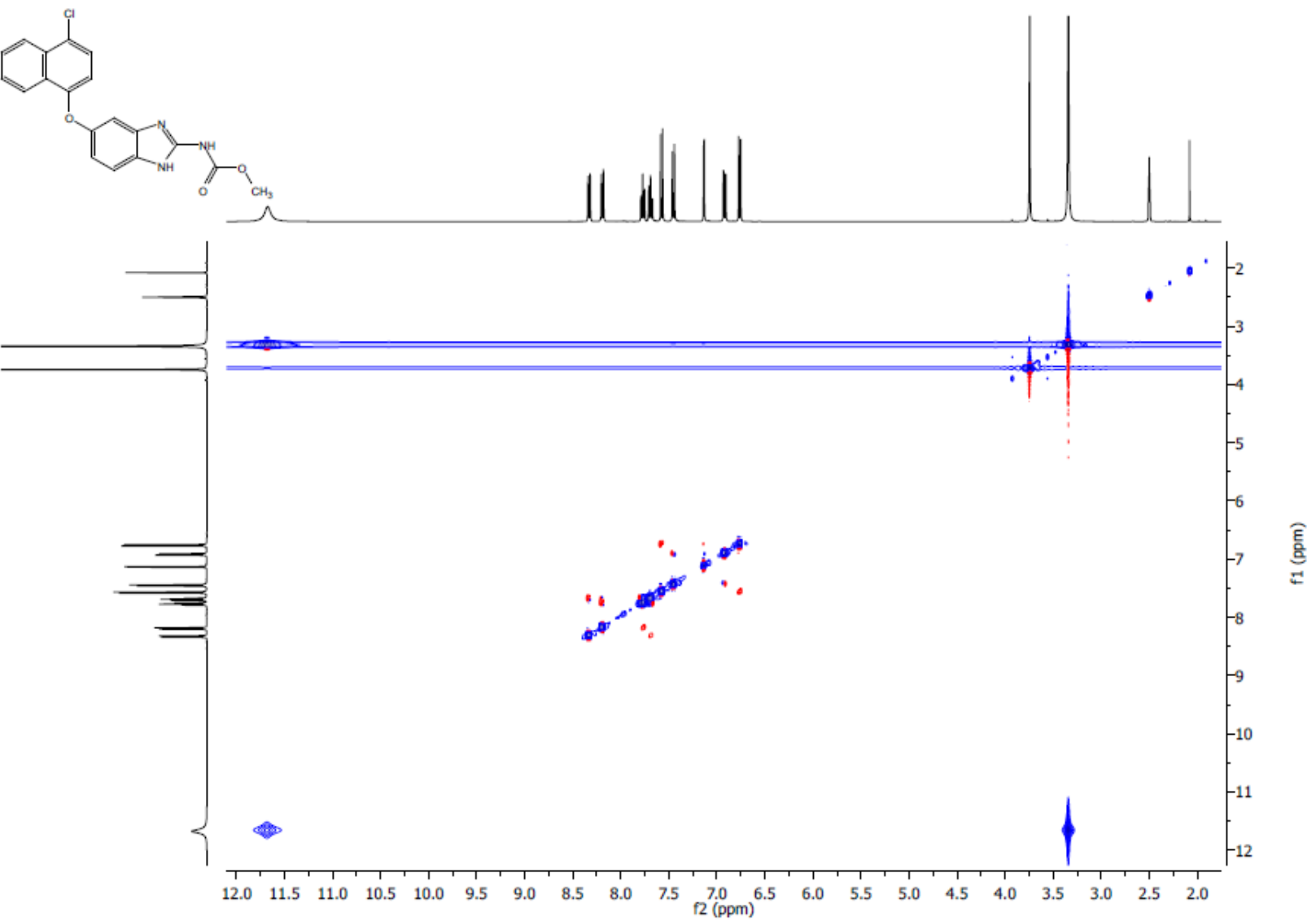
Espectro 61. Experimento COSY del compuesto *N*-[5-(4-clorofenileno-1-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG5**).



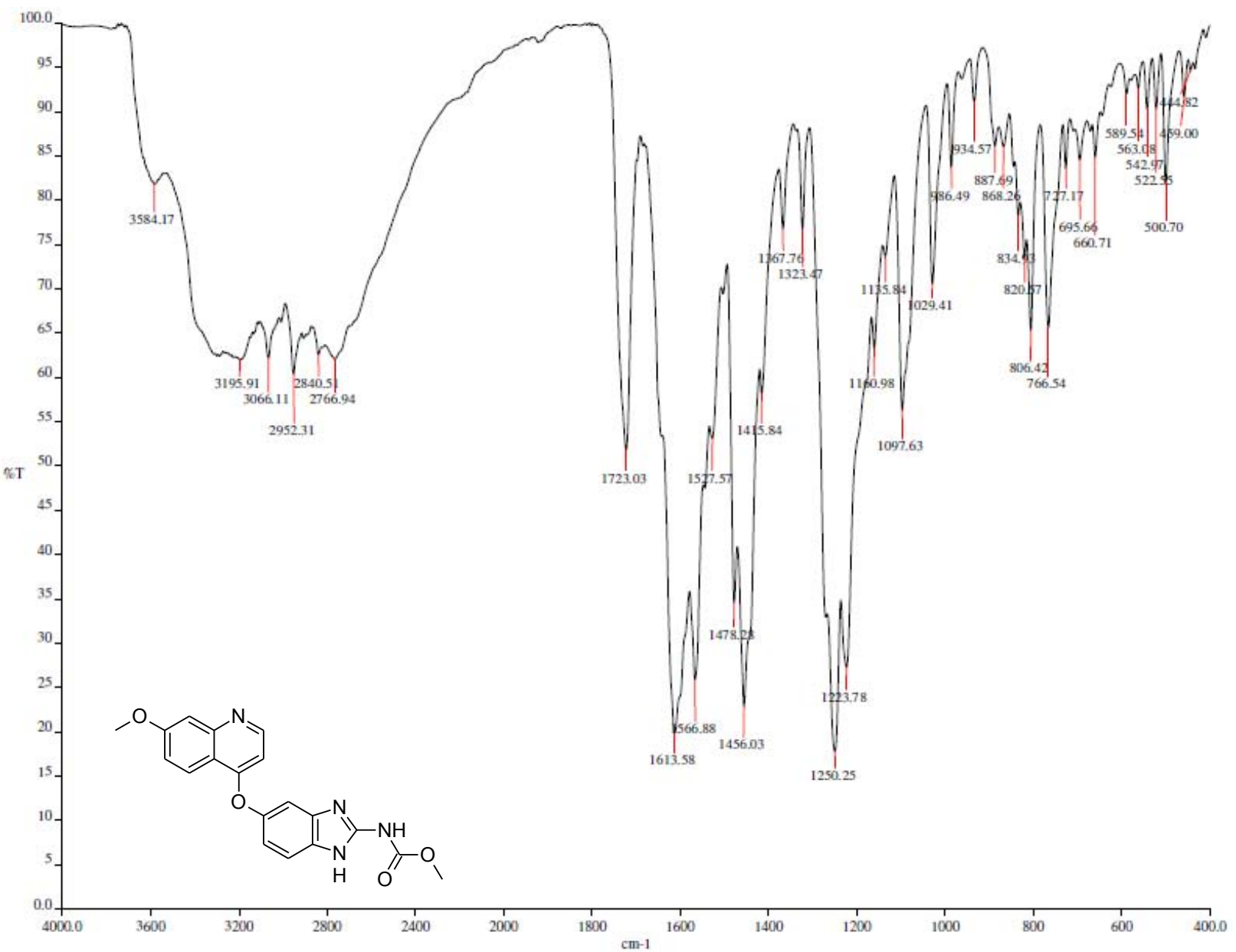
Espectro 62. Experimento HSQC del compuesto *N*-[5-(4-clorofenil)-1-iloxi]-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5).



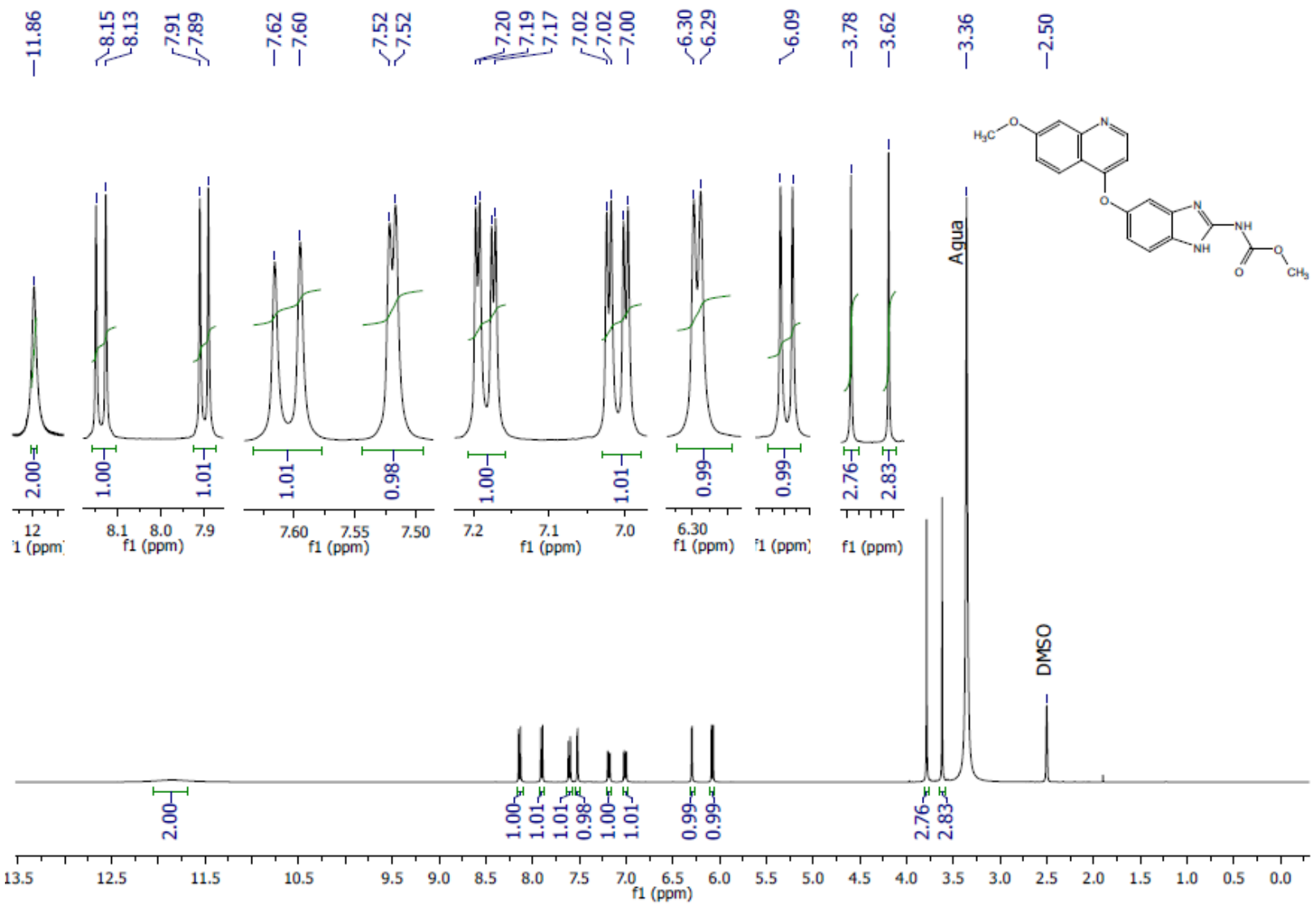
Espectro 63. Experimento HMBC del compuesto *N*-[5-(4-clorofenil)-1-iloxi]-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5).



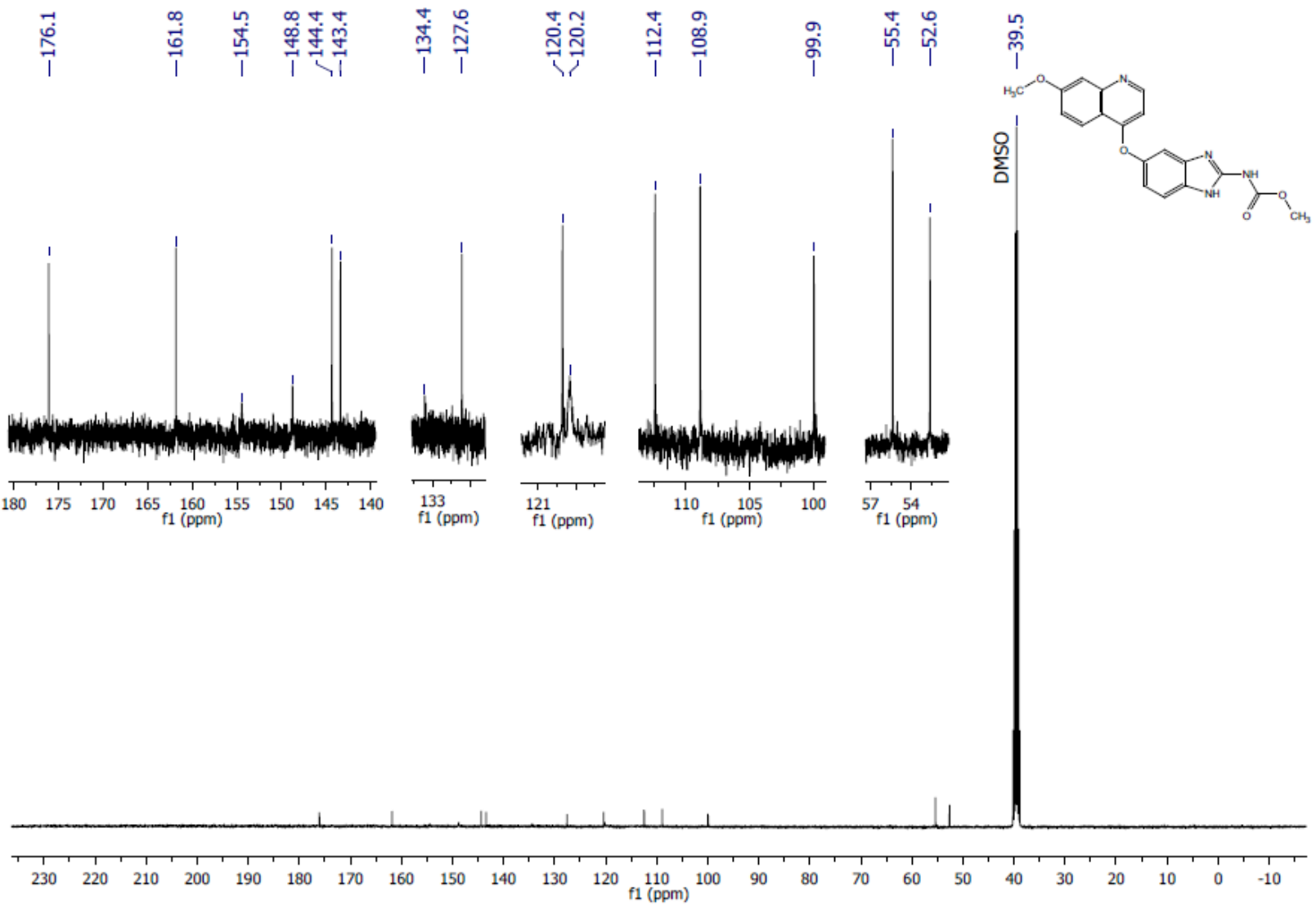
Espectro 64. Experimento NOESY del compuesto *N*-[5-(4-clorofenil)-1-oxi-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG5).



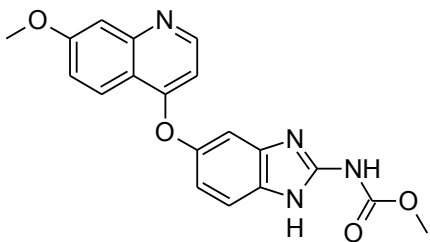
Espectro 65. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto N-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG6).



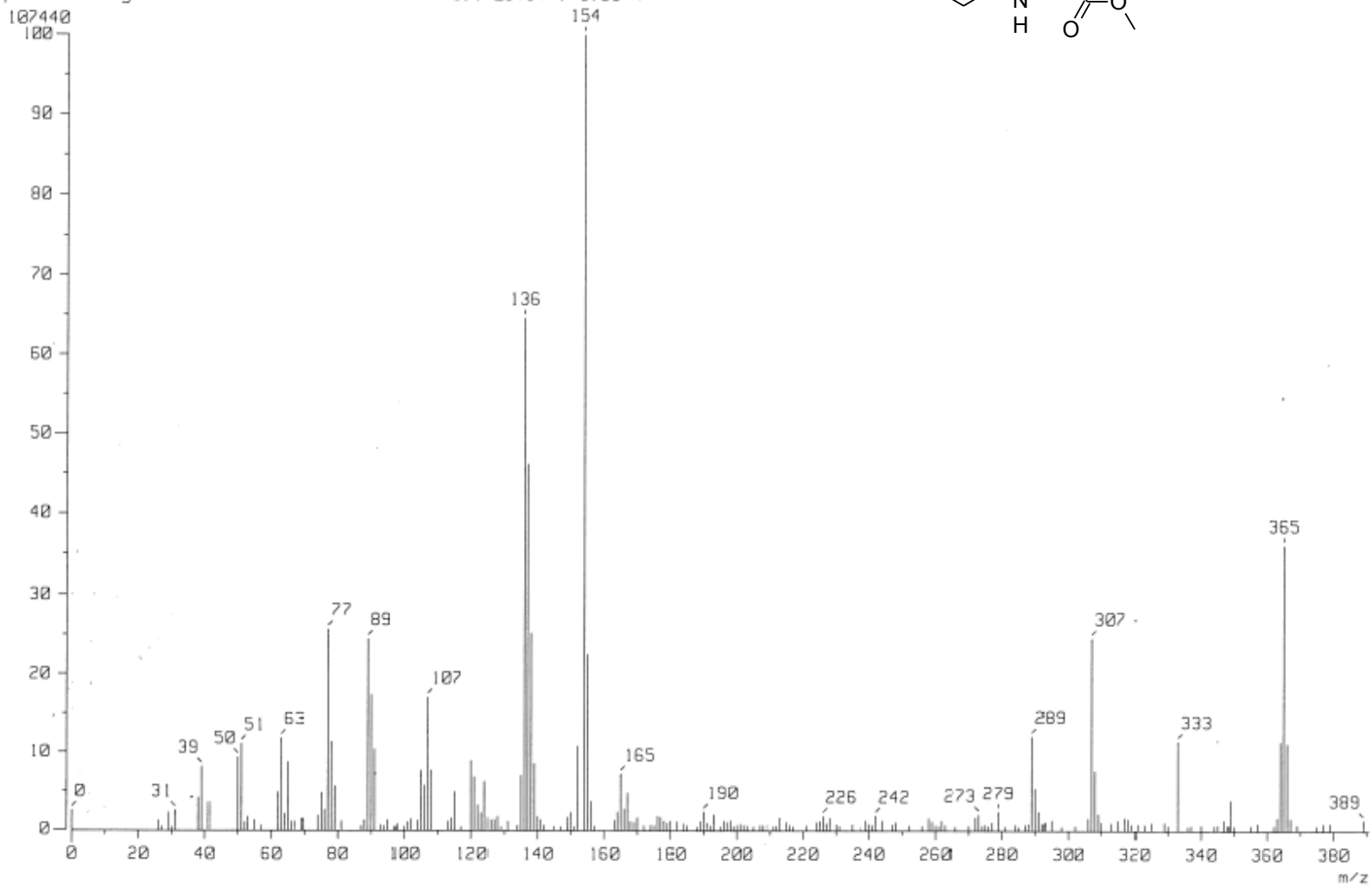
Espectro 66. RMN ^1H (TMS, DMSO, 300 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(7-metoxiquinolín-4-iloxi)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG6**).



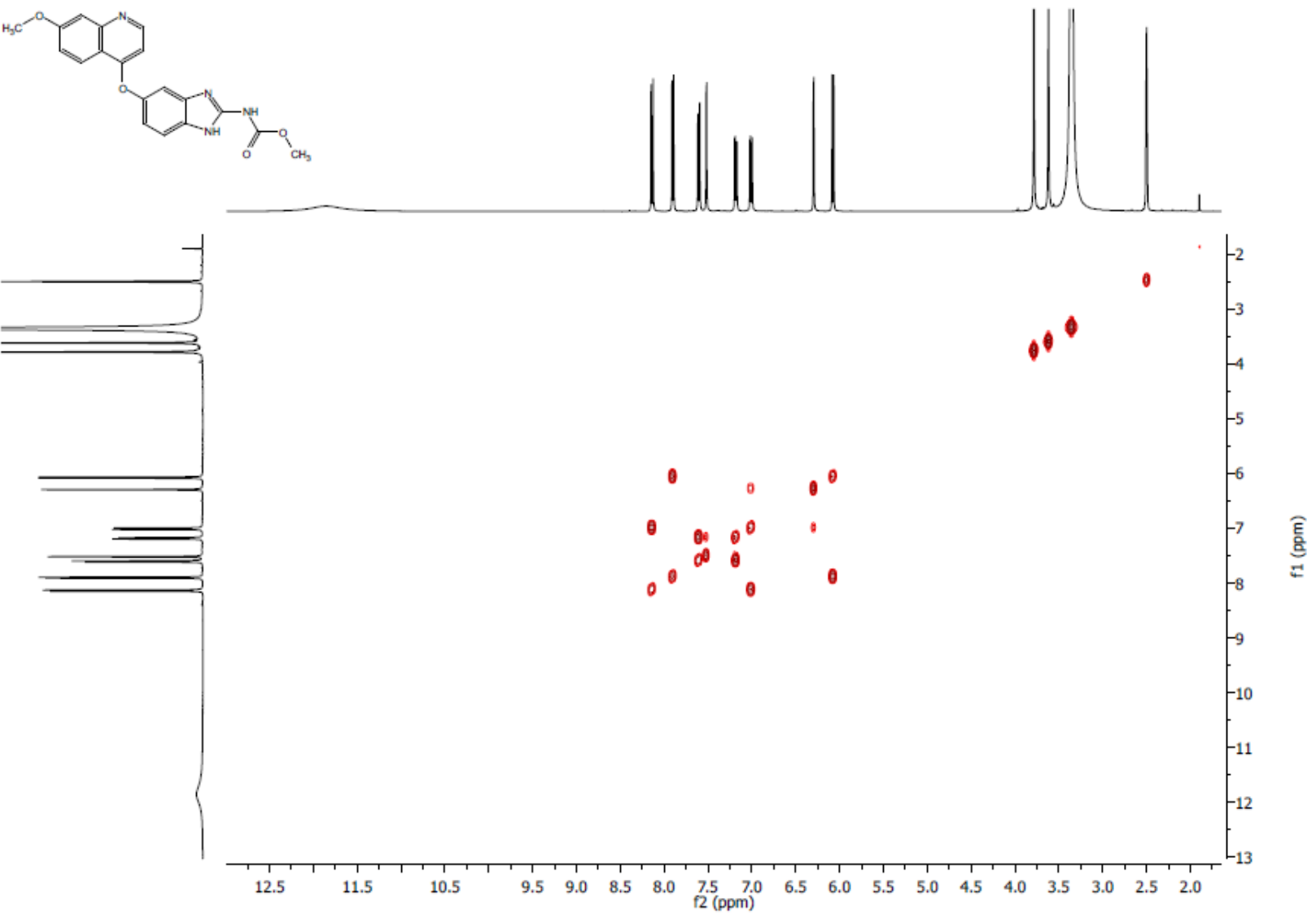
Espectro 67. RMN ^{13}C (TMS, DMSO, 75 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG6).



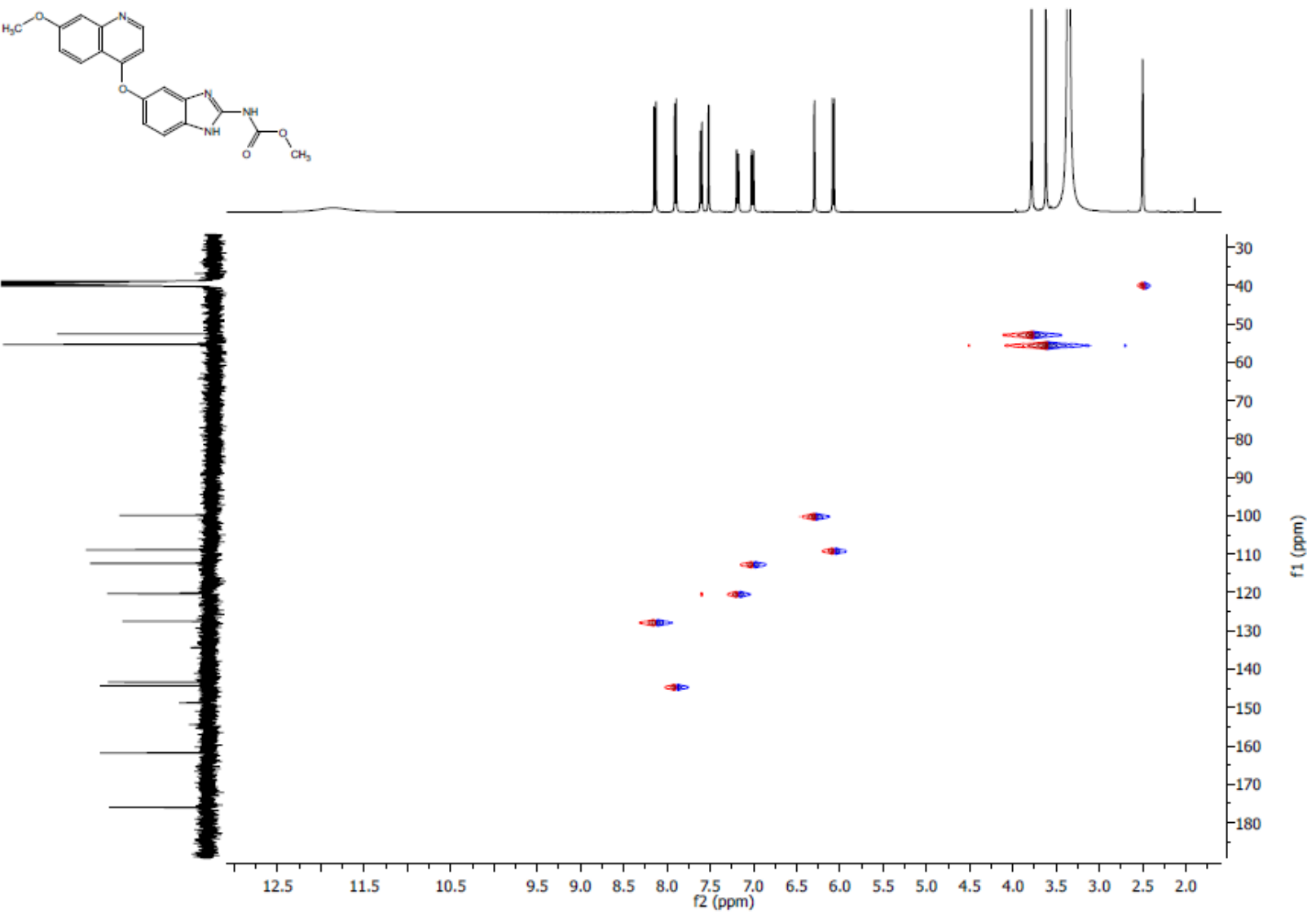
[Mass Spectrum]
 Date : 11-Feb-2015 13:51
 Data : Dr-Rafael-Castillo005
 Sample: 291-STE-4887 LCG6
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 1.55 min Scan# : (2,11)
 BP : m/z 154.0000 Int. : 10.25
 Output m/z range : 0.0000 to 390.6662 Cut Level : 0.00 %



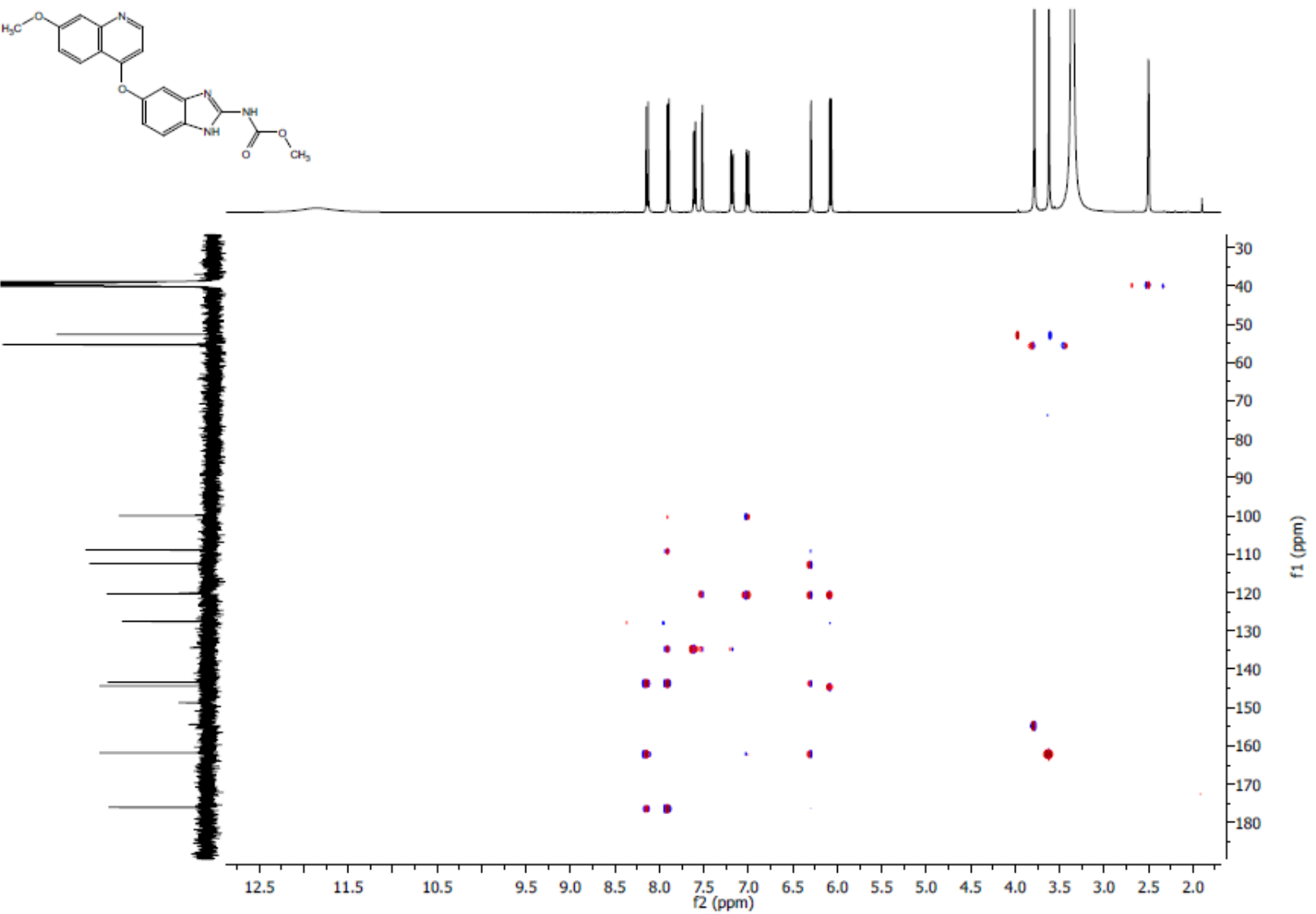
Espectro 68. EM (FAB⁺, m/z) del compuesto N-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxy)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG6).



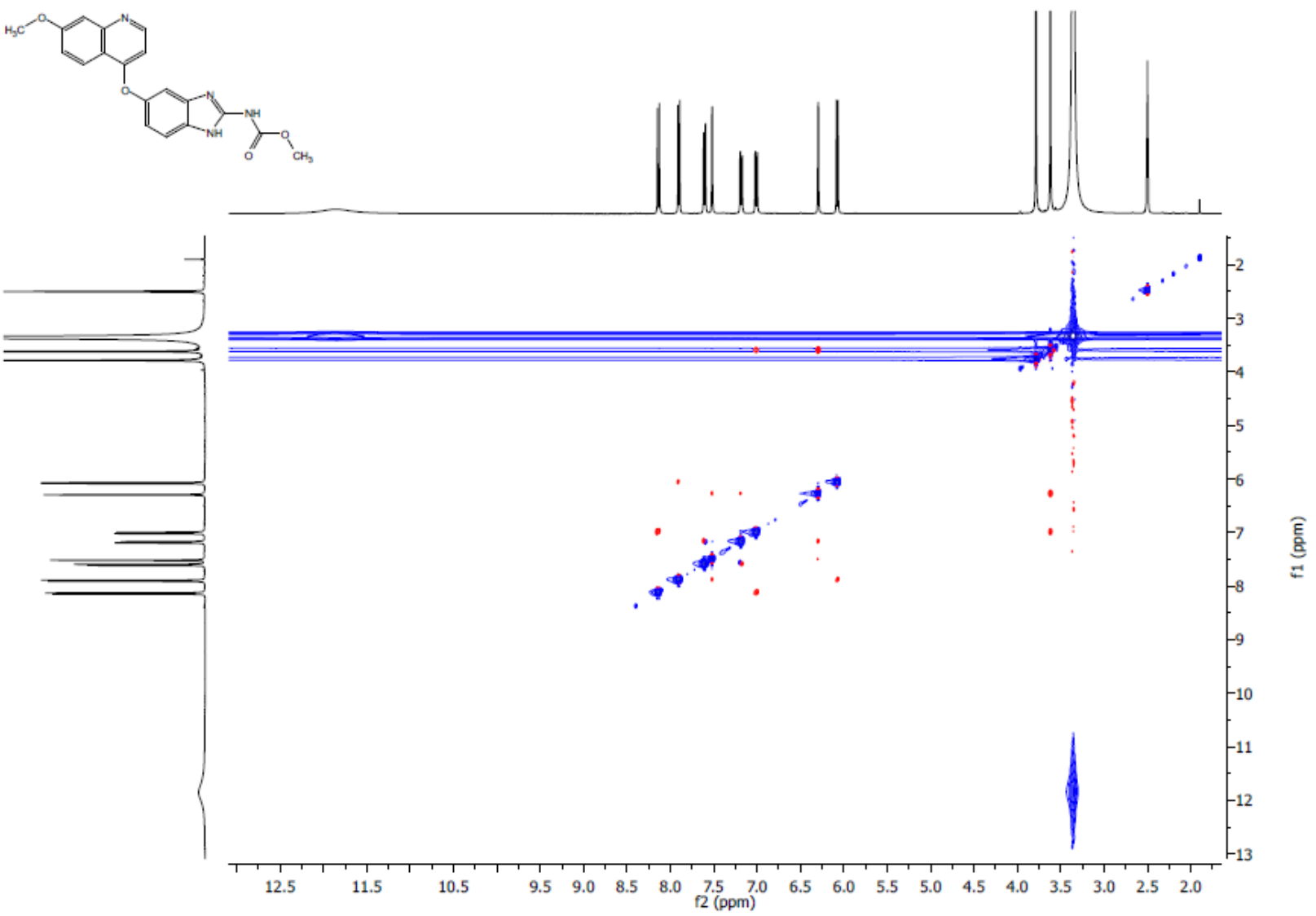
Espectro 69. Experimento COSY del compuesto *N*-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG6).



Espectro 70. Experimento HSQC del compuesto *N*-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamato de metilo (LCG6).



Espectro 71. Experimento HMBC del compuesto *N*-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1*H*-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (**LCG6**).



Espectro 72. Experimento NOESY del compuesto *N*-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo (LCG6).

Anexo III. Parte computacional

III. 1. Alineamiento de secuencias

Tabla III.1.1. Secuencias de β -tubulina reportadas en el servidor UniProt¹

Organismo	Isoforma	No. AA	Clave	Clave de acceso UniProt
<i>Homo sapiens</i>	β I	444	HsBT1	P07437
	β IIa	445	HsBT2a	Q13885
	β IIb	445	HsBT2b	Q9BVA1
	β III	450	HsBT3	Q13509
	β IVa	444	HsBT4a	P04350
	β IVb	445	HsBT4b	P68371
	β V	446	HsBT5	Q9BUF5
	β VI	451	HsBT6	Q9H4B7
<i>Sus scrofa</i>	β I	445	SsBT	P02554
<i>Ovis aries</i>	β I	445	OaBT	D0VWY9
<i>Bos taurus</i>	β IV	445	BtBT	Q3MHM5
<i>Giardia intestinalis</i>	β I	446	GiBT	P05304
<i>Trichomonas vaginalis</i>	β I	447	TvBT	A2DC16
<i>Haemonchus contortus</i>	β I	448	HcBT	Q25049
<i>Entamoeba histolytica</i>	β I	458	EhBT	C4LYA3
<i>Trypanosoma cruzi</i>	β I	442	TcBT	P08562
<i>Leishmania mexicana</i>	β I	445	LmBT	P21148

H.sapiens_BT1	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQVFDKDN	298
H.sapiens_BT2a	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDSKN	298
H.sapiens_BT2b	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDSKN	298
H.sapiens_BT3	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTARGSQYR-ALTVPPELTQQQMFDAKN	298
H.sapiens_BT4a	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDAKN	298
H.sapiens_BT4b	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDAKN	298
H.sapiens_BT5	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDAKN	298
H.sapiens_BT6	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTAQGSQQYR-ALSVAEALTQQQMFDAKN	298
S.scrofa_BT	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDAKN	298
O.aries_BT	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDSKN	298
B.taurus_BT	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTQQQMFDAKN	298
G.intestinalis_BT	241	RFPGQLNADLR-KLAVNLIPFRLHFFLVGFAPLTSRGSQIYR-ALTVPPELVSQMFDNKN	298
T.vaginalis_BT	241	RFPGQLNSDLR-KLAVNLVPPRLHFFIVGFAPLTSRGSQQYR-ALTVPPELTSQLEFDNKN	298
E.histolytica_BT	240	RFPGQLNQDLR-KLAVNMNYPRLHFFSSSIAPVSNALSMKYE-SLNVQEI IQQLFEKKN	297
H.contortus_BT	241	RFPGQLNADLR-KLAVNMVPPRLHFFMPGFAPLSAKGAQYR-ASTVAELTQQQMFDAKN	298
T.cruzi_BT	241	RFPGQLNSDLR-KLAVNLVPPRLHFFMFMGFAPLSSRGSQQYR-GLSVPDVTQQQMFDAKN	298
L.mexicana_BT	241	RFPGQLNSDLRNLAVNLVPPRLHFFMFMGFAPLTSRGSQYRQLGSLVADVTQQQMFDAKN	300
***** ** :***: * :***** :**:: : * . . * : : * : *			
H.sapiens_BT1	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT2a	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT2b	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT3	299	MMAACDPRHGRYLTVAATVFRGRMSMKEVDEQMLAIQSKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT4a	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLSVQSKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT4b	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT5	299	MMAACDPRHGRYLTVAATVFRGPMMSMKEVDEQMLAIQSKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
H.sapiens_BT6	299	TMAACDLRRGRYLTVAACIFRGKMSSTEVDQQLLSVQTRNSSCFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
S.scrofa_BT	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
O.aries_BT	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
B.taurus_BT	299	MMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
G.intestinalis_BT	299	MMAASDPRHGRYLTAAAMFRGRMSTKEVDEQMLNIQNKNSYFVEWIPNNMKVSVCDIPP	358
T.vaginalis_BT	299	MMAACDPRRQVYLTASAHFRGRMSMKEVDEQMLNIQARNTSYFVEWIPSNVKSACDIPP	358
E.histolytica_BT	298	TLVDFDPQSGKYFTSSCIIRGKVVSTHDVEEQFLRVREKNPDLEIPWIPNNMQLAVCDVPP	357
H.contortus_BT	299	MMAACDPRHGRYLTVAAMFRGRMSMREVDQMMSVQNKNSYFVEWIPNNVKTAVCDIPP	358
T.cruzi_BT	299	MMQAADPAHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNIKSSICDIPP	358
L.mexicana_BT	301	MMQAADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWIPNNIKSSICDIPP	360
: * * * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
H.sapiens_BT1	359	RGLKMAVTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT2a	359	RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT2b	359	RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT3	359	RGLKMSSTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT4a	359	RGLKMAATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT4b	359	RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT5	359	RGLKMASTFIGNSTAIQELFKRISEQFSAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
H.sapiens_BT6	359	RGLSMAATFIGNSTAIQEIFNRVSEHFSAMFRKAFVHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
S.scrofa_BT	359	RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
O.aries_BT	359	RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
B.taurus_BT	359	RGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
G.intestinalis_BT	359	RGLKMAATFIGNSTAIQELFKRVGEQFSAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
T.vaginalis_BT	359	RGLKMAATFIGNTAFRELPTRVDSQFOKMYARRAFIHWYVNEGLETVDFEARSNMNDL	418
E.histolytica_BT	358	RGLDLSGTLISNSTAISDMFKRYKQFVSMRLRKAFLIYLYTEEGMEESEFEAEADLIDL	417
H.contortus_BT	359	RGLKMAATFVGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
T.cruzi_BT	359	RGLKMAVTFVGNNTCIQEMFRRVGEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	418
L.mexicana_BT	361	RGLKMSVTFIGNNTCIQEMFRRVGEQFTAMFRKAFHLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDL	420
:** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
H.sapiens_BT1	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT2a	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT2b	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT3	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT4a	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT4b	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT5	419	VSEYQQYQDA	428
H.sapiens_BT6	419	VSEYQQYQDA	428
S.scrofa_BT	419	VSEYQQYQDA	428
O.aries_BT	419	VSEYQQYQDA	428
B.taurus_BT	419	VSEYQQYQDA	428
G.intestinalis_BT	419	VSEYQQYQEA	428
T.vaginalis_BT	419	IQEYEMYETA	428
E.histolytica_BT	418	VTEYQQYQDA	427
H.contortus_BT	419	ISEYQQYQEA	428
T.cruzi_BT	419	VSEYQQYQDA	428
L.mexicana_BT	421	VSEYQQYQDA	430
: * * : * : *			

Figura III.1.1. Alineamiento de secuencias de β -tubulina de mamíferos y parásitos (continuación).

III.2. Modelado por homología

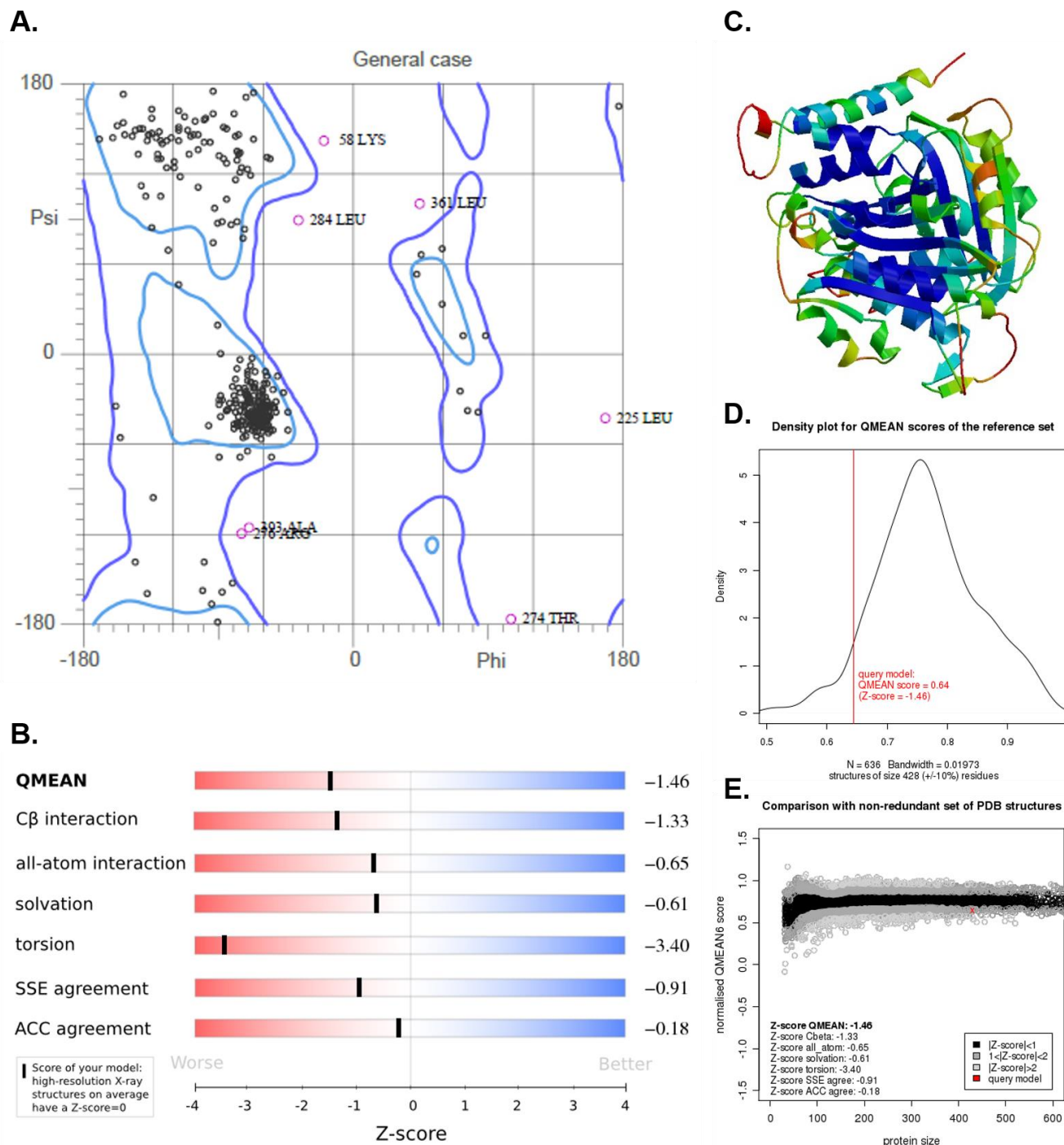


Figura III.2.1. Validación de la isoforma HsBT1 de *H. sapiens*. (A) Diagrama Ramachandran, (B) diagrama de la relación del Z-score con QMEAN y otras contribuciones, (C) esquema de errores por residuo, (D) gráfico de la densidad de distribución del QMEAN y (E) gráfico comparativo de la calidad absoluta estimada.

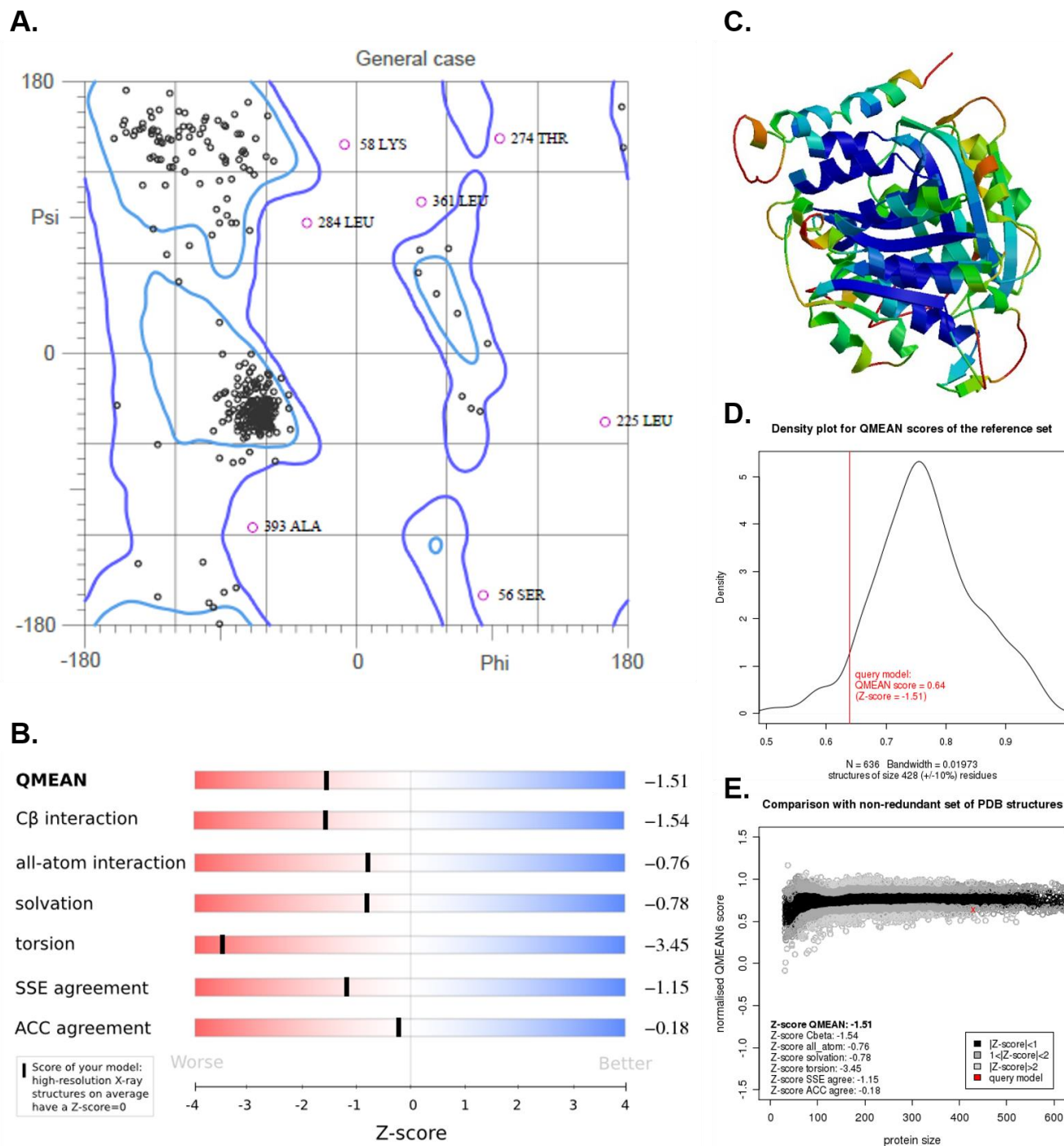


Figura III.2.2. Validación de la isoforma HsBT3 de *H. sapiens*. (A) Diagrama Ramachandran, (B) diagrama de la relación del Z-score con QMEAN y otras contribuciones, (C) esquema de errores por residuo, (D) gráfico de la densidad de distribución del QMEAN y (E) gráfico comparativo de la calidad absoluta estimada.

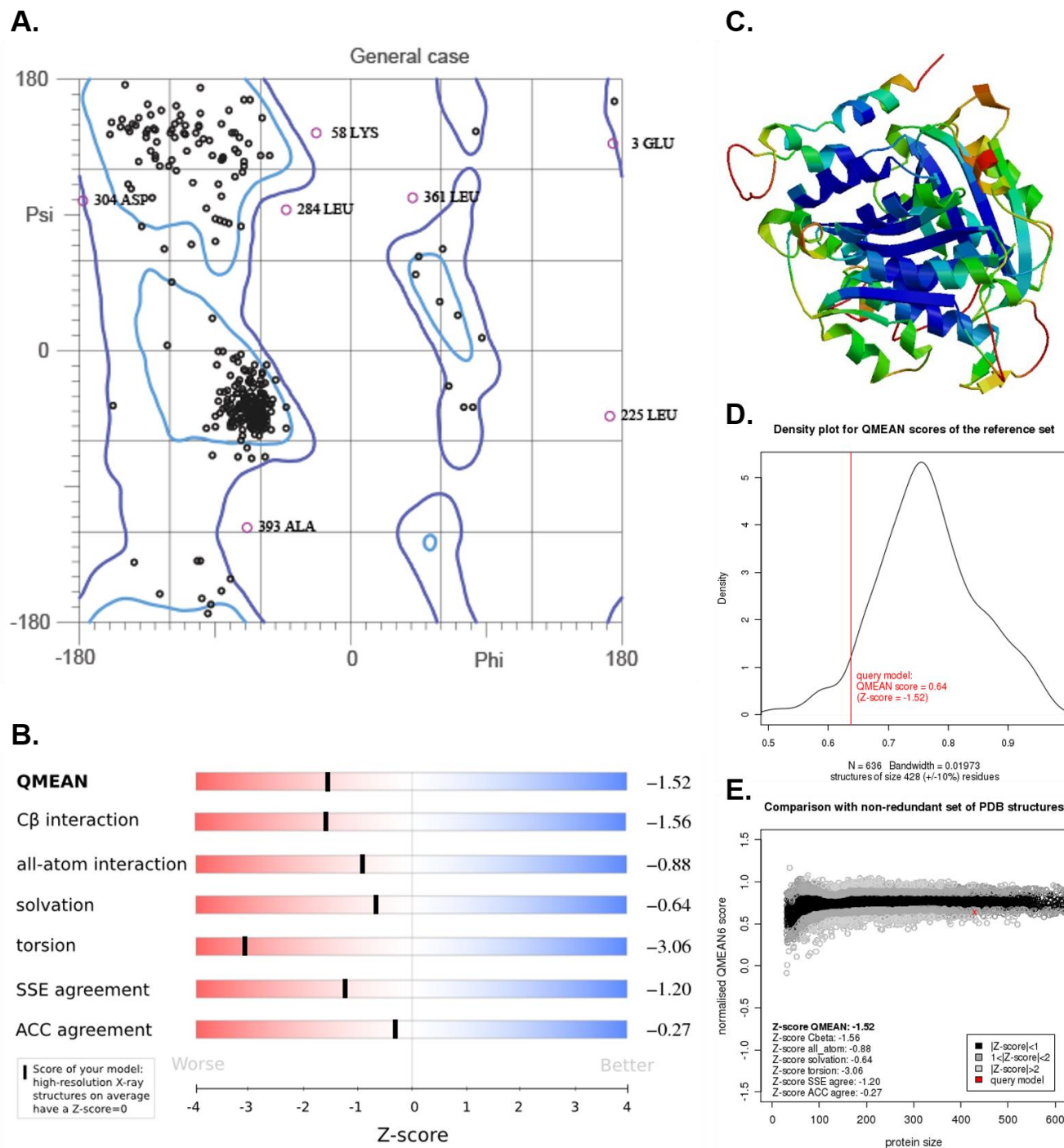


Figura III.2.3. Validación de la isoforma HsBT6 de *H. sapiens*. (A) Diagrama Ramachandran, (B) diagrama de la relación del Z-score con QMEAN y otras contribuciones, (C) esquema de errores por residuo, (D) gráfico de la densidad de distribución del QMEAN y (E) gráfico comparativo de la calidad absoluta estimada.

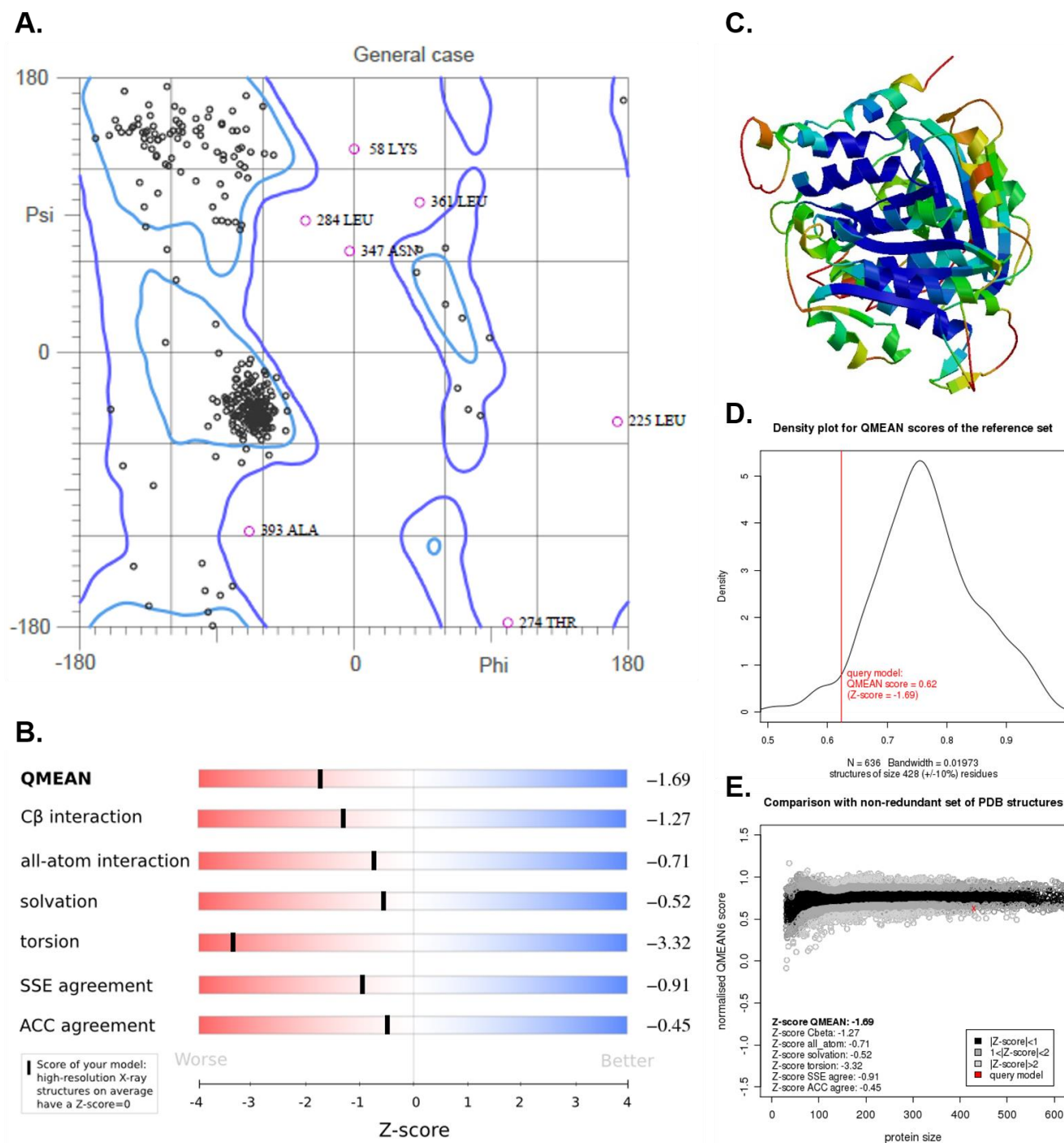
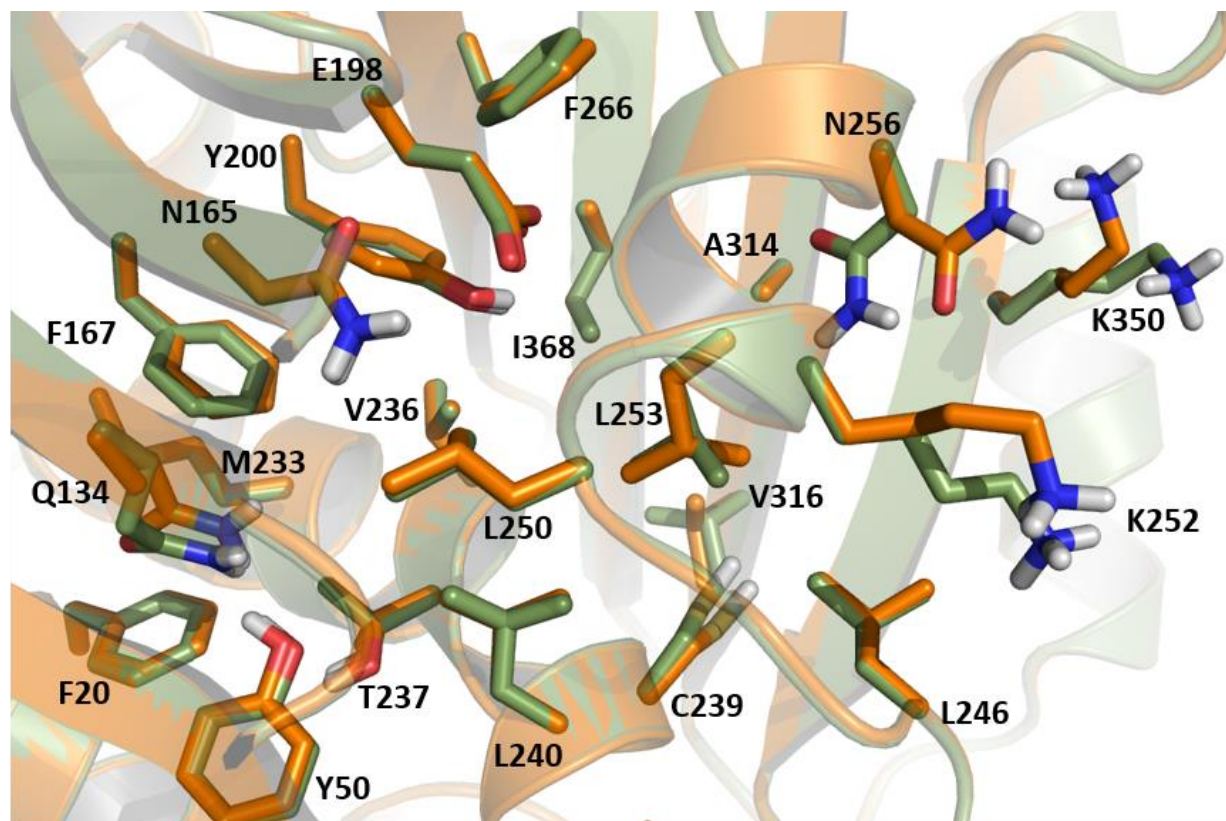


Figura III.2.4. Validación de la isoforma SsBT de *H. sapiens*. (A) Diagrama Ramachandran, (B) diagrama de la relación del Z-score con QMEAN y otras contribuciones, (C) esquema de errores por residuo, (D) gráfico de la densidad de distribución del QMEAN y (E) gráfico comparativo de la calidad absoluta estimada.

III.3. Acoplamiento molecular



H.sapiens_BT1	1	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGTYHGDSLQDLDRISVYYNEATGGKYV	60
S.scrofa_BT	1	MREIVHIQAGQCGNOIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGDSLQDLERINVYYNEAAGNKYV	60
		*****:*****:*.*****:*	
H.sapiens_BT1	61	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120
S.scrofa_BT	61	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGOSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120

H.sapiens_BT1	121	RKEAESCDCLOGFQLTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMNTFSVVPSPKVSDTVV	180
S.scrofa_BT	121	RKESESCDCLOGFQLTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMNTFSVVPSPKVSDTVV	180

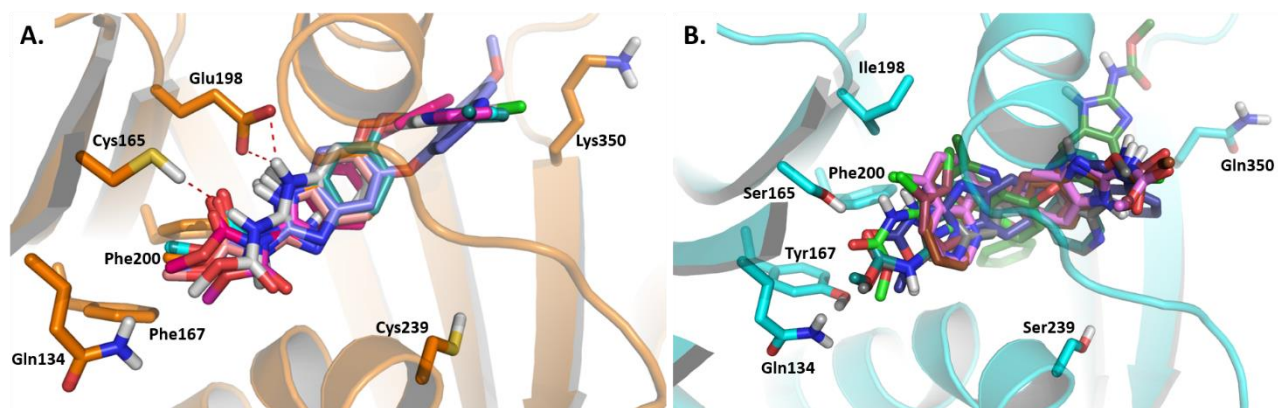
H.sapiens_BT1	181	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL	240
S.scrofa_BT	181	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL	240

H.sapiens_BT1	241	RFPGQLNADLRKLVANMVPFPRLLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQVFDANKMM	300
S.scrofa_BT	241	RFPGQLNADLRKLVANMVPFPRLLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQVFDANKMM	300

H.sapiens_BT1	301	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRG	360
S.scrofa_BT	301	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRG	360

H.sapiens_BT1	361	LKMAVTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVS	420
S.scrofa_BT	361	LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVS	420
		:**	
H.sapiens_BT1	421	EYQQYQDA	428
S.scrofa_BT	421	EYQQYQDA	428

Figura III.3.1. Comparación del posible sitio de unión de los carbamatos benzimidazólicos y secuencia de aminoácidos de las β -tubulinas: HsBT1 (verde) y SsBT (naranja).



Compuesto	GiBT			EhBT		
	Conformación	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster	Conformación	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster
WW5a	<i>trans</i> -1,6	-7.71	12	<i>cis</i> -1,6	-7.77	9
LCG-1	<i>trans</i> -1,6	-9.17	16	<i>trans</i> -1,5	-8.56	8
LCG-2	<i>trans</i> -1,6	-8.84	16	<i>trans</i> -1,5	-8.58	15
LCG-3	<i>trans</i> -1,6	-9.12	11	<i>trans</i> -1,6	-9.00	8
LCG-4	<i>trans</i> -1,6	-9.14	16	<i>cis</i> -1,5	-8.80	10
LCG-5	<i>trans</i> -1,6	-9.43	19	<i>cis</i> -1,5	-8.78	9
LCG-6	<i>trans</i> -1,5	-8.97	18	<i>trans</i> -1,5	-8.51	7
PBS-90	<i>trans</i> -1,6	-8.86	15	<i>cis</i> -1,6	-8.11	9

Figura III.3.2. Resultados de acoplamiento molecular de los compuestos de la serie LCG, PBS-90 y WW5a a las β -tubulinas GiBT (naranja) y EhBT (cian). Compuestos: LCG-1, (café oscuro), LCG-2 (turquesa), LCG-3 (verde), LCG-4 (lila), LCG-5 (morado), LCG-6 (gris), PBS-90 (guinda) y WW5a (verde limón).