



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio in silico y validación en células humanas del
potencial terapéutico de un nuevo compuesto natural

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Pérez Artilles, Daniel

Tutor/a: Bañuls Polo, María José

Cotutor/a externo: JUANES ORTIZ, M^a ANGELES

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural



PRÍNCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural UPV
(ETSEAMN)

Grado en Biotecnología

Trabajo de fin de grado

Estudio *in silico* y validación en células humanas del potencial terapéutico de un nuevo compuesto natural

Curso académico 2022/2023

Autor: Daniel Pérez Artiles

Tutor académico: Prof. Dña. María José Bañuls Polo

Cotutor externo: Dña. María Ángeles Juanes Ortiz

Valencia, 3 de julio de 2023 (julio-1 2023)

This work is licensed under the Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License. To view a copy of this license, visit

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.



Title: *In silico* study and validation with human cells of the therapeutic potential of a new natural compound.

Abstract:

Cancer is the leading cause of death worldwide, despite advances in cancer treatments such as chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy. Cytoskeletal inhibitors, specifically mitotic spindle inhibitors such as vinca alkaloids and taxanes, are highly relevant drugs in chemotherapy, but the emergence of multidrug resistance and serious side effects such as peripheral neuropathy limit their efficacy in clinical practice. Hence, in recent years significant efforts have been made in the search of new natural products with therapeutic capabilities, with special interest in novel natural small molecule inhibitors (SMI). The greatest advantages of these compounds compared to conventional synthetic drugs are their greater bioavailability, improved therapeutic windows, and fewer side effects.

In this work, using *in silico* software, it has been studied how β -tubulin could bind several SMIs. From this study, the free binding energy between these unions and the number of hydrogen bonds established at a structural level between β -tubulin and each of these compounds have been determined. Among all the compounds studied *in silico*, a single compound has been chosen to proceed with tests with human cells. In these assays, the minimum concentration of the compound that inhibits 50 % of cell growth (IC_{50}) was calculated, in order to subsequently perform immunofluorescence assays to visualize how said compound affects the structure of β -tubulin.

This work is related to the following sustainable development goal of the 2030 Agenda: Health and well-being (see annexes).

Key words: cytoskeleton; immunofluorescence; antineoplastic; natural product; taxanes; β -tubulin.

Author: Daniel Pérez Artilés

Academic tutor: Prof. Ms. María José Bañuls Polo

External co-tutor: Ms. María Ángeles Juanes Ortiz

Valencia, July 2022

This work is licensed under the Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License. To view a copy of this license, visit

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.



Título: Estudio *in silico* y validación en células humanas del potencial terapéutico de un nuevo compuesto natural.

Resumen:

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, pese a los avances en tratamientos antineoplásicos como la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Los inhibidores del citoesqueleto, en concreto inhibidores del huso mitótico como los alcaloides de la vinca y los taxanos, son fármacos muy relevantes en la quimioterapia, pero la aparición de resistencias a múltiples fármacos y efectos secundarios graves como la neuropatía periférica limitan su eficacia en la práctica clínica. De ahí que en los últimos años se hayan realizado importantes esfuerzos en la investigación de nuevos productos naturales con capacidades terapéuticas, destacando en concreto la búsqueda de inhibidores naturales de moléculas pequeñas (SMI). Las mayores ventajas que presentan estos compuestos en comparación con los fármacos sintéticos convencionales son su mayor biodisponibilidad, ventanas terapéuticas mejoradas y menores efectos secundarios.

En este trabajo se ha estudiado usando softwares *in silico* cómo la β -tubulina se podría unir a varios SMI. De este estudio se ha determinado la energía libre de unión entre dichas uniones y el número de enlaces de hidrógeno que establecen a nivel estructural entre la β -tubulina y cada uno de estos compuestos. De entre todos los compuestos estudiados *in silico*, se ha elegido un único compuesto para proceder con ensayos con células humanas. En estos ensayos celulares se ha calculado la concentración mínima del compuesto que inhibe el 50 % del crecimiento celular (IC_{50}), para posteriormente poder realizar ensayos de inmunofluorescencia con el objetivo de visualizar cómo dicho compuesto afecta a la estructura de la β -tubulina.

Este trabajo se relaciona con el siguiente objetivo de desarrollo sostenible de la Agenda 2030: Salud y bienestar (ver anexos).

Palabras clave: citoesqueleto; antineoplásico; inmunofluorescencia; producto natural; taxanos; β -tubulina.

Autor: Daniel Pérez Artiles

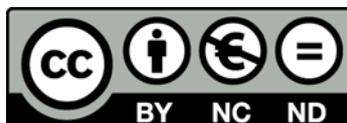
Tutor académico: Prof. Dña. María José Bañuls Polo

Cotutor externo: Dña. María Ángeles Juanes Ortiz

Valencia, julio de 2022

This work is licensed under the Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License. To view a copy of this license, visit

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.



Índice de contenidos

1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Materiales y Métodos	4
3.1 Acoplamiento molecular	4
3.1.1 Proteína diana	4
3.1.2 Generación del ligando	4
3.1.3 Configuración del acoplamiento molecular	4
3.2 Ensayo cristal violeta	5
3.3 Determinación de la concentración inhibidora del 50 % (IC ₅₀)	5
3.4 Inmunofluorescencia.....	5
3.5 Cuantificación del área y de la intensidad de fluorescencia	6
4. Resultados y discusión	8
4.1 Acoplamiento molecular	8
4.2 Curva de crecimiento de la línea A549.....	10
4.3 Determinación de la concentración inhibidora del 50 % (IC ₅₀)	10
4.4 Observación mediante microscopía de campo claro	11
4.5 Ensayo de inmunofluorescencia y cuantificación del área, redondez e intensidad de fluorescencia	12
5. Conclusiones	14
6. Bibliografía	16
7. Anexos	20

Índice de figuras

Figura 1. Trabajo preliminar realizado anteriormente en el laboratorio.	2
Figura 2. Resumen de la metodología utilizada para identificar y cuantificar los efectos del compuesto sobre las células A549	7
Figura 3. Imágenes representativas de un acoplamiento molecular obtenidas a través del programa UCSF Chimera.	8
Figura 4. Curva de crecimiento de las células A549.....	10
Figura 5. Determinación de la concentración inhibidora del 50 % (IC ₅₀).....	10
Figura 6. Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro de células A549	11
Figura 7. Resultados del ensayo de inmunofluorescencia.....	13
Figura 8. Imagen representativa del efecto del tratamiento con el compuesto natural observado por microscopía de fluorescencia	14

Índice de tablas

Tabla 1. Listado de las energías libres de unión estimadas y del número de puentes de hidrógeno que se establecen durante el acoplamiento molecular 9

Listado de abreviaturas

NPs: Productos naturales

SMI: Inhibidoras de moléculas pequeñas ("*small molecule inhibitors*")

PDB: Protein Data Bank

IC₅₀: Concentración inhibidora del 50 %

ddH₂O: Agua destilada y desionizada

PBS: Tampón fosfato salino

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

1. Introducción

Tratamientos antineoplásicos como la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia han hecho posible el tratamiento de muchos tumores sólidos y han dado esperanza a los pacientes diagnosticados con cáncer. Sin embargo, el pronóstico de los pacientes que presentan metástasis sigue siendo lúgubre y se cree que la mayoría de las muertes causadas por cáncer son debidas a la metástasis (Dillekås et al., 2019). El proceso de metástasis se inicia cuando las células cancerosas adquieren propiedades invasivas, entre las cuales se incluyen cambios en la estructura del citoesqueleto. Algunos de los fármacos más exitosos en la quimioterapia incluyen inhibidores del citoesqueleto, en concreto inhibidores del huso mitótico como los alcaloides de la vinca y los taxanos como el taxol (nombre genérico: paclitaxel) (Steinmetz & Prota, 2018; Trendowski, 2014). Ambas familias de fármacos interactúan con la β -tubulina, pero mientras que los taxanos estabilizan los microtúbulos preexistentes impidiendo la formación del huso mitótico, los alcaloides de la vinca impiden la polimerización de los microtúbulos (Tommasi et al., 2007).

Durante la mitosis, estos fármacos provocan la formación de pares de cromátidas que no están unidas a las fibras del huso y activan así el punto de control mitótico, dejando a la célula en un estado de arresto mitótico. El arresto mitótico puede resultar en la muerte celular durante la mitosis o en una salida anormal de esta, sin segregación cromosómica ni citocinesis, para formar una célula tetraploide G1. Esta salida se conoce como deslizamiento mitótico o "*mitotic slippage*". Después del deslizamiento, las células pueden morir, permanecer en arresto mitótico o continuar el ciclo. Todavía se desconocen los factores que determinan el destino de las células después del arresto mitótico (Weaver, 2014).

A pesar de los tratamientos disponibles, el pronóstico de muchos tipos de cáncer sigue siendo sombrío debido a la baja eficacia de las terapias para algunos tipos de cáncer y a la aparición de resistencias a múltiples fármacos después de los tratamientos iniciales de quimioterapia (Wu et al., 2014). Además, los fármacos actuales suelen exhibir efectos secundarios que limitan su dosis, como la neuropatía periférica asociada con taxanos, epotilonas y sus vehículos de administración (Staff et al., 2017). Todo esto conlleva que en la actualidad se esté impulsando la búsqueda de nuevos agentes con mayor biodisponibilidad, ventanas terapéuticas mejoradas, mayor sencillez de síntesis y que produzcan efectos secundarios leves o inexistentes.

Teniendo esto en cuenta, los productos naturales (NPs) han sido históricamente una rica fuente de compuestos biológicamente activos para la industria farmacéutica (Huang et al., 2021). Entre 1981 y 2006, el 63 % de los medicamentos contra el cáncer utilizados en la práctica clínica provienen de NPs, se inspiraron en NPs o se sintetizaron a partir de un farmacóforo natural (Newman & Cragg, 2007). Varios de los compuestos naturales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) estadounidense, como la colchicina, el etopósido y el paclitaxel, se han convertido en fármacos antineoplásicos ampliamente usados en la práctica clínica.

Los NPs poseen importantes ventajas al compararlos con los compuestos químicos sintéticos convencionales. Los NPs han evolucionado para realizar una amplia variedad de actividades biológicas, lo que les otorga un considerable potencial por su "*drug-likeness*" y la capacidad de influir en múltiples vías de señalización simultáneamente sin producir efectos secundarios graves (Anwar et al., 2022). Este aspecto es crucial a la hora de combatir la gran capacidad de supervivencia del cáncer, que a menudo es el resultado de muchos mecanismos moleculares diferentes. Además, el carácter químico y la diversidad de los NPs es más favorable que el de las moléculas sintéticas. En comparación con las bibliotecas sintéticas, las bibliotecas de NPs tienden a tener más centros quirales, mayor complejidad estérica, menos átomos pesados, más

donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno solvatados y una mayor variedad de propiedades moleculares (Taylor & Jabbarzadeh, 2017).

Recientemente, los esfuerzos en investigación contra el cáncer se han centrado en el uso de inhibidores naturales de molécula pequeña (SMI) debido a su pequeño tamaño (peso molecular <500 Da), biodisponibilidad oral, actividad contra dianas intracelulares y extracelulares y penetración de la barrera hematoencefálica (Baldi et al., 2020; Cheng et al., 2020; Islam et al., 2022). Sin embargo, los SMI naturales presentan varios inconvenientes, como la aparición de resistencias, la baja tasa de respuesta, los efectos secundarios no deseados, la biodisponibilidad deficiente, la inestabilidad y la dificultad de síntesis (Nisar et al., 2022; Zhong et al., 2021; Zhu et al., 2022). Por lo tanto, la investigación actual tiene como objetivo identificar nuevos SMI naturales que no presenten dichas desventajas para mejorar el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Algunos de los métodos *in silico* más utilizados para el descubrimiento de nuevos fármacos son los basados en la estimación de la energía libre de unión (Muegge & Hu, 2023; H. Xu, 2023). Siguiendo uno de estos métodos, mediante estudios *in silico* realizados en el laboratorio con 40000 compuestos SMI, se identificaron 5 como nuevos SMI potencialmente antineoplásicos y más seguros que los tradicionales (figura 1).

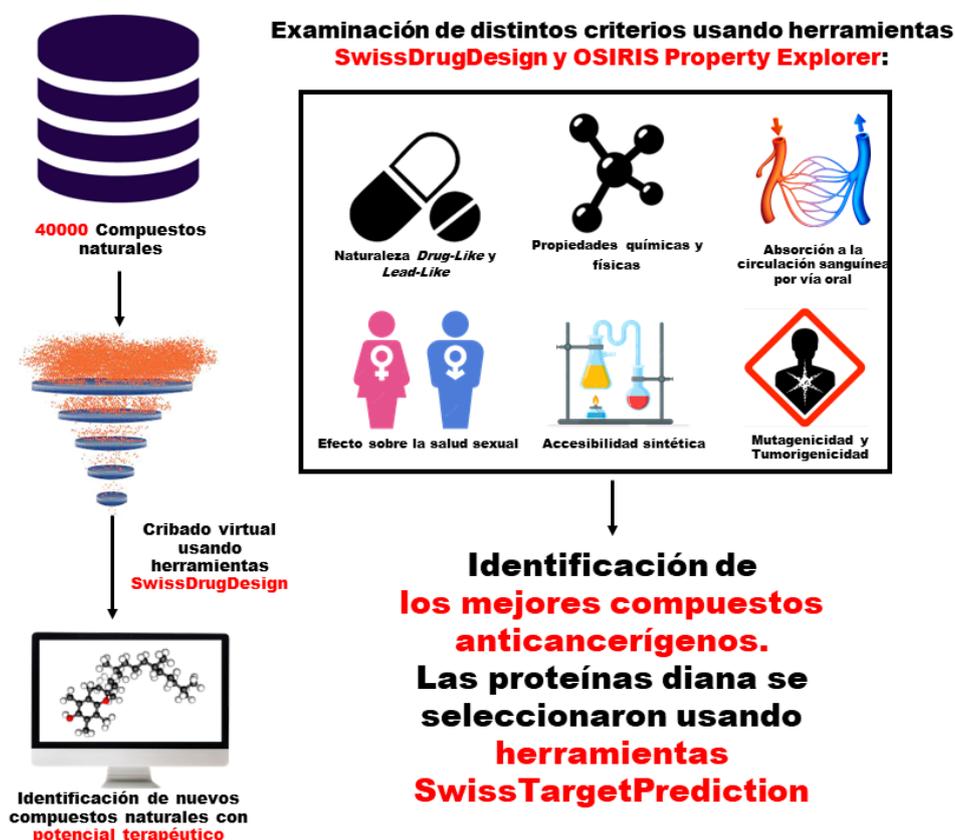


Figura 1. Trabajo preliminar realizado anteriormente en el laboratorio. Siguiendo esta metodología se seleccionaron los 5 nuevos SMI que sirven como punto de partida para este trabajo.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado su validación *in vivo*. En este trabajo se estudió mediante un método *in silico* la unión de estos nuevos SMI a la β -tubulina, lo que permitió la determinación de la energía libre de unión y el número de enlaces de hidrógeno que establecen con su estructura. De entre estos 5 nuevos compuestos seleccionados *in silico* (compuesto #1, compuesto #2, compuesto #3, compuesto #4 y compuesto #5), en este trabajo se utilizó

solamente al compuesto #4 para proceder con su estudio mediante ensayos con células humanas.

Este estudio se centró en ensayos con células de cáncer de pulmón, debido a que actualmente se trata del tipo de cáncer más común del mundo con 1,5 millones de nuevos casos y 1 millón de muertes anuales (Bray et al., 2018; Siegel et al., 2023). Más concretamente, se utilizó la línea celular A549 para los experimentos de este trabajo (Giard et al., 1973), dado que el cáncer de pulmón no microcítico ("*non-small lung cancer*" en inglés) representa el 85 % de los casos de cáncer de pulmón a nivel global (Sosa Iglesias et al., 2018). A pesar de la existencia de tratamientos, el cáncer de pulmón suele manifestar una resistencia intrínseca a los fármacos tras el tratamiento inicial (E. S. Kim, 2016). Es por esta razón que decidimos estudiar si nuestro nuevo SMI tenía potencial terapéutico para tratar este tipo de cáncer. Se calculó la concentración máxima del compuesto que inhibe el 50 % del crecimiento celular (IC_{50}), para posteriormente realizar ensayos de inmunofluorescencia con el objetivo de investigar como dicho compuesto afecta la estructura de la β -tubulina.

2. Objetivos

- Evaluar mediante métodos *in silico* la capacidad de unión a β -tubulina de 5 nuevos SMI y compararlos con 3 fármacos habituales en la práctica clínica (paclitaxel, docetaxel y capecitabina).
- Estudiar el crecimiento de la línea celular A549 (cáncer de pulmón) e identificar el IC_{50} del compuesto con estas células.
- Visualizar el efecto de dicho compuesto sobre la estructura de los microtúbulos mediante microscopía de fluorescencia.

3. Materiales y Métodos

3.1 Acoplamiento molecular

3.1.1 Proteína diana

La estructura de la proteína β -tubulina se obtuvo en formato Protein Data Bank (formato PDB, con extensión .pdb) de RCSB PDB, el centro de datos de EE. UU. para el almacenamiento global de datos de estructura 3D para moléculas biológicas grandes (proteínas, ADN y ARN) (Burley et al., 2021). Se utilizó la estructura de β -tubulina publicada por Banerjee y colaboradores (2018) (identificación de entrada: 6BRY). Los ligandos adjuntos se eliminaron y la minimización de energía se realizó mediante el parámetro de optimización estándar de Swiss-PDBViewer (Guex & Peitsch, 1997).

3.1.2 Generación del ligando

Las estructuras 2D de los compuestos seleccionados se adquirieron de PubChem. PubChem contiene una gran cantidad de estructuras químicas, bioactividad y toxicidad. Además de la interfaz web, PubChem brinda acceso directo a los datos a través de servicios programáticos y descargas FTP (S. Kim et al., 2023).

Las estructuras químicas de los compuestos se generaron en el software ChemSketch (v10.0, ACD Inc., Toronto, ON, Canadá). Los ligandos de formatos MDL Mol (con extensión .Mol) se convirtieron al formato PDB mediante Open Babel (O'Boyle et al., 2011).

3.1.3 Configuración del acoplamiento molecular

El acoplamiento proteína-ligando se probó con AutoDock 4.0, que combina la evaluación de energía a través de redes de afinidad potencial empleando varios algoritmos de búsqueda para encontrar la posición de unión adecuada para un ligando a una proteína dada (Morris et al., 2009). El acoplamiento implicó la adición de hidrógenos polares a los ligandos mediante el módulo de hidrógeno AutoDock y la asignación de cargas parciales de átomos unidos de Kollman. Se siguió un procedimiento de acoplamiento estándar, con individuos colocados al azar y un tamaño de población de 150. El número máximo de evaluaciones de energía fue $2,5 \times 10^7$ y la tasa de mutación fue de 0,2 con una tasa de entrecruzamiento de 0,80. El elitismo era 1 por cada generación. Los resultados se agruparon de acuerdo con el criterio de $1,0 \text{ \AA}$ rmsd con 10 ejecuciones del acoplamiento independientes para cada ligando.

Auto Grid se utilizó para calcular los mapas de cuadrícula que representan proteínas. El tamaño de la cuadrícula se estableció a $60 \times 60 \times 60$ puntos con un espaciado de cuadrícula de $0,375 \text{ \AA}$. Para ejecutar los scripts de acoplamiento molecular, se usó el terminal Cygwin DLL (cygwin1.dll). Cygwin es un entorno similar a Linux para Windows. Consta de dos partes: una DLL (cygwin1.dll) que actúa como una capa de emulación de la API de Linux que brindan una colección de herramientas que proveen una apariencia de Linux. El resultado de la preparación se almacenó luego en un archivo de formato PDB.

Usando la aplicación Auto-DockTools, se agregaron átomos de hidrógeno polares a la estructura de β -tubulina para dar una carga parcial. Además, también se añadieron las cargas de Kollman. Después de eso, el archivo final de la proteína se guardó en formato PDBQT (con extensión .pdbqt). Los archivos Target.pdbqt, Ligand.pdbqt, el archivo de parámetros de cuadrícula (en formato GPF) y un archivo de parámetros de acoplamiento (en formato DPF) se almacenaron en una sola carpeta en Cygwin Terminal. El proceso de acoplamiento se realizó utilizando Autogrid 4.2 y Autodock 4.2 a través de la terminal Cygwin. Las aplicaciones de Autodock se realizaron en

la configuración de Linux. El acoplamiento se realizó presionando "CTRL + ALT + T", escribiendo un comando ADT de terminal y presionando Intro. De esta forma, el programa genera 10 acoplamientos moleculares que luego son evaluados en función de la energía libre de unión del compuesto, seleccionando el acoplamiento con menor energía libre de unión para su visualización (Morris et al., 2009).

Se usó UCSF Chimera para visualizar las coordenadas de las proteínas acopladas a los ligandos dentro de una región de 5 Å y los enlaces de hidrógeno que estabilizan la interacción ligando-proteína (Pettersen et al., 2004). Los gráficos y análisis moleculares realizados con UCSF Chimera fueron desarrollados por Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics de la Universidad de California, San Francisco, con el apoyo de NIH P41-GM103311.

3.2 Ensayo cristal violeta

Para la elaboración de la curva de crecimiento de la línea A549, se siguió una metodología similar a la empleada por Klein y colaboradores (2008). Se sembraron 20000 células en 0,5 mL de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) en una placa de 24 pocillos. Se sembró una placa para cada día del ensayo. Se dejaron adherir las células 24 horas después de la siembra y cada placa se fijó el día oportuno para evaluar el crecimiento de las células en función del tiempo. Para ello, primero se eliminó el medio y se lavó con tampón fosfato salino (PBS) 1x, para posteriormente fijar las células añadiendo 0,5 mL por pocillo de formaldehído 4 %, el cual se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se realizaron dos lavados con 0,5 mL por pocillo de PBS 1x y uno con agua destilada y desionizada (ddH₂O). Cada pocillo se tiñó con 300 µL de una solución de cristal violeta al 0,5 % (0,5 g de cristal violeta en polvo en 100 mL de metanol al 10 %). Como esta solución es sensible a la luz, las placas se envolvieron en papel de aluminio y se incubaron en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de cristal violeta, se realizaron tres lavados con ddH₂O y se disolvieron las células añadiendo 300 µL de una solución de ácido acético (10 % ácido acético, 10 % Metanol y 80 % ddH₂O). Tras incubar las células durante 10 minutos en agitación y en temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 595 nm usando un lector de microplacas.

3.3 Determinación de la concentración inhibidora del 50 % (IC₅₀)

Se sembraron 7000 células en medio de cultivo DMEM en una placa de 96 pocillos. Algunos pocillos con células no se trataron (control) y otros se trataron con varias concentraciones del compuesto de interés durante 72 horas. Todas las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos. Se procedió a realizar el ensayo cristal violeta, del cual se obtuvo la absorbancia a 595 nm usando un lector de microplacas. De cada absorbancia obtenida de células tratadas a cierta concentración se obtiene el correspondiente porcentaje de viabilidad, tomando como 100 % la absorbancia obtenida de las células sin tratar (concentración de compuesto cero). De estos datos se determina la concentración inhibidora máxima que mata al 50 % de células.

3.4 Inmunofluorescencia

Se siguió un protocolo de inmunofluorescencia estándar (Juanes et al., 2020). Las células adheridas se trataron con el compuesto natural de interés a 181 µM (dosis IC₅₀) por 48 o 72 horas, mientras que en paralelo se trataron durante el mismo tiempo células con el vehículo en el que estaba disuelta la droga (Dimetilsulfóxido o DMSO), las cuales sirvieron de control. Posteriormente, todas las células se fijaron con 150 µL de paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS 1x de 5 minutos cada uno, se añadió 150 µL por pocillo de la solución de permeabilización (PBS 1x, 0,5 % triton x-100 y 0,3 M glicina). Este paso de permeabilización solo es necesario cuando el anticuerpo requiere

acceder al interior de la célula para detectar la proteína de interés. Pasados 10 minutos, se eliminó la solución de permeabilización y se realizaron dos lavados de 5 minutos con 150 μ L por pocillo de PBS-Tween (0,1 %). Posteriormente, se añadió 150 μ L por pocillo de solución de bloqueo (BSA 3 % disuelto en PBS-Tween 0,1 %), manteniendo durante este tiempo a las células en agitación. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween (0,1 %) y se incubaron 24 horas las muestras con 150 μ L por pocillo de la solución de anticuerpo primario (dilución 1:1500 del anticuerpo α -tubulina de mouse en PBS-Tween 0,1 %).

Al día siguiente se lavaron 3 veces las muestras con PBS-Tween (0,1 %) y se añadieron 150 μ L por pocillo de la solución con el anticuerpo secundario, que contiene 1 μ L de Alexa fluor anti-mouse (633 nm, 1:1500) y Alexa fluor faloidina (488 nm, 1:1000) en 1 mL de PBS-Tween (0,1 %). La faloidina es un fluoróforo que permite visualizar los filamentos de actina en las células. En este paso hay que tener especial cuidado cubriendo las placas con papel de aluminio para evitar la pérdida de fluorescencia por la luz. Las muestras se lavaron nuevamente tres veces con PBS-Tween (0,1 %) y luego se añadieron 150 μ L por pocillo de la solución de tinción DAPI (6 μ L de DAPI en 1500 mL de PBS). Después de un último lavado de 5 minutos con PBS 1x, se aplicaron 1 o 2 gotas de medio de montaje Ibidi. Todas las muestras se observaron por microscopía de fluorescencia (mediante el microscopio invertido DMI8 Leica) a 405 nm, 488 nm y 633 nm utilizando el software LAS X. La toma de imágenes a estas respectivas longitudes de onda permitió visualizar el núcleo marcado con DAPI, los filamentos de actina marcados con faloidina y los microtúbulos marcados con tubulina. De cada canal de fluorescencia se obtuvieron 15 planos en Z, con 0,7 μ m de diferencia entre cada uno y para los 3 canales de fluorescencia.

3.5 Cuantificación del área y de la intensidad de fluorescencia

Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia fueron analizadas mediante ImageJ. ImageJ es un programa de procesamiento digital de imagen de dominio público desarrollado por la agencia estadounidense National Institutes of Health, que además proporciona extensibilidad mediante plugins y macros (macroinstrucciones).

En primer lugar, las imágenes obtenidas con formato LIF (con extensión .lif) se procesaron con macros customizadas que están depositadas en el repositorio Zenodo (<https://zenodo.org/record/7528387>). Específicamente, se convirtieron a formato TIFF (con extensión .tif) con la proyección de los 15 planos como una sola imagen por canal mediante la macro adaptada llamada "*convert LIF tiff_sum slices_all channels*", para luego visualizarlas mediante ImageJ y seleccionar las células para la cuantificación de las distintas señales de fluorescencia. La selección de las células se realizó dibujando manualmente los contornos de células individuales y generando una imagen con formato TIFF por célula seleccionada. La señal de fluorescencia dentro de estas selecciones se cuantificó mediante otra macro adaptada llamada "*MeasureConVonSelection*". De estas selecciones, en el programa ImageJ se obtuvo un fichero CVS (con extensión .cvs) con los siguientes parámetros: área (medida en μ m²), intensidad de fluorescencia y redondez (calculada como $4 \cdot \text{área} / [\pi \cdot \text{eje mayor}^2]$), para cada canal de fluorescencia. Los datos correspondientes a cada parámetro se exportaron a GraphPad9 para la obtención de gráficas comparando las áreas de células tratadas y sin tratar con el compuesto, así como la intensidad de fluorescencia de la actina y de la tubulina total por célula. Se realizaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney para mostrar diferencias entre condiciones celulares en GraphPad9. El mismo procesamiento de datos se hizo para muestras tratadas y sin tratar de tres días experimentales independientes.

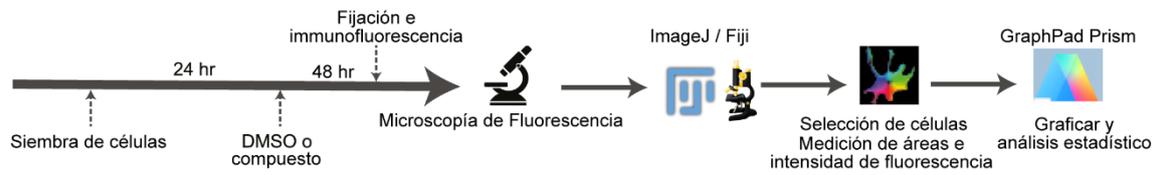


Figura 2. Resumen de la metodología utilizada para identificar y cuantificar los efectos del compuesto sobre las células A549. Después de obtener imágenes del ensayo de fluorescencia, se utilizó el programa ImageJ / Fiji para seleccionar manualmente el área de las células y cuantificar automáticamente su área e intensidad de fluorescencia en los distintos canales, así como otros parámetros morfológicos como la redondez. Finalmente, en el programa GraphPad9 se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos y se representaron gráficamente.

4. Resultados y discusión

4.1 Acoplamiento molecular

Se estudió la interacción entre los cinco nuevos compuestos naturales y la β -tubulina simulando sus respectivos acoplamientos moleculares y comparándolos con los compuestos clásicamente utilizados para la terapia contra el cáncer. Primero se buscó en la base de datos PDB la estructura de la β -tubulina (figura 3). La estructura de los cinco nuevos SMI objetos de estudio y la de los tres compuestos utilizados en práctica clínica (paclitaxel, docetaxel y capecitabina) se generaron dibujando manualmente su estructura en el programa ChemSketch. Una vez obtenida la estructura de todas las moléculas, se siguió el proceso de acoplamiento molecular descrito anteriormente en el apartado de materiales y métodos. Utilizando Autogrid 4.2 y Autodock 4.2 a través de la terminal Cygwin, se obtuvieron las energías libres de unión de cada compuesto con la β -tubulina (tabla 1) y luego se visualizó el acoplamiento a través del programa UCSF Chimera (figura 3).

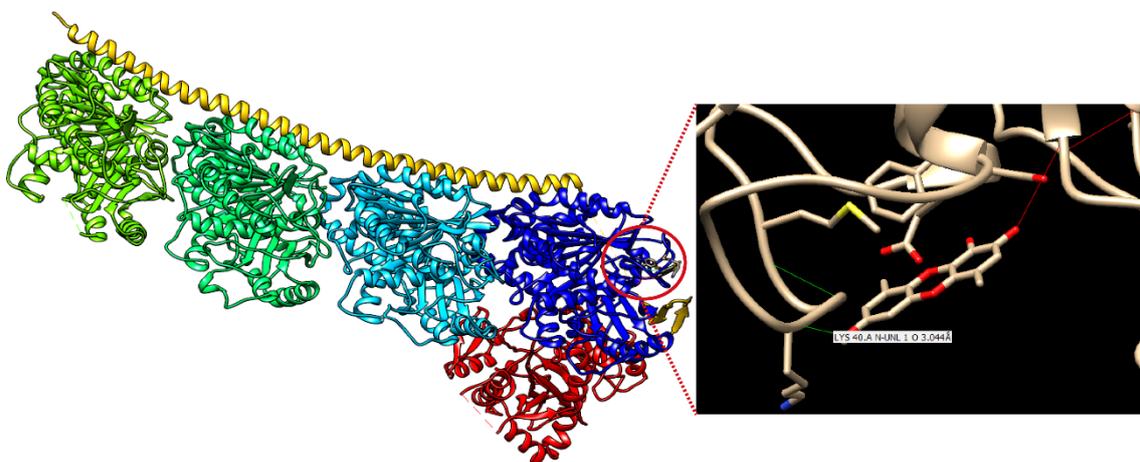


Figura 3. *Imágenes representativas de un acoplamiento molecular obtenidas a través del programa UCSF Chimera. A la izquierda se puede observar la estructura de β -tubulina unida al compuesto de interés, resaltado por un círculo en rojo. A la derecha, una imagen ampliada del sitio de unión del compuesto a la proteína, pudiendo observarse también los puentes de hidrógeno que estabilizan el acoplamiento.*

La energía libre de unión se define como la diferencia de energía libre entre la estructura de la proteína acoplada al compuesto y la estructura de la proteína sin ningún ligando acoplado. Por tanto, los acoplamientos obtenidos que arrojen menor energía libre de unión serán más estables y prometedores para proceder con experimentos con células humanas y validar su eficacia como antineoplásico (H. Xu, 2023). Los resultados obtenidos (tabla 1) muestran que la unión de los cinco compuestos naturales de interés a la β -tubulina resulta en acoplamientos estables con una baja energía libre de unión incluso al compararse con los compuestos clásicamente utilizados en práctica clínica. De entre estos cinco nuevos compuestos naturales, por razones logísticas y de accesibilidad, se seleccionó al compuesto #4 para validar sus propiedades en ensayos con células de cáncer de pulmón (línea A549).

Tabla 1. Listado de las energías libres de unión estimadas y del número de puentes de hidrógeno que se establecen durante el acoplamiento molecular. En esta tabla, UNL se refiere al ligando o compuesto unido a β -tubulina.

	Compuesto	Energía libre de unión (kcal/mol)	Puentes de hidrógeno		
Nuevos compuestos naturales	Compuesto #1	-8,2	4	ASN 101.A ND2-UNL 1 O 2,601 Å	
				GLY 144.A N-UNL 1 O 2,897 Å	
				UNL 1 O-TYR 224.A OH 2,867 Å	
				UNL 1 O-VAL 177.A O 3,192 Å	
	Compuesto #2	-7,8	4	ASN 101.A ND2-UNL 1 O UNL 1 O-GLU 183.A OE2 2,849 Å UNL 1 O-GLU 183.A OE1 2,676 Å GLY 144.A N-UNL 1 O 3,302 Å	
			1	THR 41.A N-UNL 1 O 3,078 Å	
				LYS 40.A N-UNL 1 O 3,044 Å	
	Compuesto #5	6,7	5	UNL 1 O-ASP 98.A OD2 2,337 Å GLY 13.A N-UNL 1 O 3,263 Å SER 140.A N-UNL 1 O 2,959 Å SER 140.A OG-UNL 1 O 2,453 Å UNL 1 O-VAL 9.A O 2,517 Å	
			5	ALA 99.A N-UNL 1 O 3,145 Å UNL 1 O-GLN 11.A OE1 3,005 Å THR 145.A OG1-UNL 1 O 2,840 Å THR 179.A OG1-UNL 1 N 3,359 Å UNL 1 O-THR 179.A OG1 3,063 Å	
				9	UNL 1 O-ASP 98.A OD2 2,225 Å UNL 1 O-GLU 71.A OE2 3,247 Å LYS 252.B NZ-UNL 1 O 2,545 Å SER 140.A OG-UNL 1 O 1,897 Å SER 140.A OG-UNL 1 O 2,791 Å UNL 1 O-SER 140.A O 3,458 Å SER 140.A N-UNL 1 O 2,307 Å UNL 1 O-VAL 68.A O 3,026 Å UNL 1 O-VAL 9.A O 3,000 Å
2					SER 140.A OG-UNL 1 O 2,665 Å SER 140.A N-UNL 1 O 2,977 Å
					2
Docetaxel	1,1e+003	9	UNL 1 O-ASP 98.A OD2 2,225 Å UNL 1 O-GLU 71.A OE2 3,247 Å LYS 252.B NZ-UNL 1 O 2,545 Å SER 140.A OG-UNL 1 O 1,897 Å SER 140.A OG-UNL 1 O 2,791 Å UNL 1 O-SER 140.A O 3,458 Å SER 140.A N-UNL 1 O 2,307 Å UNL 1 O-VAL 68.A O 3,026 Å UNL 1 O-VAL 9.A O 3,000 Å		
			Paclitaxel		5,2e+003

4.2 Curva de crecimiento de la línea A549

Como paso preliminar, se estudió el crecimiento de las células de la línea A549 sin la presencia del compuesto. Con este objetivo, se dejaron crecer las células en placas asignadas a cada día del ensayo y se midió la densidad óptica a 595 nm tras realizar la tinción con cristal violeta. Los datos obtenidos se pueden relacionar directamente con el número de células viables y se representaron gráficamente obteniendo la curva de crecimiento de la figura 4. Este resultado es coherente con otras curvas de crecimiento de la línea A549 publicadas en la literatura (Klein et al., 2008; Lawal et al., 2018).

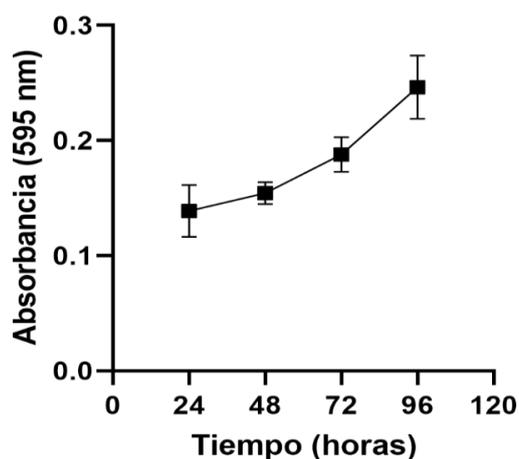


Figura 4. Curva de crecimiento de las células A549. La medida de absorbancia se correlaciona con la viabilidad celular a distintos días desde el inicio del cultivo y sin presencia del compuesto.

4.3 Determinación de la concentración inhibidora del 50 % (IC₅₀)

Siguiendo la misma metodología, se procedió a determinar la IC₅₀ creciendo las células en presencia del compuesto natural de interés. Las células se trataron con diferentes concentraciones del compuesto durante 72 horas, tras lo cual se fijaron y se estudió su viabilidad mediante el método cristal violeta (figura 5). La IC₅₀ obtenida fue de 181 μ M y fue la concentración utilizada en los ensayos realizados posteriormente en este trabajo.

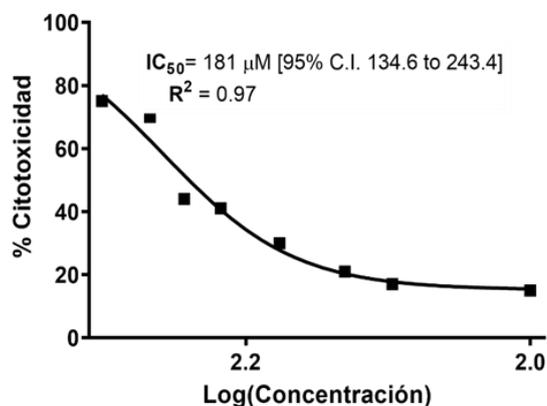


Figura 5. Determinación de la concentración inhibidora del 50 % (IC₅₀). El valor obtenido fue de 181 μ M.

4.4 Observación mediante microscopía de campo claro

A continuación, se observaron mediante microscopía de campo claro las células crecidas durante 48 y 72 horas con o sin el tratamiento con el compuesto (figura 6). Esto permitió visualizar e interpretar de forma cualitativa el efecto del compuesto sobre la morfología de las células. Aunque la IC_{50} se determinó a las 72 horas, los ensayos de microscopía también se realizaron 48 horas después del tratamiento para poder tener un menor porcentaje de células muertas o no viables, las cuales emiten autofluorescencia y podrían interferir con resultados posteriores relacionados con fluorescencia de emisión por parte de los microtúbulos.

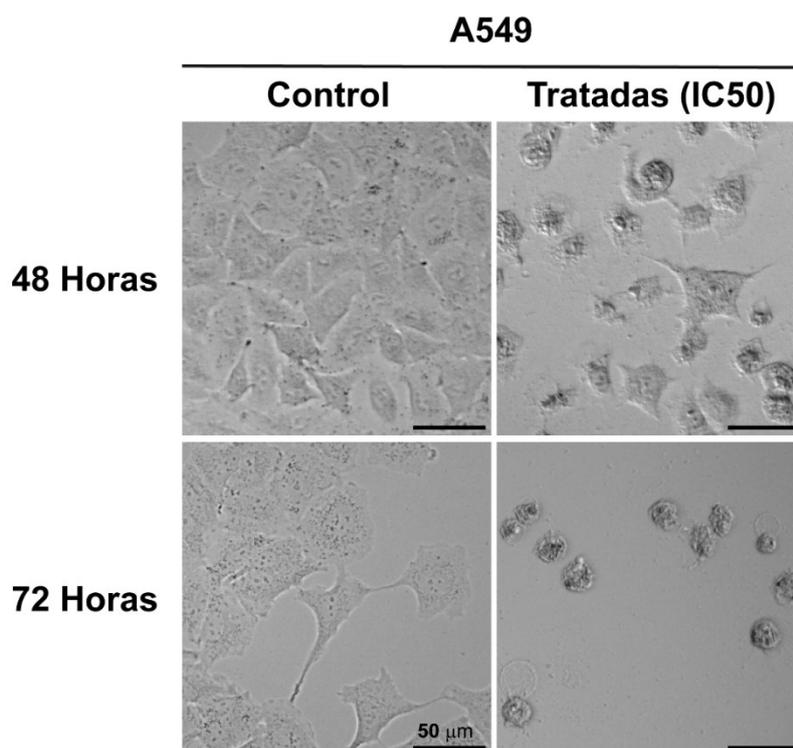


Figura 6. Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro de células A549. Se compararon células cultivadas durante 48 o 72 horas, así como tratadas con el compuesto a concentración inhibitoria del 50 % (IC_{50}) y no tratadas (control).

Por lo general, el tratamiento con el compuesto parece resultar en un mayor número de células redondeadas y no adheridas en comparación con las células no tratadas. Además de la pérdida de adherencia y la disposición en monocapa (debido al crecimiento de células después de varios días en la placa, ya que inicialmente se sembraron de forma aislada), se observó que las células afectadas por el tratamiento también presentaban un menor tamaño al compararse con las células no tratadas.

Esta morfología redondeada, también conocida como “*bleb*” en inglés, es típica de las células apoptóticas o necróticas, las cuales tienen inducida la muerte celular y suelen presentar un desacoplamiento entre el citoesqueleto y la membrana plasmática de las células (X. Xu et al., 2019). Este fenotipo se correlaciona con el hecho de que se observaban muchas menos células por campo en las muestras tratadas comparando con células sin tratamiento.

4.5 Ensayo de inmunofluorescencia y cuantificación del área, redondez e intensidad de fluorescencia

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con el compuesto sobre el citoesqueleto de las células, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos α -tubulina para visualizar los microtúbulos, así como con faloidina para visualizar los filamentos de actina y con DAPI para la tinción de los núcleos celulares. Se tomaron imágenes de los diferentes fluoróforos a diferentes planos de las células con el microscopio *wide-field* Leica DMI8 (panel A de la figura 7). Las imágenes se procesaron en el programa ImageJ/Fiji. Posteriormente, se cuantificó el área y las intensidades de fluorescencia emitidas por los microtúbulos y por la actina. Estos datos se graficaron en el programa GraphPad9 (panel B de la figura 7).

Las imágenes obtenidas de las células control o no tratadas permitieron visualizar la organización del citoesqueleto de actina y tubulina. La actina se localiza en toda la célula y en algunas zonas del citoplasma celular se encuentra formando fibras de estrés claramente visibles. Por otro lado, los microtúbulos de tubulina también están localizados alrededor de toda la célula de manera bastante lineal, aunque presentan mayor visibilidad alrededor del núcleo teñido con DAPI al emanar a partir del centrosoma.

Sin embargo, la organización descrita anteriormente está menos definida en las células sometidas al tratamiento con el compuesto, puesto que las fibras de estrés de actina no son tan perceptibles y la disposición de los microtúbulos parece depender en menor medida de la localización del centrosoma, quedando encogidos hacia el núcleo, presentando menor linealidad y roturas aparentes.

En cuanto a los datos de cuantificación, se encontraron diferencias significativas en el área, redondez e intensidades de fluorescencia de actina y tubulina. Los datos mostraron que las células tratadas presentaban menor área y mayor redondez que las células sin tratar; resultado acorde con la interpretación cualitativa de la observación por microscopía de campo claro.

Cabe destacar que se obtuvo menor intensidad de fluorescencia total de tubulina en las células tratadas, posiblemente debido a que el compuesto active la despolimerización de microtúbulos o inhiba de algún modo su polimerización. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con la intensidad de fluorescencia de tubulina, la intensidad de fluorescencia de actina es significativamente mayor en las células sometidas al tratamiento con el compuesto. Este aumento de intensidad es fácilmente apreciable (figura 8) y puede deberse al efecto de autofluorescencia característico de células muertas o en apoptosis (Alturkistany et al., 2019), lo que apoya la noción de que el compuesto natural es capaz de inducir la muerte celular y no tiene un efecto únicamente citostático. Esto también está en concordancia con la morfología “*bleb*” observada en las células afectadas por el tratamiento.

El aumento de autofluorescencia queda reflejado de manera más significativa para la actina que para la tubulina ya que, después del tratamiento, la actina sigue esparcida por toda la célula y toda el área celular aparece autofluorescente. Teniendo en cuenta que el área celular cuantificada es la misma para el canal de actina que para el de tubulina, así como que los microtúbulos se encogen o retraen hacia el núcleo y se rompen después del tratamiento, la autofluorescencia (con relación al área total de la célula) resulta menos intensa en el canal de tubulina. Es por esto por lo que el dato de fluorescencia total de tubulina no se ve tan afectado en las células tratadas como sucede en la cuantificación de actina.

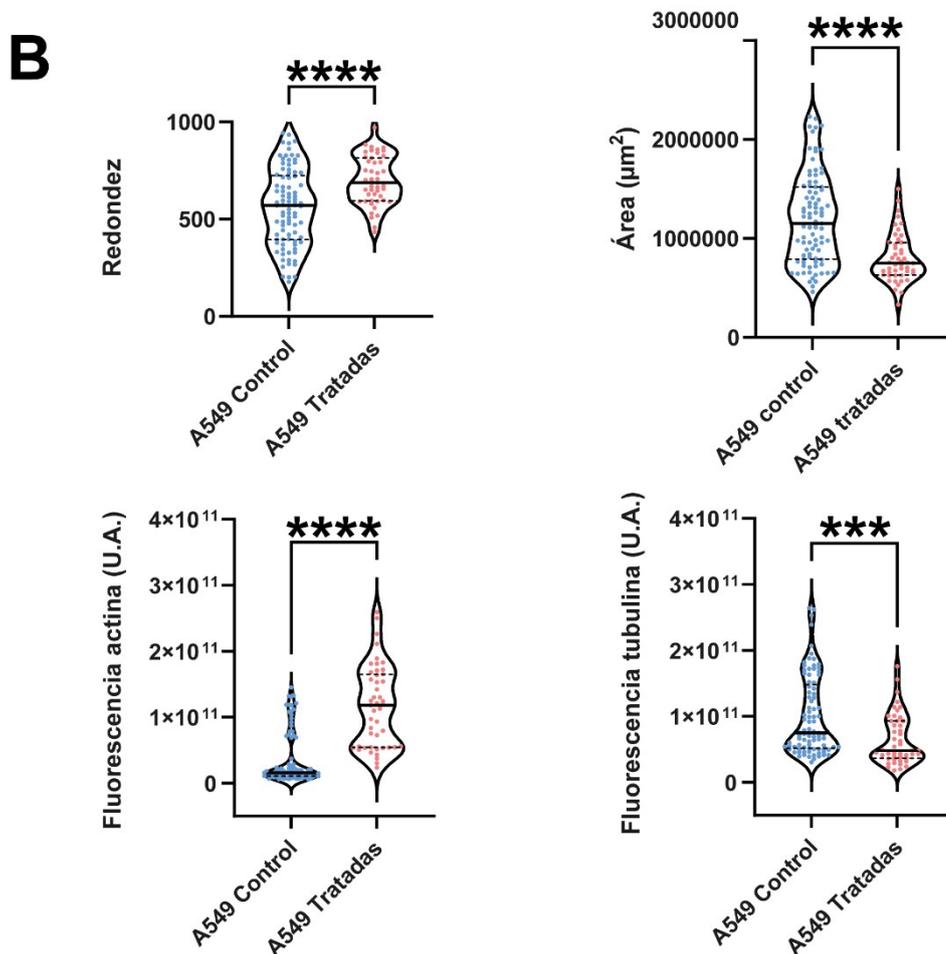
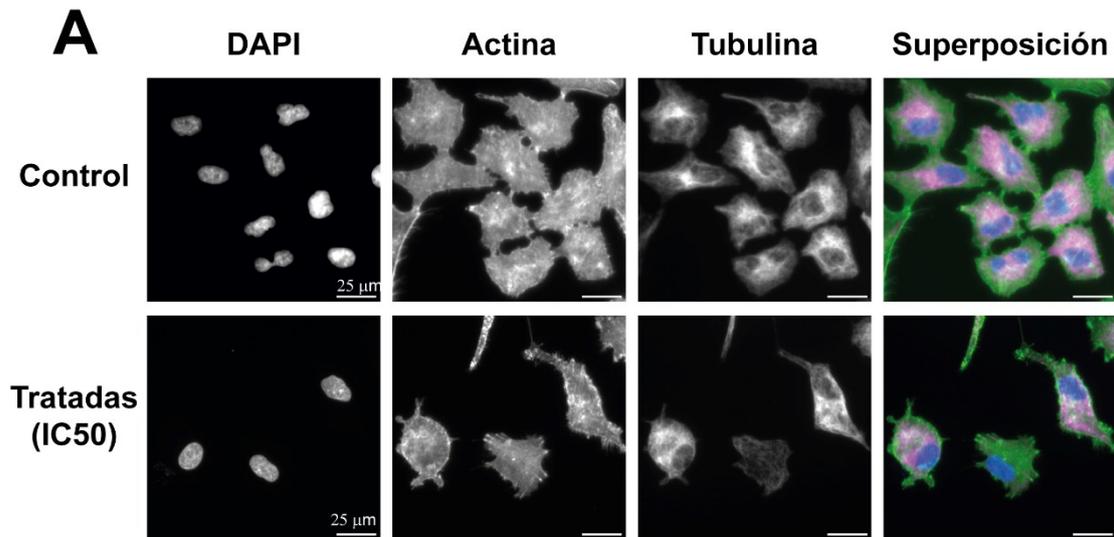


Figura 7. Resultados del ensayo de inmunofluorescencia. A) Resultados de la observación por microscopio de fluorescencia de los canales de DAPI, actina y tubulina (observados a 405 nm, 488 nm y 633 nm respectivamente), así como de la superposición de estos tres canales. B) Representación gráfica de la cuantificación de la redondez, área e intensidad de fluorescencia de actina y tubulina (medidas en unidades arbitrarias o U.A.), comparando células no tratadas ($n=89$) con tratadas con la dosis IC_{50} ($n=47$). La barra continua muestra la media, mientras que las dos barras discontinuas muestran el primer y tercer cuartil. La diferencia estadística se obtuvo empleando una prueba no paramétrica de Mann-Whitney; (**), $p < 0,005$; (****), $p < 0,001$.

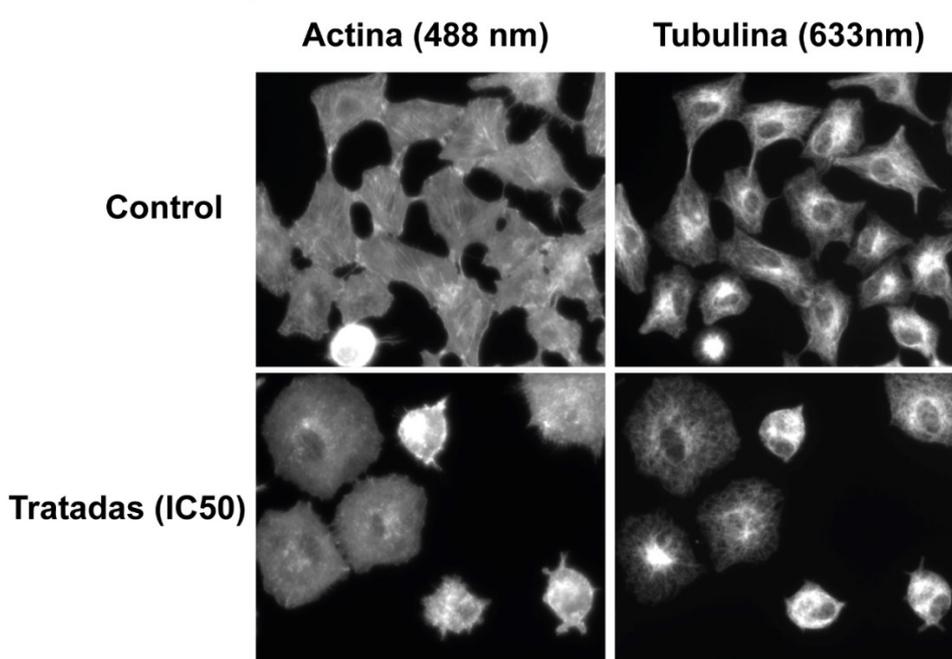


Figura 8. Imagen representativa del efecto del tratamiento con el compuesto natural observado por microscopía de fluorescencia. Las células más visiblemente afectadas por el tratamiento presentan una morfología redondeada y una mayor intensidad de fluorescencia características de células apoptóticas.

5. Conclusiones

- Se han estimado los valores de la energía libre de unión resultantes del acoplamiento molecular entre los cinco nuevos compuestos naturales y la tubulina. Estos valores son relativamente bajos al compararse con los estimados para los compuestos clásicamente utilizados en práctica clínica, lo que sugiere que los nuevos compuestos presentan potencial como posibles inhibidores del huso mitótico.
- El compuesto #4 es capaz de promover muerte celular de las células de cáncer de pulmón A549.
- El efecto que tiene el compuesto #4 sobre la morfología celular y la organización del citoesqueleto parece indicar que la muerte celular se produce por apoptosis.

Como continuación a los experimentos descritos en este trabajo, se pueden idear diversos ensayos a realizar próximamente en el laboratorio para seguir elucidando el potencial antineoplásico del compuesto #4. Uno de estos sería realizar experimentos similares a los descritos en este trabajo utilizando líneas celulares de otros tipos de cáncer comunes (como por ejemplo cáncer de mama o de colon), para determinar el espectro de aplicación del nuevo compuesto. Asimismo, es necesario realizar ensayos comparando los efectos sobre células humanas de este compuesto con otros compuestos actualmente disponibles en el mercado, para así poder identificar sus posibles beneficios o ventajas.

Otra continuación para esta línea de investigación sería el estudio del mecanismo celular mediante el cual induce la muerte celular, lo que posiblemente permitiría la mejora posterior de sus propiedades farmacocinéticas como su biodisponibilidad y resistencia a la degradación.

Por último, sería conveniente probar los efectos del compuesto en células no cancerosas (como por ejemplo fibroblastos) y en células procedentes de muestras tanto de individuos sanos como

de pacientes (como por ejemplo muestras de biopsias) para evaluar su eficacia antes de proceder a realizar experimentos con modelos animales.

Toda la metodología descrita en este trabajo, así como las proyecciones futuras mencionadas anteriormente, sirven como prototipo para la evaluación del resto de compuestos naturales identificados como potenciales inhibidores del huso mitótico mediante el estudio *in silico*.

6. Bibliografía

- ALTURKISTANY, F., NICHANI, K., HOUSTON, K. D., & HOUSTON, J. P. (2019). Fluorescence lifetime shifts of NAD(P)H during apoptosis measured by time-resolved flow cytometry. *Cytometry Part A*, *95*(1), 70-79. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23606>
- ANWAR, M. M., ALBANESE, C., HAMDY, N. M., & SULTAN, A. S. (2022). Rise of the natural red pigment 'prodigiosin' as an immunomodulator in cancer. *Cancer Cell International*, *22*(1), 419. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02815-4>
- BALDI, G. G., GRONCHI, A., & STACCHIOTTI, S. (2020). Pexidartinib for the treatment of adult symptomatic patients with tenosynovial giant cell tumors. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *13*(6), 571–576. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1771179>
- BANERJEE, S., ARNST, K. E., WANG, Y., KUMAR, G., DENG, S., YANG, L., LI, G., YANG, J., WHITE, S. W., LI, W., & MILLER, D. D. (2018). Heterocyclic-Fused Pyrimidines as Novel Tubulin Polymerization Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site: Structural Basis and Antitumor Efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(4), 1704–1718. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01858>
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., & JEMAL, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- BURLEY, S. K., BHIKADIYA, C., BI, C., BITTRICH, S., CHEN, L., CRICLOW, G. V, CHRISTIE, C. H., DALENBERG, K., DI COSTANZO, L., DUARTE, J. M., DUTTA, S., FENG, Z., GANESAN, S., GOODSSELL, D. S., GHOSH, S., GREEN, R. K., GURANOVIĆ, V., GUZENKO, D., HUDSON, B. P., ... ZHURAVLEVA, M. (2021). RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D437–D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
- CHENG, J., ZHAO, H., WANG, J., HAN, Y., & YANG, X. (2020). Bioactive Natural Small Molecule-Tuned Coassembly of Photosensitive Drugs for Highly Efficient Synergistic and Enhanced Type I Photochemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*(39), 43488–43500. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c13164>
- DILLEKÅS, H., ROGERS, M. S., & STRAUME, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, *8*(12), 5574–5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H., & PARKS, W. P. (1973). In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *51*(5), 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>
- GUEx, N., & PEITSCH, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*(15), 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>

- HUANG, M., LU, J.-J., & DING, J. (2021). Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Natural Products and Bioprospecting*, 11(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00293-7>
- SOSA IGLESIAS, V., GIURANNO, L., DUBOIS, L. J., THEYS, J., & VOOIJS, M. (2018). Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Potential for NOTCH Targeting? *Frontiers in Oncology*, 8(JUL), 267. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00267>
- ISLAM, MD. R., ISLAM, F., NAFADY, M. H., AKTER, M., MITRA, S., DAS, R., URMEE, H., SHOHAG, S., AKTER, A., CHIDAMBARAM, K., ALHUMAYDHI, F. A., EMRAN, T. BIN, & CAVALU, S. (2022). Natural Small Molecules in Breast Cancer Treatment: Understandings from a Therapeutic Viewpoint. *Molecules*, 27(7), 2165. <https://doi.org/10.3390/molecules27072165>
- JUANES, M. A., FEES, C. P., HOEPRICH, G. J., JAISWAL, R., & GOODE, B. L. (2020). EB1 Directly Regulates APC-Mediated Actin Nucleation. *Current Biology*, 30(23), 4763–4772. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.094>
- KIM, E. S. (2016). Chemotherapy Resistance in Lung Cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 893, 189–209. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_10
- KIM, S., CHEN, J., CHENG, T., GINDULYTE, A., HE, J., HE, S., LI, Q., SHOEMAKER, B. A., THIESSEN, P. A., YU, B., ZASLAVSKY, L., ZHANG, J., & BOLTON, E. E. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>
- KLEIN, A., HOLKO, P., LIGEZA, J., & KORDOWIAK, A. M. (2008). Sodium Orthovanadate Affects Growth of Some Human Epithelial Cancer Cells (A549, HTB44, DU145). *Folia Biologica*, 56(3), 115–121. https://doi.org/10.3409/fb.56_3-4.115-121
- LAWAL, O., KNOBEL, H., WEDA, H., BOS, L. D., NIJSEN, T. M. E., GOODACRE, R., & FOWLER, S. J. (2018). Volatile organic compound signature from co-culture of lung epithelial cell line with *Pseudomonas aeruginosa*. *The Analyst*, 143(13), 3148–3155. <https://doi.org/10.1039/C8AN00759D>
- MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S., & OLSON, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- MUEGGE, I., & HU, Y. (2023). Recent Advances in Alchemical Binding Free Energy Calculations for Drug Discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 14(3), 244–250. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00541>
- NEWMAN, D. J., & CRAGG, G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461–477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>
- NISAR, S., MASOODI, T., PRABHU, K. S., KUTTIKRISHNAN, S., ZARIF, L., KHATOON, S., ALI, S., UDDIN, S., AKIL, A. A.-S., SINGH, M., MACHA, M. A., & BHAT, A. A. (2022). Natural products as chemo-radiation therapy sensitizers in cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113610. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113610>

- O'BOYLE, N. M., BANCK, M., JAMES, C. A., MORLEY, C., VANDERMEERSCH, T., & HUTCHISON, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C., & FERRIN, T. E. (2004). UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., WAGLE, N. S., & JEMAL, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- STAFF, N. P., GRISOLD, A., GRISOLD, W., & WINDEBANK, A. J. (2017). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Annals of Neurology*, 81(6), 772–781. <https://doi.org/10.1002/ana.24951>
- STEINMETZ, M. O., & PROTA, A. E. (2018). Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. In *Trends in Cell Biology*, 28(10), 776-792. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001>
- TAYLOR, W. F., & JABBARZADEH, E. (2017). The use of natural products to target cancer stem cells. *American Journal of Cancer Research*, 7(7), 1588–1605.
- TOMMASI, S., MANGIA, A., LACALAMITA, R., BELLIZZI, A., FEDELE, V., CHIRIATTI, A., THOMSEN, C., KENDZIERSKI, N., LATORRE, A., LORUSSO, V., SCHITTULLI, F., ZITO, F., KAVALLARIS, M., & PARADISO, A. (2007). Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. *International Journal of Cancer*, 120(10), 2078–2085. <https://doi.org/10.1002/ijc.22557>
- TRENDOWSKI, M. (2014). Exploiting the cytoskeletal filaments of neoplastic cells to potentiate a novel therapeutic approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1846(2), 599–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.09.007>
- WEAVER, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), 2677–2681. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>
- WU, Q., YANG, Z., NIE, Y., SHI, Y., & FAN, D. (2014). Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters*, 347(2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013>
- XU, H. (2023). The slow but steady rise of binding free energy calculations in drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 37(2), 67–74. <https://doi.org/10.1007/s10822-022-00494-x>
- XU, X., LAI, Y., & HUA, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- ZHONG, L., LI, Y., XIONG, L., WANG, W., WU, M., YUAN, T., YANG, W., TIAN, C., MIAO, Z., WANG, T., & YANG, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>

ZHU, Y., OUYANG, Z., DU, H., WANG, M., WANG, J., SUN, H., KONG, L., XU, Q., MA, H., & SUN, Y. (2022). New opportunities and challenges of natural products research: When target identification meets single-cell multiomics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(11), 4011–4039. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.08.022>

7. Anexos

Anexo 1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

Este trabajo está relacionado con el objetivo número 3 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030, que tiene por objeto la salud y busca garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades. Más concretamente, la temática de este trabajo está muy relacionada con la meta 3.4 de dicho objetivo, puesto que se ha intentado validar la eficacia de un nuevo producto natural para contribuir al tratamiento de una enfermedad no transmisible y con alta incidencia como es el cáncer.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X