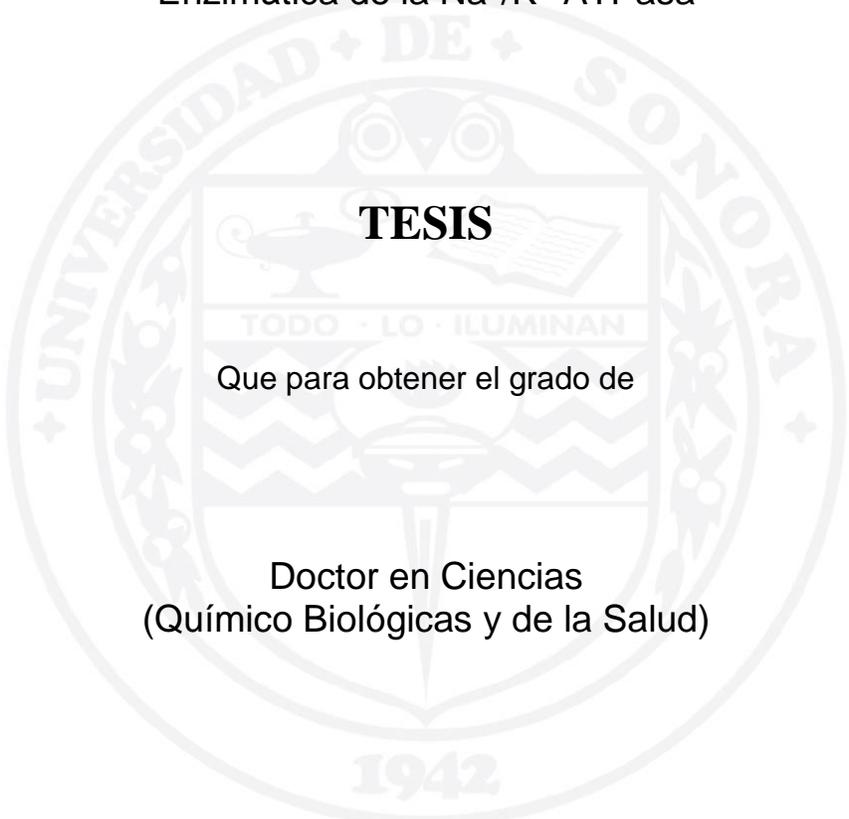


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Modelo Molecular de la Interacción de Glucósidos Cardenólidos
Aislados de *Asclepias subulata* y su Efecto *in vitro* en la Actividad
Enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa



TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias
(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta

Salvador Enrique Meneses Sagrero

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2021

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



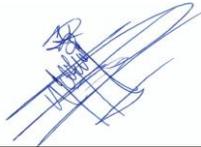
“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



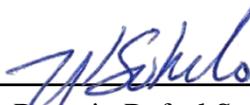
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros de jurado designado para revisar la Tesis de **Salvador Enrique Meneses Sagrero** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Doctor en Ciencias (Químico Biológicas y de la Salud).



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Director de Tesis



Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Co-Director



Dra. Luisa Alondra Rascón Valenzuela
Secretaria



Dr. Juan Carlos García Ramos
Sinodal Externo



Dr. Wagner Vilegas
Sinodal Externo

Agradecemos el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: “Identificación y caracterización química y biológica de compuestos con actividad anticancerígena de plantas de la etnofarmacopea sonorensis” (Clave CONACyT 83462).

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis se lo dedico a mi familia que son los pilares y las personas más importantes para mí, quienes me mantienen motivado, siempre buscando mejorar como persona y superarme como profesional. A mi madre de quien siempre estaré orgulloso de ser su hijo y que nos enseñó que siempre podemos hacer algo para salir adelante y sacar fuerzas para luchar por nuestros sueños. A mi padre de quien aprendimos que con trabajo duro y esfuerzo se pueden lograr muchas cosas que a veces pensamos que son imposibles. A mis hermanas que siempre están ahí para apoyarme y darme ánimos para continuar mi camino hacia mis metas. A mis cuñados que siempre me ayudan a despejarme y a divertirme. A mis niños que siempre que los veo me hacen reír con sus ocurrencias.

“Un científico en su laboratorio no es más que un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como cuentos de hadas”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, agradezco a Dios por permitirme levantarme cada día con una nueva oportunidad para cumplir mis metas y objetivos, así como por cuidar de mis seres queridos todos los días.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda por haberse tomado aquellos minutos en el “Café Olimpus” un marzo de 2014 y haberme dado la confianza y oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, así como por toda la paciencia, consejos, conocimiento y apoyo durante estos casi 7 años de trabajo.

Agradezco a mi comité sinodal, a la Dra. Luisa Alondra Rascón Valenzuela, al Dr. Rogerio Sotelo Mundo, al Dr. Juan Carlos García Ramos y al Dr. Wagner Vilegas por todos sus consejos, retroalimentaciones, apoyo académico y moral durante mi estadía en el programa de doctorado.

A la Dra. Yanis y el Dr. Juan Carlos por haberme recibido durante mi estancia doctoral, por apoyarme, escucharme y aconsejarme dentro y fuera del laboratorio, así como a los chicos del nano team: White, Arenas, Chuy, Gama y Capi, se echa de menos las idas a cenar al “Burguespinos”.

A mis compañeros de UABC Ensenada, campus Sauzal, Zeila y Prats por todas las risas, experiencias y solidaridad en las noches solitarias de experimentos en el campus. A Daniela “la mejor guía de turista” de Ensenada y “la guía del buen camino” gracias por todos los buenos momentos, risas, y buenas experiencias dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Humberto, Yeimi, Luisa, Alberto, Jackie, Julio y Alma, así como a mis amigos fuera de la Universidad: Sergio, Emanuel, Reynaldo, José, Dulce, Edith, Alex, Mario, Ana Karenth, Judas, Lili Pz, Urrea, Jasmín, Monica, Fabiola y Polly, muchas gracias por su entrañable amistad, por todas las experiencias, buenos momentos, risas, consejos, y apoyo incondicional.

A mis compañeros de generación de doctorado Ivonne, Brenda y David por los buenos momentos, no tengo dudas de que todos seremos excelentes profesionistas.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Aldo Arvizu Flores, a la Dra. Elena Nohelí Moreno, al Dr. Efraín Alday y al Mtro. Cesar Otero por todo su apoyo, consejos y asesorías durante el desarrollo de este trabajo de tesis. Así como al personal de Q.B., al Ing. Gerardo, Rubén y Don Julián por atender todas nuestras solicitudes y por la disponibilidad.

Y a todas las personas que por motivos de extensión sería difícil de citar, muchas gracias.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
OBJETIVOS.....	xv
Objetivo General.....	xv
Objetivos Particulares.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Cáncer.....	3
Epidemiología del Cáncer.....	3
Desarrollo del Cáncer.....	4
Terapias Contra el Cáncer.....	8
Generación de Fármacos Asistidos por Computadora (DiFAC).....	10
Relación Estructura-Actividad Cuantitativa (QSAR).....	12
Modelado Molecular.....	15
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	20
Generalidades.....	20
Composición Estructural de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	21
Mecanismo Catalítico de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	26
Regulación de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	27
Glucósidos Cardiotónicos.....	30
Composición Química de los Glucósidos Cardiotónicos.....	30
Biosíntesis de los Compuestos Cardenólidos.....	33
Cardenólidos y su Potencial Cytotóxico.....	35

Cardenólidos y su Relación con la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Análisis de la Relación-Estructura Actividad Cualitativa y Cuantitativa (SAR/QSAR).....	42
Formación de la Base de Datos.....	42
Descriptores Moleculares	42
Análisis SAR/QSAR.....	43
Validación de Modelos QSAR.....	43
Modelado Molecular.....	44
Preparación de los Ligandos.....	44
Preparación del Receptor.....	44
<i>Docking</i> Molecular.....	45
Ensayos de Inhibición Enzimática de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	46
Análisis de Parámetros Cinéticos de la Actividad Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	47
Diseño de Farmacóforo.....	48
Análisis Estadístico.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
Análisis de Relación Estructura-Actividad Cualitativa (SAR).....	50
Análisis de Relación Estructura-Actividad Cuantitativa (QSAR).....	62
Modelado Molecular.....	76
Validación del <i>Docking</i> Molecular.....	76
Modelos Moleculares de los Cardenólidos Aislados de <i>A. subulata</i> con la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	78
Modelo Molecular de la Calotropina y 12,16-Dihidroxicalotropina.....	78
Modelos Moleculares de Corotoxigenina 3-O-Glucopiranosido y Desglucouzarina.....	82
Efecto Inhibitorio de los Cardenólidos Sobre la Actividad Enzimática de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	90
Obtención de los Parámetros Cinéticos y Naturaleza del Tipo de Inhibición	

de los Cardenólidos Aislados de <i>A. subulata</i> sobre la Actividad Na ⁺ /K ⁺ -	
ATPasa.....	94
Determinación de los Parámetros Cinéticos de la Actividad Na ⁺ /K ⁺ -	
ATPasa.....	94
Determinación de los Parámetros Cinéticos de la Actividad Na ⁺ /K ⁺ -	
ATPasa en Presencia de Inhibidores.....	96
Diseño de Farmacóforo.....	102
CONCLUSIONES.....	110
RECOMENDACIONES.....	111
REFERENCIAS.....	112
ANEXOS.....	126

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Efecto citotóxico de los cardenólidos 12,16- dihidroxicalotropina, calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido (C3OG) y desglucouzarina aislados de <i>Asclepias subulata</i> en contra de líneas celulares cancerosas humanas, murinas y células no cancerosas humanas.....	37
II Sustituciones de las moléculas <i>tipo digital</i> y el efecto antiproliferativo expresado en valores de IC ₅₀ en la línea celular A549.....	52
III Sustituciones de los cardenólidos <i>tipo doble enlace</i> y el efecto antiproliferativo expresado como IC ₅₀ en la línea celular A549.....	54
IV Modelos QSAR propuestos para los cardenólidos <i>tipo doble enlace</i>	65
V Valores de -Log (IC ₅₀) _{A549} experimentales y predictivos obtenidos con el modelo F de QSAR.....	69
VI Valores de -Log (IC ₅₀) _{A549} experimentales y predictivos obtenidos con el modelo H de QSAR.....	70
VII Resumen de los ligandos, energía de unión, valores de RMSD, número de puentes de hidrógeno y contacto con aminoácidos del receptor usados en el <i>docking</i> molecular.....	87
VIII Análisis cinético de la actividad Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa de corteza cerebral porcina en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los cardenólidos ouabaína, calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Desarrollo del cáncer.....	6
2	Composición estructural de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	23
3	Estructura química de los glucósidos cardiotónicos.....	32
4	Biosíntesis de los compuestos cardenólidos.....	34
5	Vías de señalización involucradas en el complejo del señalosoma de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	41
6	Estructura andamio de los compuestos cardenólidos y los sitios de sustitución estudiados para el análisis SAR.....	51
7	Principales sustituciones del grupo carbohidrato de los cardenólidos <i>tipo digital</i>	56
8	Efecto sobre la actividad antiproliferativa en la línea celular A549 por las sustituciones en la posición C3 de los cardenólidos sintéticos digitoxigenina 3-(fosfato-O-dimetil) y digitoxigenina 3β[2-1(amantadina)-1-on-etilamina] en comparación a la digitoxigenina....	57
9	Principales sustituciones observadas en los cardenólidos <i>tipo doble enlace</i> y su efecto sobre la actividad antiproliferativa en la línea celular A549.....	59
10	Efectos de las sustituciones en el anillo esteroidal de los cardenólidos sobre la actividad antiproliferativa de la línea celular A549.....	61
11	Resumen del análisis de relación estructura-actividad (SAR) de los cardenólidos y la actividad antiproliferativa en la línea celular A549...	63
12	Moléculas utilizadas para la validación externa de los modelos QSAR.	66
13	Resultados de la regresión lineal de la validación externa de los modelos QSAR de los cardenólidos <i>tipo doble enlace</i>	68
14	<i>Docking</i> molecular del ligando de referencia ouabaína usado en el modelo molecular con el receptor Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (PDB 4HYT).....	77

15	<i>Docking</i> molecular de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa y el ligando calotropina.....	80
16	<i>Docking</i> molecular de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa y el ligando 12,16-dihidroxicatropina.....	81
17	<i>Docking</i> molecular de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa y el ligando corotoxigenina 3-O-glucopiranosido.....	83
18	<i>Docking</i> molecular de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa y el ligando desglucouzarina	85
19	Efecto inhibitorio de los cardenólidos sobre la actividad enzimática de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	92
20	Efecto de la concentración de sustrato (ATP) a través del tiempo sobre la actividad enzimática de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	95
21	Determinación de la velocidad inicial (V _o) de la enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	97
22	Inhibición de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa de corteza cerebral porcina en ausencia o presencia de los cardenólidos aislados de <i>A. subulata</i> y ouabaína a diferentes concentraciones de sustrato.....	98
23	Principales interacciones entre los compuestos cardenólidos en el sitio de unión de la enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	104
24	Posibles estructuras farmacofóricas de los cardenólidos para su interacción con el sitio de unión de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosina 5'-Trifosfato
CHARMM27	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetraacético
HCl	Ácido Clorhídrico
IC₅₀	Concentración Inhibitoria del 50 %
KCl	Cloruro de potasio
K_i	Constante de Inhibición
K_m	Constante de Michaelis-Menten
μM	Micromolar
μL	Microlitros
mM	Milimolar
M	Molar
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MMFF94	Campo de Fuerza Molecular de Merck
MTT	Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl) – 2,5difeniltetrazolio
Nm	Nanómetros
Na⁺/K⁺-ATPasa	Adenosina 5'-Trifosfatasa
NaCl	Cloruro de sodio
Pi	Ortofosfato
OH	Hidroxilo
QSAR	Relación Estructura-Actividad Cuantitativa
RLM	Regresión Lineal Múltiple
RMSD	Raíz de la Desviación Cuadrática Media
RMSE	Raíz del Error Cuadrático Medio

RSS	Suma de Cuadrados Residuales
SAR	Relación Estructura-Actividad Cualitativa
TCA	Ácido Tricloroacético
U/mL	Unidades por Mililitros
V_{max}	Velocidad Máxima
w/v	Peso sobre Volumen

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer un modelo de interacción de glucósidos cardenólidos aislados de *Asclepias subulata* y determinar su efecto sobre la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa de manera *in vitro*.

Objetivos Particulares

- a) Analizar la relación estructura-actividad de los compuestos aislados de *Asclepias subulata*.
- b) Establecer un modelo molecular de la interacción de los glucósidos cardenólidos y la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa por técnicas computacionales.
- c) Evaluar el efecto de los glucósidos cardenólidos aislados de *Asclepias subulata* sobre la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa *in vitro*.
- d) Establecer un modelo farmacofórico de los cardenólidos con actividad Na⁺/K⁺-ATPasa por medio de un análisis exploratorio.

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial, lo cual ha incrementado la búsqueda de nuevas alternativas y tratamientos combatir esta afección. El desarrollo de fármacos derivados de plantas medicinales apoyados por estudios computacionales como la relación estructura-actividad y el modelado molecular han hecho más eficiente el tamizaje de compuestos con potencial terapéutico en las últimas décadas. Uno de los blancos terapéuticos con mayor potencial en contra del cáncer es la Na^+/K^+ -ATPasa, la cual es considerada el principal blanco farmacológico de los compuestos cardenólidos. Estudios previos con los cardenólidos calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido, desglucouzarina y 12, 16- dihidroxicalotropina aislados de la planta *Asclepias subulata* mostraron que estos compuestos poseen potentes efectos citotóxicos y selectivos en contra de líneas celulares cancerosas de origen humano tales como A549, PC-3 y LS-180, además de causar la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, activación de caspasas y llevando a las células a muerte por apoptosis, no obstante se desconoce si estos compuestos pueden inhibir la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa y por medio de esta causar su efecto citotóxico en las líneas celulares. El objetivo de este trabajo fue establecer modelos de interacción de los cardenólidos aislados de *Asclepias subulata* con la proteína Na^+/K^+ -ATPasa y determinar su efecto *in vitro* sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa. Para cumplir con este objetivo se realizaron estudios de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR), los cuales fueron obtenidos mediante análisis de regresión lineal múltiple. Los modelados moleculares se llevaron a cabo por medio de técnicas de acoplamiento molecular o “*docking*” con los cardenólidos de *A. subulata* como ligandos y la proteína Na^+/K^+ -ATPasa como receptor para posteriormente evaluar la capacidad de los cardenólidos de inhibir la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa y finalmente realizar una propuesta de las posibles estructuras farmacofóricas de los compuestos. Los modelos de QSAR obtenidos para los cardenólidos *tipo doble enlace* mostraron que las propiedades fisicoquímicas relacionadas con la hidrofobicidad y los grupos funcionales que actúan

como aceptores de puentes de hidrógeno están involucradas en la actividad antiproliferativa de los cardenólidos sobre la línea celular A549. Los datos obtenidos del modelado molecular indicaron que los cardenólidos calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y desglucouzarina pueden formar un complejo ligando-receptor con la proteína Na^+/K^+ -ATPasa por medio de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con aminoácidos considerados esenciales para que los cardenólidos puedan unirse a la Na^+/K^+ -ATPasa. Los ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa confirmaron lo obtenido en los modelados moleculares, donde los compuestos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido inhibieron la actividad Na^+/K^+ -ATPasa con valores de IC_{50} de 0.27 ± 0.06 y 0.87 ± 0.20 μM , respectivamente. Por otro lado, el tipo de inhibición que mostraron estos compuestos sobre la actividad Na^+/K^+ -ATPasa fue por medio de un mecanismo de inhibición acompetitiva con una constante de inhibición (K_i) de 0.2 ± 0.03 μM para calotropina y 0.52 ± 0.05 μM para corotoxigenina 3-O-glucopiranosido. El diseño del farmacóforo mostró que las estructuras farmacofóricas de los cardenólidos utilizados en el análisis exploratorio son los anillos A y B del núcleo esteroidal, así como los enlaces entre los C11-C12 y C16-C7 que favorecen interacciones hidrofóbicas con aminoácidos no polares y aromáticos del sitio de unión, así como los grupos hidroxilo del C14 y el grupo carbonilo del C19 con función de aceptores para favorecer la formación de puentes de hidrógeno en el sitio de unión de la Na^+/K^+ -ATPasa. En conclusión, los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido aislados de *A. subulata* poseen características fisicoquímicas y estructurales importantes para poder interactuar con la proteína Na^+/K^+ -ATPasa en modelos computacionales lo cual se reflejó en su capacidad de inhibir la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa de manera acompetitiva evidenciando que la citotoxicidad de estos compuestos así como los efectos apoptóticos causados en las líneas celulares cancerosas humanas pueden estar asociados a su interacción con la Na^+/K^+ -ATPasa.

ABSTRACT

Cancer is one of the most mortality diseases around the world, a fact that has increased the search for new alternatives and treatments to fight against this affection. The drug development from medicinal plants supports by computational analysis as structure-activity relationship and molecular modeling have made more efficient the screening of molecules with therapeutic potential in the last decades. At present, Na^+/K^+ -ATPase is considered a highlight therapeutic target against cancer, this protein is contemplated as the main pharmacological target of cardenolides. Previous studies with the cardenolides calotropin, corotoxigenin 3-O-glucopyranoside, desglucouzarín, and 12,16-dihydroxycalotropin isolated from *Asclepias subulata* shown that these compounds have strong cytotoxic and selective effects on human cancer cell lines as A549, PC-3, and LS-180. Also, these molecules caused loss of mitochondrial membrane potential, caspases activation, and apoptosis death cell, however, is unknown that these cardenolides can inhibit the enzymatic activity of Na^+/K^+ -ATPase and due to this fact cause their cytotoxic effect on cancer cell lines. The aim of this work was to establish interaction models of cardenolides isolated from *A. subulata* on the Na^+/K^+ -ATPase and evaluate their *in vitro* effect on the enzymatic activity of Na^+/K^+ -ATPase. To achieve the aim were made structure-activity relationship quantitative (QSAR) analysis by multiple linear regression analysis. Molecular modeling was carried out by molecular docking with the cardenolides from *A. subulata* as ligands and Na^+/K^+ -ATPase protein as a receptor to then evaluate the capacity of cardenolides to inhibit the enzymatic activity of Na^+/K^+ -ATPase and finally realize a theoretic pharmacophoric model of cardenolides. The QSAR models to *double-linked type* cardenolides showed that hydrophobic properties and functional groups that act as hydrogen bond acceptors are involved in the antiproliferative activity of cardenolides on the A549 cancer cell line. Molecular modeling of calotropin, corotoxigenin 3-O-glucopyranoside, and desglucouzarín indicated that these compounds can be a ligand-receptor complex with the Na^+/K^+ -ATPase by hydrogen bonds and hydrophobic interactions with amino acids considered essentials to the binding of

cardenolides with the protein. The inhibition assays on the enzymatic activity of Na⁺/K⁺-ATPase confirmed the data obtained on the molecular modeling, where calotropin and corotoxigenin 3-O-glucopyranoside inhibited the Na⁺/K⁺-ATPase activity with IC₅₀ values of 0.27 ± 0.06 and 0.87 ± 0.20 μM, respectively. Also, both molecules presented an uncompetitive inhibition mechanism on Na⁺/K⁺-ATPase activity with an inhibition constant (K_i) of 0.20 ± 0.03 μM to calotropin and 0.52 ± 0.05 μM to corotoxigenin 3-O-glucopyranoside. The pharmacophore design showed the main pharmacophoric structures of cardenolides used on the exploratory analysis are the steroidal rings A and B, the C11-C12 and C16-C17 bonds that promote the hydrophobic interactions with non-polar and aromatic amino acids on the binding site. Also, the presence of hydroxyl groups on C14 and the carbonyl and hydroxyl groups on C19 as hydrogen bond acceptors promotes the hydrogen bonds on the binding site of Na⁺/K⁺-ATPase. In conclusion, cardenolides calotropin and corotoxigenin 3-O-glucopyranoside from *A. subulata* have physicochemical and structural features considered crucial to interact with the Na⁺/K⁺-ATPase on molecular modeling, which was reflected in their capacity to inhibit the enzymatic activity of Na⁺/K⁺-ATPase of uncompetitive manner, a fact that supports that cytotoxicity of these molecules and their apoptotic effects on human cancer cell lines can be associated to their interaction with the Na⁺/K⁺-ATPase.

INTRODUCCIÓN

La Na⁺/K⁺-ATPasa es una proteína transmembrana ubicua en todas las células de los mamíferos y su función es importante para mantener la homeostasis iónica en las células. Esta enzima es una glicoproteína compuesta por 2 subunidades principales denominadas α y β , cada una con múltiples isoformas (Cui y Xie, 2017).

Es bien conocido que esta enzima es sensible al efecto de los glucósidos cardiotónicos, los cuales son compuestos de origen vegetal o animal que están compuestos por un núcleo esteroidal, un residuo de carbohidrato y un anillo lactona, característica que los divide en 2 grupos, cardenólidos son poseen un anillo butiril-lactona y bufadienólidos si tienen un anillo α -pirona (El-Seedi et al., 2019).

En años recientes los compuestos cardenólidos han recibido mucha atención debido a las propiedades biológicas atribuidas a estos compuestos, pero en especial a su capacidad cardiotónica y a su latente potencial como posible agente anticancerígeno debido a su capacidad de inhibir a la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa. (Prassas y Diamandis, 2008) Diversos estudios con cardenólidos como ouabaína relacionados a su actividad citotóxica y con su capacidad de inhibir la Na⁺/K⁺-ATPasa han demostrado que este compuesto elimina a las líneas celulares cancerosas humanas a través de un diverso sistema de vías de señalización desencadenado por la inhibición de la enzima, por lo que estos compuestos son considerados potenciales agentes terapéuticos en contra del cáncer (Xue et al., 2014).

Recientemente en nuestro grupo de investigación se aislaron y caracterizaron los cardenólidos calotropina, desglucouzarina, 12,16-dihidroxicatropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido de la planta sonorensis *Asclepias subulata*, los cuales fueron evaluados frente a un panel de líneas celulares cancerosas humanas (A549, PC-3 y LS-180), murinas (RAW 264.7) y ante líneas celulares no cancerosas humanas (ARPE-19) donde los 4 cardenólidos demostraron tener potentes efectos citotóxicos en las líneas celulares cancerosas humanas pero no en las otras líneas celulares evaluadas por lo que también demostraron ser selectivos ante las células cancerosas humanas (Rascón-

Valenzuela et al., 2015). Además, dichos cardenólidos causaron la muerte celular en la línea celular A549 por medio de apoptosis, mostrando un potente efecto sobre la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, así como la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Rascón-Valenzuela et al., 2016).

En este contexto es claro el potencial que muestran los cardenólidos aislados de *Asclepias subulata* con respecto al efecto citotóxico y selectivo en contra de líneas celulares cancerosas humanas, sin embargo, actualmente existe un desconocimiento acerca del blanco terapéutico para los cardenólidos aislados de esta planta por lo que se desconoce si estos compuestos pueden inhibir a la enzima Na^+/K^+ -ATPasa al igual que compuestos como la ouabaína, por lo que la realización de este proyecto estuvo enfocada en generar modelos moleculares entre los cardenólidos y la proteína Na^+/K^+ -ATPasa por métodos computacionales y evaluar la capacidad de los compuestos de inhibir la actividad enzimática sobre la Na^+/K^+ -ATPasa así como el tipo de inhibición de estos sobre la enzima.

ANTECEDENTES

Cáncer

Epidemiología del Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades que lideran las principales causas de muerte y una importante barrera para incrementar la expectativa de vida a nivel mundial. De acuerdo a estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer se situó dentro de las primeras causas de muerte en personas menores de 70 años en 112 de 183 países en el mundo. Esto debido a su rápido incremento en la incidencia y mortalidad a nivel global, reflejando así el aumento en la edad y el crecimiento de la población, asimismo los cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer (Sung et al., 2021).

De acuerdo a datos reportados por la Global Cancer Observatory (GCO) se estima que en el año 2020 se reportaron 19.3 millones de casos nuevos y aproximadamente 10 millones de decesos por esta enfermedad a nivel mundial. De acuerdo a este informe, la región con mayor incidencia de cáncer fue Asia con casi un 50% de los casos y un 60% de las muertes reportadas para ambos sexos en 2020. Por otro lado, los tipos de cáncer más diagnosticados son el cáncer de mama con un 11.7% del total de casos, seguido por el cáncer de pulmón (11.4%), colorrectal (10.0%), próstata (7.3%) y estómago (5.3%). Sin embargo, el tipo de cáncer con mayor índice de mortalidad fue el de pulmón con 18.0% del total de las muertes en 2020, seguido del colorrectal (9.4%), hígado (8.3%), estómago (7.7%) y mama (6.9%) (Sung et al., 2021).

En Latinoamérica se estima que cada año se reportan cerca de 1 millón de casos nuevos y 550,000 muertes a causa del cáncer. Se proyecta que para el año 2030 habrá un incremento de nuevos casos y decesos del 67% en esta región (Piñeros et al., 2017). En México el cáncer es considerado la tercera causa de muerte a nivel nacional con un 12.9% de todos los casos solo por debajo de enfermedades como la diabetes mellitus y complicaciones isquémicas. De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Geografía y

Estadística (INEGI) en el año de 2015 fallecieron 85,201 personas a causa del cáncer, de los cuales un 48.9% ocurrió en hombres y un 51.1% en mujeres. Los tipos de cáncer con mayor mortalidad en el país para el año 2015 fueron el cáncer de pulmón, próstata, hígado, mama y gástrico. Para el sexo masculino los tipos de cáncer con mayor mortalidad fueron el de pulmón, próstata y gástrico. Para el sexo femenino fueron el cáncer de mama, cervicouterino y el gástrico (Mohar-Betancourt et al., 2017; Aldaco-Sarvide et al., 2018).

Entre las entidades de México que presentan mayores índices de mortalidad por cáncer se encuentran principalmente los estados del norte del país, entre los que destaca Sonora, la cual presenta tasas por encima de 75 por cada 100,000 habitantes, siendo uno de los sitios con mayor número de decesos a causa de neoplasias junto con la Ciudad de México y Veracruz. Entre los tipos de cáncer con mayor mortalidad en el estado de Sonora podemos destacar el cáncer de pulmón, mama, colorrectal y páncreas, siendo el cáncer de pulmón el más común en el sexo masculino y el cáncer de mama en el sexo femenino (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2017; Aldaco-Sarvide et al., 2018).

Desarrollo del Cáncer

Dentro de nuestro organismo cada célula está programada para que cuando esta envejezca o ya no sea necesaria muera de una manera ordenada. Las células están en comunicación constante lo cual permite una reparación y reemplazo de tejidos fluido y otros aspectos del comportamiento celular. Con la ayuda de una comunicación adecuada, las células proliferan apropiadamente cuando se requieren nuevas células y frenan la división celular cuando se produce una cantidad suficiente de nuevas células. Las células cancerosas son descendientes de una célula normal en la cual ha ocurrido alguna anomalía (Boik, 2001).

El cáncer generalmente es considerado como una división celular incontrolada que resulta en la agregación de células para formar tumores. Hay muchos factores que están involucrados en las patogénesis del cáncer, tales como el estilo de vida o comportamientos considerados riesgosos de los individuos, la exposición a ciertos carcinógenos y la

predisposición a ciertas mutaciones genéticas para desarrollar cáncer. Las principales propiedades que caracterizan a las células cancerosas son el aumento de la proliferación celular, baja tasa de apoptosis, alteración celular y diferenciación de tejido, poseen un metabolismo alterado, inestabilidad genómica, así como la capacidad de invadir a otros tejidos. En sí, el cáncer es el resultado de un proceso de carcinogénesis que consiste en diferentes etapas en las cuales distintas alteraciones moleculares y celulares están involucradas. Como se muestra en la Figura 1, estas etapas son denominadas iniciación, promoción y progresión (Schulz, 2007; Pan et al., 2011).

La iniciación es el resultado de un proceso rápido e irreparable para la célula, el cual involucra la exposición de células normales a algún agente carcinógeno químico, físico o biológico, lo que resulta en cambios pequeños e imperceptibles en la morfología celular; sin embargo, este efecto genotóxico proporciona a estas células iniciadas una alteración a su microambiente y una ventaja proliferativa en relación a las células normales. Cabe señalar que este paso requiere que una mutación ocurra sobre un gen causante de cáncer en una célula con la capacidad para dividirse. Dentro de estos genes causantes de cáncer están incluidos todos los genes involucrados en la estimulación de la división celular, denominados oncogenes. Otra clase de estos genes causantes de cáncer incluyen a todos los genes relacionados en el monitoreo y reparación de mutaciones de ADN y la iniciación de la muerte programada en células con mutaciones irreparables llamados genes supresores de tumor (Loeb y Harris. 2008; Pan et al., 2011; Compton, 2020).

Las mutaciones tempranas ocurridas por la exposición a algún factor o agente cancerígeno ya sea químico, físico o infeccioso juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer. Los diferentes factores pueden actuar por diferentes mecanismos y a diferentes etapas del desarrollo del tumor, por lo que el proceso de carcinogénesis es considerado un proceso multifactorial y complejo. Tal es el caso del humo del tabaco, el cual es considerado un carcinógeno humano estrechamente relacionado con la aparición de cáncer de pulmón, el cual contiene una variedad de diferentes agentes cancerígenos, algunos de los cuales pueden actuar como iniciadores, promotores o ambos (Schulz, 2007).

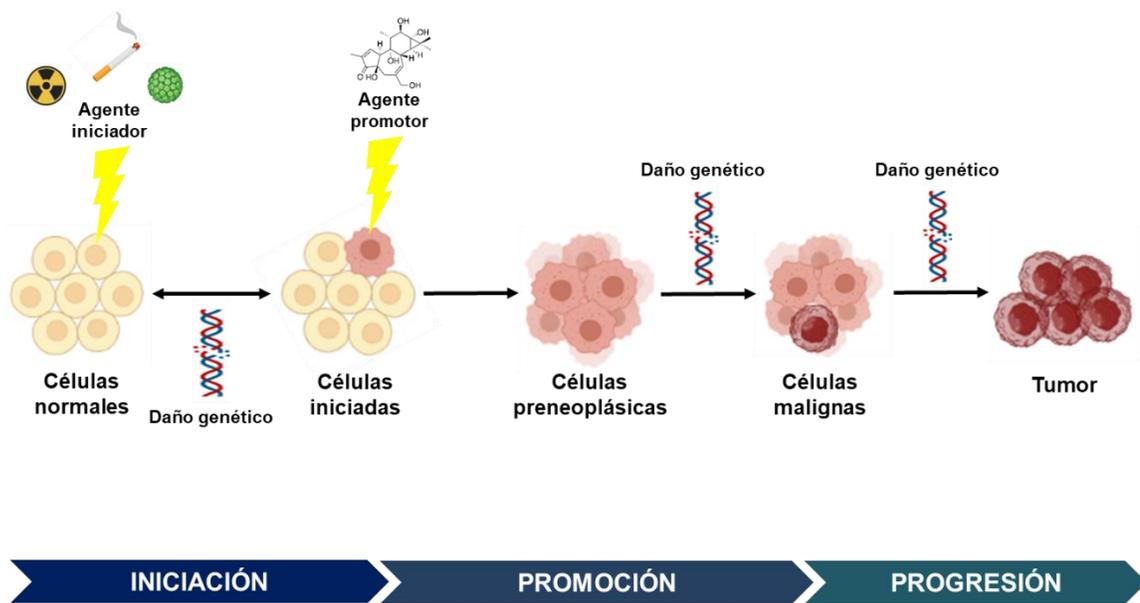


Figura 1. Desarrollo del cáncer. El proceso de carcinogénesis se define por una serie de daños genéticos causados por diversos agentes en contra de las células. Este proceso se clasifica en 3 etapas principales que incluyen la iniciación desencadenada por agentes mutagénicos, la promoción que es estimulada por agentes que promueven la transformación a células malignas y la progresión en donde estas células se transforman en el tumor. [Imagen realizada por Meneses-Sagrero, S.E.]

En contraste con la fase de iniciación, el proceso de promoción tumoral resulta en una mayor tasa de proliferación de las células iniciadas en comparación a las células normales, este proceso no es rápido y mejora la probabilidad de daños genéticos adicionales. En esta fase las células iniciadas sufren divisiones celulares adicionales, heredando sus mutaciones a su progenie y produciendo una clona de células mutadas. Sin embargo, este proceso de expansión clonal depende mucho del tipo de gen en el que se haya causado la mutación. En general, las células que presentan una mutación inicial en un proto-oncogen adquieren una ventaja en la proliferación en comparación a una célula normal. No obstante, se requiere que la mutación ocurra sobre un gen específico para conferir la ventaja en la proliferación celular (Loeb y Harris, 2008; Vincent y Gatenby, 2008; Pan et al., 2011; Compton, 2020).

En esta fase se requiere de agentes promotores como estímulos que no interactúan directamente con el ADN y desencadenan efectos biológicos sin estar metabólicamente activados. Estos agentes aumentan el crecimiento celular en tejidos con susceptibilidad, lo que contribuye a la consolidación de mutaciones, mejorando las alteraciones en la expresión genética causando disturbios en el control de crecimiento celular. La efectividad de los agentes promotores puede llevar semanas o años dependiendo de su concentración en el tejido blanco. La fase de promoción es considerada una fase reversible siempre que la exposición a este agente desaparezca, causando una regresión en la proliferación celular, probablemente por apoptosis. Al igual que en la etapa anterior, no todas las células expuestas a algún agente promotor forman parte de la fase de promoción. Solo las células que son estimuladas para la división, diferenciación y que resistan la apoptosis pueden contribuir a la inestabilidad entre la proliferación y la muerte celular, liderando la conversión a células neoplásicas malignas (Oliviera et al., 2007).

En la etapa de progresión las neoplasias o tumores benignos se transforman en lesiones malignas por medio de la adquisición de mecanismos genéticos y epigenéticos, siendo un proceso lento que dura algunos años. Durante esta fase, la proliferación celular es independiente a la presencia de algún estímulo, se caracteriza por ser irreversible, la presencia de inestabilidad genética, crecimiento acelerado, la capacidad de invadir otros

tejidos o células y la capacidad de causar metástasis, además de generar cambios metabólicos, bioquímicos y morfológicos en las células (Barret, 1993; Oliviera et al., 2007; Compton, 2020).

Uno de los factores que más contribuyen en la fase de progresión es el microambiente del tumor, el cual impone una serie de condiciones de presión sobre las células cancerosas, incluyendo la falta de nutrientes y oxígeno, la acidificación del espacio extracelular, la aberración de la matriz extracelular y de las interacciones célula-célula. La fase de progresión requiere que las células cancerosas toleren estas condiciones y desarrollen mecanismos para continuar proliferando. La expresión de transportadores de nutrientes impulsada por oncogenes, la habilidad de obtener energía de diversas fuentes de nutrientes y la cooperatividad entre células cancerosas o entre estas y las células estromales contribuyen probablemente a la capacidad de adaptación de las células tumorales al estrés del microambiente del tumor. Por otro lado, la metástasis también impone requerimientos metabólicos distintos, este proceso se caracteriza por el escape potencial de células tumorales del tumor primario, entrando en el flujo sanguíneo u órganos linfoides involucrando la degradación de la matriz extracelular, migrando lejos de su entorno primario y evitando al sistema inmune. Además de requerir que las células posean ciertas capacidades para sobrellevar los retos biológicos como escapar del tumor primario, sobrevivir en la circulación, colonizar distintos órganos y hacer crecer tumores en esos sitios remotos (Faubert et al., 2020).

Terapias en Contra del Cáncer

En décadas anteriores se creía que el cáncer era una enfermedad imposible de tratar y por lo tanto incurable. Posterior a esta creencia se comenzó a explorar la posibilidad de una terapia efectiva en contra del cáncer. En la actualidad cerca del 60% de las investigaciones médicas en curso están relacionadas con la búsqueda de fármacos y tratamientos para enfrentar a esta enfermedad. En el presente existen diferentes métodos de tratamiento en contra del cáncer. La selección del tratamiento y el éxito de este dependen del tipo de cáncer que se desea tratar, la localización del tumor y la etapa de progresión de este. Entre

los métodos clásicos más utilizados están la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Actualmente, también se están desarrollando métodos modernos como la terapia basada en hormonas, terapia de células madres y la inmunoterapia, sin embargo, la mayoría de los pacientes siguen siendo tratados con los métodos clásicos, dado que los métodos modernos aún están en desarrollo y son específicos para ciertos tipos de cáncer (Abbas y Rehman, 2018; Compton, 2020).

Generalmente, en etapas tempranas de la enfermedad los pacientes de considerados de bajo riesgo son tratados con cirugías, siendo este uno de los métodos preferidos para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el uso de las cirugías depende del tipo de cáncer a tratar y la etapa de desarrollo en la que se encuentre el mismo, además se tienen que tomar en cuenta los factores anatómicos de la localización del tumor, además de la condición del paciente y en ocasiones la cirugía por sí sola no es suficiente para la erradicación del tumor, por lo que se requiere utilizar algún otro método para el tratamiento (Fernando y Jones, 2015; Compton, 2020).

Cuando la cirugía no es un método viable para tratar el cáncer se opta por métodos como la radioterapia, la cual utiliza la radiación ionizante para la eliminación de las células tumorales por medio del efecto directo en las macromoléculas celulares o por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), eliminándolas directamente o alterando su perfil genético para la activación de vías de muerte celular como la apoptosis. No obstante, la radioterapia tiene efectos adversos sobre las células normales que se encuentran en la periferia del tumor principal causando efectos secundarios a corto y largo plazo (Schulz, 2007; Abbas y Renham, 2008; Compton, 2020).

En el caso de tumores en fases muy avanzadas o que están localizados en sitios donde no se pueden eliminar por cirugía o radioterapia, se utiliza la quimioterapia, la cual utiliza el uso de fármacos para inducir la muerte celular por apoptosis en las células cancerosas, ya sea por la interferencia directa con el ADN o atacando proteínas claves necesarias para la división celular. Aunque las células tumorales son particularmente susceptibles a los agentes químicos utilizados en la quimioterapia las células normales que

son altamente proliferativas como las de la médula ósea o la piel son muy vulnerables a los efectos tóxicos de estos agentes. Por lo que es común que los pacientes tratados por este método muestren efectos secundarios tales como anemia y trombocitopenia debido a la supresión de la médula ósea, así como inmunosupresión, pérdida de cabello, náuseas y vomito (Fernando y Jones, 2015, Compton, 2020).

Debido a los diversos efectos adversos que causan a los pacientes los tratamientos actuales como la radioterapia y la quimioterapia se sigue trabajando en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas enfocadas en la mejora de los fármacos utilizados en la actualidad por medio de la disminución de los efectos tóxicos, y el aumento de selectividad hacia células tumorales mejorando la eficacia de los mismos a través de modificaciones estructurales con el fin de acrecentar la eficacia de estos, así como la exploración de nuevos blancos terapéuticos que mejoren la especificidad de los fármacos hacia las células cancerosas y contribuir a la disminución de los daños colaterales a las células normales.

Generación de Fármacos Asistidos por Computadora (DiFAC)

Actualmente existe una exhaustiva búsqueda por fármacos más seguros, adecuados, con mayor especificidad y efectividad para tratar enfermedades, lo cual es una labor que requiere la coordinación de un gran número de profesionales de múltiples disciplinas. Conociendo la base biológica de las afecciones o las fallas metabólicas de estas incrementa las posibilidades de diseñar medicamentos utilizando algún mecanismo cercano al proceso patológico, así como las bases moleculares y las moléculas implicadas en el mismo, se pueden diseñar fármacos que actúen con el blanco farmacológico, con el fin de modificar y cambiar la patología (Escalona et al., 2008).

El proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos novedosos es conocido por ser un proceso que consume mucho tiempo y es costoso. En promedio, el proceso estándar de descubrimiento y desarrollo de fármacos en el mercado toma de 10 a 15 años. Además, el promedio de costo por la investigación y desarrollo de cada fármaco efectivo es de

aproximadamente 1.8 billones de dólares. Actualmente, los investigadores trabajan arduamente con el objetivo de ofrecer a los pacientes mejores fármacos con mejor selectividad para mejorar la calidad de vida de estos (Prada-García et al., 2016).

El uso de computadoras en el campo de la investigación farmacéutica ha jugado un rol importante en el desarrollo y descubrimiento de fármacos desde 1980. Los métodos basados en el diseño de fármacos asistidos por computadora (DiFAC) han emergido como una herramienta efectiva para el descubrimiento de fármacos. El DiFAC es una disciplina especializada en el uso de métodos computacionales para simular interacciones de los fármacos con receptores para determinar si una molécula en especial podría unirse a su blanco, y así conocer la afinidad entre estas. Estos métodos aportan información relacionada con la interacción entre los fármacos y sus receptores tal como los tipos de interacciones que ocurren (hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno), además de conocer las energías de solvatación en el sitio activo entre los ligandos y receptores. Las ventajas de utilizar los métodos DiFAC en el desarrollo de fármacos incluyen el ahorro en costos, mejora el tiempo del fármaco en salir al mercado facilitando la selección de compuestos candidatos y mejora el conocimiento relacionado a las interacciones entre los fármacos y sus posibles blancos farmacológicos (Hassan-Baig et al., 2015).

Los métodos DiFAC se pueden clasificar en 2 tipos de técnicas los llamados fármacos diseñados en base al ligando (LBDD) y los fármacos diseñados con base a la estructura (SBDD). El desarrollo de fármacos por LBDD, también conocido como diseño de fármacos indirecto se apoya en el conocimiento ya existente de compuestos activos en contra de blancos terapéuticos de interés para predecir nuevas entidades químicas que presenten un comportamiento similar. Estos métodos se basan principalmente en la premisa de la similitud estructural, la cual consiste en tener compuestos con una alta similitud estructural confiando en la probabilidad de que tengan un perfil de actividad similar entre ellos. De estos métodos se derivan los estudios de relación estructura-actividad cuantitativa o QSAR y el diseño de farmacóforos (Hassan-Baig et al., 2015; Prada-García et al., 2016).

En contraste a los métodos LBDD, el diseño de fármacos basados en estructura (SBDD) trabaja directamente con estructuras de macromoléculas en 3D de interés o complejos ligando-proteína. Este enfoque utiliza la información de un blanco estructural para determinar si un compuesto nuevo tiene probabilidad de unirse con alta afinidad en una región específica o sitio activo donde la interacción modifique el comportamiento de la proteína seguido de algún efecto terapéutico. Los métodos SBDD utilizan los blancos terapéuticos como moldes, tomando las interacciones con moléculas pequeñas para formar una biblioteca química y realizar simulaciones computacionales para después seleccionar los compuestos que se ajustaron mejor al sitio activo. Dentro de los métodos computacionales que se utilizan en el SBDD destacan el modelado molecular y el diseño de farmacóforo basado en estructura (Prada-García et al., 2016).

Relación Estructura-Actividad Cuantitativa (QSAR)

La relación entre los grupos funcionales de una molécula y la reactividad química de las especies ha sido estudiada en el pasado. En 1868, Crum-Brown y Fraser sugirieron que la actividad fisiológica de las moléculas dependía de su constitución, es decir, que la actividad era dependiente de la estructura. Hammett en 1937 propuso una relación cuantitativa entre la reactividad de las sustancias químicas con sus características estructurales por medio de la constante de Hammett (σ). Posteriormente los trabajos de Hansch y Fujita en 1964 extendieron el concepto de la relación entre la energía lineal libre y la actividad biológica de las especies químicas. Por otro lado, los trabajos de Free y Wilson propusieron un enfoque que sugería que la actividad biológica de los compuestos cambia en presencia o ausencia de sustituciones particulares en sus estructuras, dando en conjunto lo que conocemos actualmente como relación estructura-actividad (Esposito et al., 2004; Polishchuck, 2017; Mahalakshmi y Jahnavi, 2020).

Por definición, los análisis de relación estructura-actividad cuantitativa o QSAR son técnicas que relacionan las propiedades fisicoquímicas de compuestos con alguna relación estructural con su efecto biológico, esto basado en el criterio de que moléculas con estructuras similares pueden poseer bioactividades similares. El método de QSAR

utiliza modelos matemáticos simples que permiten correlacionar de manera lineal las propiedades fisicoquímicas, biológicas o toxicológicas de un set de moléculas pequeñas que comparten el mismo objetivo, blanco o actividad biológica por medio de parámetros computacionales o experimentales codificados en descriptores moleculares con el fin de predecir o describir los cambios en dicho blanco o actividad biológica en función de las modificaciones estructurales de los compuestos (Roy et al., 2015; Ramsay et al., 2018; Muratov et al., 2020).

El objetivo principal de cualquier análisis de QSAR es el desarrollo del mejor modelo de fármaco que ayude a superar la dificultad del error de los ensayos y métodos biológicos. Esto permite la reducción de costos y tiempo en la síntesis de fármacos para mejorar la actividad biológica de una molécula en laboratorio. El uso de métodos QSAR también permite ahorrar tiempo y esfuerzo en los ensayos clínicos especialmente en ensayos de animales y fases preclínicas, facilita la comprensión y racionalización de mecanismos de acción de una serie de compuestos, apoyando así la idea de síntesis de compuestos con mayor potencia para atender enfermedades, así como el mejoramiento de la importancia de la química verde especialmente con enfoques de eliminación de desechos y generación de compuestos menos tóxicos (Lokendra et al., 2013).

Las principales ventajas de llevar a cabo análisis de QSAR son el bajo costo, ya que se pueden realizar en software libres y gratuitos, además que la información para trabajar los análisis es relativamente accesible, y no requieren de material instrumental o reactivos específicos, además la construcción de las moléculas y el cálculo de descriptores moleculares pueden ser sumamente rápidos, dependiendo de la capacidad del equipo computacional. Sin embargo, como cualquier tipo de análisis, trabajar con modelos QSAR tiene sus desventajas, entre estas se encuentra la familiarización con las metodologías computacionales, los diferentes problemas de cómputo tales como la compatibilidad de softwares, actualizaciones y el hecho de disponer de datos de actividad biológica de las moléculas que sean originarios de una misma fuente (Lozano-Aponte, 2012).

Generalmente la realización de modelos QSAR requiere una serie de pasos que podemos resumir en cuatro etapas principales. La primera etapa es la formación de una base de datos, en la cual se realiza la búsqueda de los datos de actividad biológica de los compuestos de interés para formar el set de moléculas a evaluar. Los datos de la actividad biológica pueden ser colectados en valores de K_d , K_i , afinidad de unión relativa o valores de IC_{50} o EC_{50} , dependiendo de los fines de la investigación. Estas moléculas regularmente comparten una estructura principal o andamio y llevan diferentes sustituciones de grupos funcionales en uno o más sitios. Para disminuir el grado de error del análisis es necesario que la base de datos pase por un proceso de limpieza o curado, en el cual se eliminan datos inconsistentes, incompletos, atípicos o que contengan algún error, como es el caso de moléculas que estén repetidas del set de compuestos (Esposito et al., 2004; Mahalakshmi et al., 2020).

La segunda etapa consiste en el cálculo de los descriptores moleculares del set de compuestos a utilizar en el análisis. Los descriptores moleculares son valores numéricos asociados con la constitución química que asocian la estructura de la molécula con varias propiedades, representando estas como un parámetro cuantitativo. El tipo de descriptores moleculares usados en los modelos QSAR pueden ser fisicoquímicos (hidrofóbicos, estérico o electrónico), estructurales, topológicos, electrónicos, geométricos y químico-cuánticos. Dada la gran cantidad de descriptores moleculares que se pueden calcular para un set de moléculas es necesario hacer un cribado de estos, con el fin de obtener las características que sean más relevantes. Para esto se debe de realizar un análisis de regresión lineal simple o una matriz de correlación entre la actividad biológica y los descriptores moleculares para observar si hay alguna relación entre estos y seleccionar los más adecuados (Esposito et. al, 2004).

En la tercera etapa se lleva a cabo la generación del modelo matemático entre los descriptores moleculares y la actividad biológica de interés. Para esto es necesario realizar un análisis multivariado que generalmente consiste en análisis de regresión lineal múltiple (RLM) el cual tiene como fin relacionar 2 o más variables explicativas con una variable de respuesta por medio del ajuste de una ecuación lineal. Además del RLM se puede

utilizar el método de mínimos cuadrados parciales o *partial least square* (PLS) también conocido como algoritmo clásico. Este método permite construir modelos predictivos cuando los factores son muchos utilizando el mínimo número de variables consideradas esenciales para generar el modelo y al mismo tiempo reunir información acerca de la molécula. Existen otros métodos que son utilizados para generar modelos de QSAR como la regresión polinomial y la red artificial neural, siendo los más comúnmente utilizados son la RLM y el PLS (Cui et. al., 2020; Mahalakshmi et al., 2020).

La última etapa del desarrollo de un modelo de QSAR consiste en la validación de los modelos matemáticos. La validación es un aspecto crucial de cualquier modelo QSAR, en este proceso se establece la confiabilidad y relevancia del procedimiento establecido, así como de los modelos generados. En QSAR se consideran diferentes maneras de validar un modelo, entre las más destacadas están la validación externa de los modelos, la validación cruzada, el denominado “*bootstrapping*” y la aleatorización de datos. Además de cumplir con un proceso de validación y parámetros estadísticos adecuados, los modelos de QSAR deben cumplir con los principios de aplicación de dominio, modelabilidad y de interpretación de mecanismo, los cuales fueron establecidos por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) en 2004 (Veerasingam et al., 2011).

Modelado Molecular

El reconocimiento entre 2 o más moléculas es esencial en la mayoría de los procesos biológicos de los seres vivos. La unión del ligando es la clave en las reacciones enzimáticas, por lo tanto, de su inhibición. En 1894, Fisher propuso el principio de la llave y la cerradura el cual se basó en el reconocimiento del sitio activo de una enzima y su sustrato, siendo este considerado el primer principio relacionado con la geometría complementaria. Sin embargo, debido a las limitaciones del principio establecido por Fisher, Koshland en 1958 propuso la teoría del ajuste inducido el cual fue respaldado por resultados de difracción de rayos X, estableciendo así las bases actuales para el reconocimiento molecular (Ruyck et al., 2016; Tao et al., 2019).

En el desarrollo de fármacos modernos el conocimiento de las interacciones proteína-ligando y proteína-proteína juegan un rol importante en la predicción de la orientación del ligando cuando se encuentra unido a una proteína receptora o enzima usando la forma y las interacciones electrostáticas. Gracias a métodos como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN) se han podido conocer las estructuras tridimensionales de diferentes macromoléculas y con base a estas desarrollar nuevos compuestos inhibidores apoyados por técnicas computacionales (Ruyck et al., 2016; Pagadala et al., 2017).

Dentro de los métodos DiFAC más populares basados en estructura se encuentra el *docking* molecular, el cual es un método bioinformático que se fundamenta en una simulación teórica que permite conocer la interacción entre moléculas (ligando y receptor) y predice su modo de unión y la afinidad por medio de una plataforma computacional. El *docking* molecular es una aproximación de la interacción a nivel atómico entre una molécula pequeña y una macromolécula generalmente una proteína, dicho proceso involucra un emparejamiento espacial y de energía entre el ligando y el receptor para obtener una conformación óptima (Tao et al., 2019).

El proceso de *docking* molecular involucra 2 enfoques principales, la simulación y la complementariedad de la forma. En la simulación el ligando es separado por la distancia física permitiendo que se una al blanco después de una serie finita de movimientos y tiempos en el espacio conformacional. Los movimientos implican variaciones en la estructura del ligando interna o externamente, las cuales se mueven siempre dentro del límite de liberación de energía conformacional. Este enfoque se considera ventajoso en el sentido de que es más compatible al aceptar la flexibilidad del ligando. El enfoque de complementariedad geométrica emplea los ligandos y receptores como características relacionadas con su interacción molecular. En este enfoque se garantiza que los receptores y ligandos puedan obtener la estructura más estable y que minimice la energía libre (Dar y Mir, 2017; Fan et al., 2019).

El proceso de *docking* se puede clasificar en tres etapas principales: la preparación de ligando y la macromolécula, la definición del tipo de *docking* y la estrategia de búsqueda para las conformaciones de ligando. Para la preparación de ligando el sistema debe ser seleccionado y preparado previo a los cálculos. El primer paso es la obtención de la estructura de la proteína, de preferencia unida a un ligando, la cual generalmente se obtiene en formato PDB. Para esto es recomendable considerar estructuras tridimensionales con alta resolución, en caso de no contar con una estructura que cumpla con las condiciones se puede recurrir a utilizar estructuras previamente utilizadas en otros estudios. El tratamiento mínimo que se le da a la macromolécula incluye la corrección de residuos, la asignación de carga eléctrica basada principalmente en los campos de fuerza o *force field* y optimización de la proteína, dicho tratamiento dependerá del software y la capacidad de cómputo que sean utilizados para llevar a cabo el proceso de acoplamiento molecular. Para la preparación de los ligandos usualmente se utiliza un procedimiento similar al de la macromolécula, las estructuras de los ligandos se pueden extraer de bases de datos públicas como PubChem o ZINC, en caso de no estar disponibles se pueden construir en algún programa por medio de su SMILE, dentro de las condiciones que se usan para la optimización de la estructura están la geometría, la asignación de carga eléctrica, la minimización de energía y la búsqueda de conformeros. Después de preparar el ligando y la proteína se debe de seleccionar y delimitar el sitio activo. Este paso puede realizarse manualmente o automatizado por medio de la especificación de las coordenadas o un mapeo del complejo formado por el ligando unido a la proteína, además algunos programas permiten el cálculo de cavidades o los probables sitios activos (Prieto-Martínez et al., 2018).

El *docking* molecular se puede clasificar de acuerdo al grado de simplicidad y flexibilidad del procedimiento, estos son *docking* rígido, semiflexible y flexible. En el *docking* rígido el ligando y el receptor son tratados como cuerpos rígidos por lo que la conformación del sistema no cambia, la búsqueda del espacio es muy limitado y con pocos grados rotacionales y traslacionales de libertad, es considerado un método simple y no requiere de cálculos complejos. En el *docking* semiflexible la conformación del receptor

permanece fija y sin cambios, pero la conformación del ligando es considerada como una estructura flexible. Es el tipo más común de *docking* y compensa la precisión con el tiempo de cómputo al considerar la flexibilidad del ligando. El último tipo de *docking* es el flexible en el cual ligando y receptor se mantienen flexibles, este enfoque es generalmente usado para el estudio de interacciones entre moléculas más precisas, este procedimiento se lleva a cabo por medio de dinámica molecular. Sin embargo, este tipo de *docking* requiere de una gran capacidad computacional, lo cual limita su uso para ciertas aplicaciones (Meng et al., 2011; Dar y Mir, 2017; Tao et al., 2019).

Por último, la selección de las estrategias de búsqueda para las conformaciones de los ligandos depende del algoritmo del *docking*, estas involucran la búsqueda de conformaciones y la selección de la solución más óptima por medio de una función de puntaje o *scoring*. Dicha búsqueda puede ser sistemática o aleatoria. La búsqueda sistemática implica un muestreo comprensivo de conformaciones y una combinación estructural de parámetros, sin embargo, este enfoque requiere usar más recursos y consume más tiempo para construir los conformeros y evaluarlos individualmente. La búsqueda estocástica es realizada por medio de 2 métodos principales, Monte Carlo (MC) o algoritmo genético (GA), cada uno desarrolla diferentes conformaciones basados en la rotación de los enlaces usados como grados de libertad para posteriormente ser sometidos a una función de puntaje por cada pose seleccionada y filtrada (Prieto-Martínez et al., 2018).

La búsqueda de conformaciones genera una gran cantidad de estructuras, de las cuales solo un porcentaje puede llegar a tener alguna relevancia biológica por lo que las funciones de puntaje son usadas para distinguir las poses consideradas correctas de las incorrectas de acuerdo al rango de propiedades incluidas en el algoritmo tales como las interacciones intermoleculares y los efectos de solvatación, electrostáticos y entrópicos, dichas funciones de puntaje se clasifican en basadas en *force field*, empíricas y basadas en conocimiento. La función de puntaje basada en *force field* usa la contribución de parámetros para construir una función “maestra” la cual incluye el estiramiento del enlace, interacciones electrostáticas, entre otras. Dicho enfoque requiere de largos tiempos

computacionales y los puntos de corte disminuyen la precisión, no obstante, los resultados de *docking* obtenidos por este método pueden ser refinados por otras técnicas para mejorar la precisión de las energías de unión (Meng et al., 2011; Prieto-Martínez et al., 2018).

La función de puntaje con enfoque empírico utiliza la reproducción de valores experimentales donde la energía de unión se descompone en algunos componentes energéticos tales como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, efectos hidrofóbicos y la entropía de unión. Cada componente es multiplicado por un coeficiente y luego se suma para obtener un puntaje final. Los coeficientes son obtenidos por análisis de regresión y ajustados a un set de prueba del complejo ligando-receptor. Finalmente, la función de puntaje basado en conocimiento es designada para reproducir estructuras y no energías. Las estructuras son construidas usando un potencial por pares derivado de un complejo ligando-receptor conocido por medio de un análisis estadístico con el fin de obtener las distancias entre el ligando y la proteína, considerando que tan favorable es la interacción y la probabilidad de que esta pueda ocurrir. El puntaje es calculado penalizando las interacciones de repulsión y favorece el contacto entre cada átomo del ligando y la proteína a un punto de corte específico (Meng et al., 2011; Prieto-Martínez et al., 2018).

El *docking* molecular ha demostrado ser un método factible para cualquier para cualquier reacción bioquímica, hay algunas áreas donde esta técnica ha revolucionado sus hallazgos, en particular la interacción de moléculas pequeñas y proteínas blanco pueden predecir la activación o inhibición de una enzima. Algunas de las mayores aplicaciones de la técnica de *docking* molecular son la identificación de compuestos hits y la optimización de compuestos líderes, así como la identificación de nuevos blancos farmacológicos, siendo altamente eficiente para el diseño, síntesis y descubrimiento de importantes drogas terapéuticas que pueden ser implementadas en la química medicinal, ingeniería de proteínas, quimioinformática, biorremediación y algunos otros campos biológicos y de la medicina (Meng et al., 2011; Tripathi y Misra, 2017; Fan et al., 2019).

Sin embargo, como cualquier metodología tiene ventajas y limitaciones. Entre las principales ventajas que tiene este método es que facilita la evaluación de la afinidad de unión entre los ligandos de una gran librería química con las proteínas de interés a un costo mínimo económico y de tiempo. Entre las principales limitaciones se encuentran el impacto que tienen las moléculas de agua en los sitios activos sobre la afinidad entre los complejos ligando-receptor. Un factor para tomar en cuenta y que constantemente se encuentra en debate es la precisión de los modelos obtenidos por acoplamiento molecular, el cual es considerado uno de los retos más importantes para mejorar la predicción de la energía de interacción entre 2 moléculas, ya que ocasionalmente las poses top de un ligando no necesariamente son las mejores poses. Por lo general se recomienda realizar un proceso de validación por medio de un acoplamiento con un ligando de referencia, esto permite probar si el algoritmo produce una pose correcta y si la función de puntaje la reconoce como la pose top. Además de este proceso de validación, se utilizan algunos parámetros estadísticos como la desviación del promedio de la raíz cuadrada (RMSD) con el cual es posible hacer una comparación directa entre los resultados de referencia y los predictivos (Meng et al., 2011; Tripathi y Misra, 2017; Prieto-Martínez et al., 2018).

Na⁺/K⁺-ATPasa

Generalidades

Durante la evolución de la vida, la mayoría de las células han mantenido una composición iónica similar de sus citoplasmas, incluyendo bajas concentraciones de calcio y sodio, así como altas concentraciones de potasio y un pH neutro. Cuando las concentraciones iónicas extracelulares son significativamente diferentes es necesario una actividad de bombeo iónico continuo para mantener las concentraciones intracelulares, las cuales son importantes para numerosos procesos enzimáticos en las células. Además, mucha energía es almacenada por gradientes iónicos a través de la membrana plasmática, donde los gradientes iónicos de sodio y potasio en células animales son usados para facilitar el transporte secundario de moléculas como azúcares, neurotransmisores, aminoácidos y otros metabolitos, así como otros iones (H⁺, Ca²⁺, Cl⁻). (Clausen et al., 2017).

La adenosina trifosfatasa o Na^+/K^+ -ATPasa (EC 7.2.2.13) conocida comúnmente como bomba de sodio potasio fue descubierta por primera vez por J.C. Skou en 1957 a partir de nervios periféricos de piernas de cangrejos. La Na^+/K^+ -ATPasa es una proteína transmembrana presente en todas las células eucariotas, perteneciente a la familia de proteínas ATPasas tipo-P, las cuales están involucradas en el transporte de ciertos iones, metales y lípidos a través de la membrana plasmática de bacterias, archae y eucariotas. Las proteínas ATPasas tipo-P son una larga familia de bombas moleculares que aprovechan una fosforilación intermedia en la enzima en un mecanismo de 2 pasos por medio de la hidrólisis de ATP y un ciclo a través de estados que están asociados con el transporte iónico (Skou, 1957; Durlacher et al, 2015).

La Na^+/K^+ -ATPasa es responsable del transporte activo de iones de sodio y potasio a través de las membranas plasmáticas siendo responsable de mantener la homeostasis iónica de las células. La Na^+/K^+ -ATPasa ha sido sujeto de numerosos estudios desde su descubrimiento como bomba de iones. Gracias al mantenimiento de los gradientes iónicos y electroquímicos esta proteína juega un rol importante en los procesos fisiológicos como la excitabilidad eléctrica, la regulación del volumen celular, el consumo de nutrientes dentro de las células y en la regulación de vías de señalización tales como las MAP-cinasas y PI_3K . Cabe señalar que la Na^+/K^+ -ATPasa en algunos tejidos cumple funciones esenciales como la reabsorción de iones en el riñón por medio de células epiteliales. Por otro lado, el gradiente electroquímico generado por el intercambio de Na^+ y K^+ contribuye a la estimulación eléctrica regulada por canales en las células nerviosas y musculares. El gradiente de sodio es una fuente energética que facilita el transporte de iones y metabolitos como acarreadores por lo que su mal funcionamiento puede implicar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, hipertensión o diabetes (Faller, 2008; Jung et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Composición Estructural de la Na^+/K^+ -ATPasa

Gracias a la estructura proteica en 3D de la Na^+/K^+ -ATPasa de riñón porcino ha sido posible conocer casi toda la estructura terciaria del complejo enzimático. Como se

mencionó anteriormente, la Na^+/K^+ -ATPasa es un heterodímero compuesto principalmente por 2 subunidades esenciales denominadas alfa (α) y beta (β) y una subunidad opcional denominada gamma (γ) la cual restringe su expresión a ciertos tejidos (Figura 2). Cada subunidad a su vez se puede manifestar en diferentes isoformas las cuales tienen la característica de expresarse de manera tejido-específica, dichas isoformas fueron sugeridas por primera vez por Marks y Seeds en 1987 (Rajasekaran et al., 2005; Poulsen et al., 2010; Cui y Xie, 2017).

La subunidad alfa es una proteína de membrana la cual es responsable de la actividad catalítica del complejo enzimático, tiene un peso molecular de aproximadamente 110 KDa, está compuesta por cerca de 1000 residuos de aminoácidos y consiste en 10 hélices alfa transmembrana (M1-M10) con 5 bucles extracelulares y 3 dominios citoplasmáticos denominados actuador (A), dominio de fosforilación (P) y dominio de unión a nucleótidos (N). La subunidad alfa está directamente involucrada en la translocación del sodio por medio de un pequeño bucle citoplasmático entre M4 y M5, los cuales operan la transición entre el estado E_1P y E_2P , así como los residuos de aminoácidos Glu³²⁷ en M4, Ser⁷⁷⁵ y Glu⁷⁷⁹ en M5 y Asp⁸⁰⁴ y Asp⁸⁰⁸ en M6 los cuales juegan un rol importante en la oclusión de cationes. Por otro lado, en esta subunidad se encuentran los sitios de unión para el ATP, cationes y glucósidos cardíacos (Geering, 1997; Wang y O'Doherty, 2012; Jung et al., 2018).

La subunidad α cuenta con 4 isoformas denominadas α 1-4, siendo cada una expresada en diferentes tejidos. La isoforma α 1 es codificada por el gen ATP1A1 en el exón 6 del cromosoma 1 en humanos y se expresa de manera ubicua en la mayoría de las células, predominando su expresión en tejidos como el riñón y los pulmones. La isoforma α 2 se codifica en el gen ATP1A2 en el exón 23 del cromosoma 1 y su expresión es principalmente en tejidos como el corazón y células del músculo esquelético y liso, así como en células gliales y astrocitos. En el caso de la isoforma α 3 esta es codificada por el gen ATP1A3 el cual se encuentra en el exón 24 del cromosoma 19 de los humanos y su expresión se encuentra principalmente en el cerebro y en corazón.

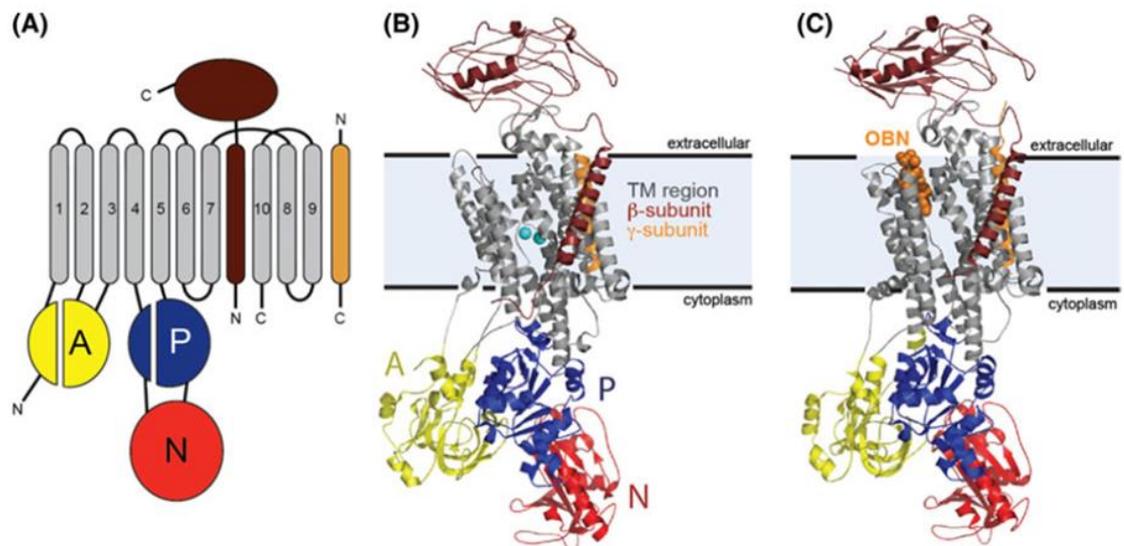


Figura 2. Composición estructural de la Na⁺/K⁺-ATPasa. A) Representación esquemática de la Na⁺/K⁺-ATPasa y sus subunidades. B) Representación esquemática de la proteína Na⁺/K⁺-ATPasa en estado E₁. C) Representación esquemática de la proteína Na⁺/K⁺-ATPasa en estado E₂P. La subunidad α está representada en color gris. La subunidad β está representada en color guinda. La subunidad γ está representada en color naranja. El dominio actuador (A) está representado de color amarillo. El dominio de unión de nucleótido (N) está representado de color rojo. El dominio de fosforilación (P) está representado de color azul. [Imagen tomada de Reinhard et al., 2013]

Por último, la isoforma $\alpha 4$ es codificada en el exón 23 del cromosoma 1 de los humanos por el gen ATP1A4 y esta isoforma se expresa generalmente en los testículos y en espermatozoides. Cabe señalar que el nivel de expresión, la distribución y su contribución funcional de cada isoforma depende de numerosos factores que incluyen la especie, el órgano, la edad y el sexo. En el caso de roedores la contribución funcional de la isoforma $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se puede distinguir farmacológicamente dado que la isoforma $\alpha 1$ es relativamente insensible a la acción de la ouabaína. Por otro lado, cada isoforma comparte un alto grado de identidad entre ellas, las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ comparten una homología del 87% y un 67% de similitud entre la isoforma $\alpha 1$ y $\alpha 4$ (Geering, 1997; Wang y O'Doherty, 2012; Li y Langhans, 2015; Clausen et al., 2017; Jung et al., 2018).

La subunidad beta es una proteína glucosilada compuesta por una hélice transmembrana de aproximadamente 35 KDa de peso molecular, es decir, 2/3 partes del tamaño de la subunidad alfa y está constituida por 370 aminoácidos, de esta cantidad de aminoácidos solo 30 de ellos están expuestos en el citosol, el resto se encuentran en la porción extracelular. La principal función de esta subunidad es la de chaperona, permitiendo la correcta integración en la membrana de la subunidad alfa recién sintetizada, lo cual es necesario para su protección de la degradación celular y la adquisición de propiedades funcionales en su recorrido hacia la membrana plasmática. Otra función de la subunidad beta es la influencia que tiene sobre la afinidad de los iones potasio. Estudios relacionados con mutagénesis revelaron que la subunidad beta tiene 2 residuos de Tyr⁴⁰ y Tyr⁴⁴ están altamente conservados en el dominio transmembrana y son considerados críticos para la afinidad de la enzima por el potasio (Rajasekaran et al., 2005; Geering, 2008; Wang y O'Doherty, 2012; Jung et al., 2018).

Al igual que la subunidad alfa, la subunidad beta se divide en 4 isoformas ($\beta 1$ -4) y estas se encuentran distribuidas de manera tejido-especifica. La isoforma $\beta 1$ es codificada en el exón 6 del cromosoma 1 de los humanos por el gen ATP1B1 y se distribuye de manera ubicua en las células. La isoforma $\beta 2$ se encontró la primera vez como molécula de adhesión en células gliales y se puede encontrar en neuronas, glándulas pineales y músculo esquelético, es codificada en el exón 8 del cromosoma 17 en humanos

por el gen ATP1B2. La isoforma $\beta 3$ es expresada por el gen ATP1B3 en el exón 7 del cromosoma 1 y se encuentra distribuida en testículos, pero también se puede expresar en células gliales, hígado, riñón y pulmón. La secuencia de identidad entra cada isoforma es de 39% entre la isoforma $\beta 1$ y $\beta 2$, 36% entre $\beta 1$ y $\beta 3$ y 47% entre $\beta 2$ y $\beta 3$ (Geering, 1997; Li y Langhans, 2015; Orlov et al., 2017; Clausen et al., 2017; Jung et al., 2018).

Recientemente fue identificada una tercera subunidad denominada gamma perteneciente al grupo de las proteínas FXYD. Esta es una familia de pequeñas proteínas de membrana de mamíferos con un peso molecular aproximado de 9 KDa, caracterizadas por compartir un consenso de una secuencia de aminoácidos de Phe-X-Tyr-Asp en su sitio N-terminal extracelular, además de 2 residuos de glicina y uno de serina en el dominio transmembrana. El dominio transmembrana se asocia cercanamente con el TM9 de la subunidad alfa y se considera que esta proteína está asociada con la modulación de la Na^+/K^+ -ATPasa de distintas maneras por el cambio aparente de la afinidad de sodio, potasio y ATP. Hasta el momento se han descrito 7 isoformas de esta subunidad cada una expresada en diferentes tejidos, siendo la isoforma FXYD-1 expresada en corazón y músculo esquelético, la FXYD-2 en riñones, la FXYD-3 en estómago y colon, la FXYD-4 en riñones y colon, la isoforma FXYD-5 en intestino, pulmones y riñones y la FXYD-6 y 7 en cerebro (Faller, 2008; Geering, 2008; Poulsen et al., 2010).

Las diferencias en las propiedades funcionales y en la adaptabilidad de la Na^+/K^+ -ATPasa en los diferentes tejidos pueden ser explicadas parcialmente por la existencia de isoformas en los componentes estructurales de la enzima. La expresión de las distintas isoformas alfa y beta en múltiples tejidos pueden favorecer la interacción preferencial de dichas isoformas. El complejo $\alpha 1\beta 1$ es el más ubicuo y son los únicos complejos que contribuyen significativamente en la reabsorción de sodio en los riñones, sin embargo, todas las combinaciones posibles de isoformas alfa y beta resultan en enzimas competentes catalíticamente indicando así que las múltiples isoenzimas son funcionales para operar en las células (Geering, 1997; Mijatovic et al., 2012).

Mecanismo Catalítico de la Na⁺/K⁺-ATPasa

El mecanismo de reacción de la translocación del sodio y potasio ha sido basado en extensos estudios de las propiedades bioquímicas de los intermediarios de la fosfoenzima, las reacciones bioquímicas parciales catalizadas por la proteína y su relación con las reacciones parciales de transporte. La enzima entra en un ciclo de cambios conformacionales (E₁-E₂) causados por un proceso de fosforilación y desfosforilación dependiente de ATP y ADP la cual es altamente específica y sensitiva para las concentraciones iones de sodio y potasio (Orlov et al., 2017).

De acuerdo con el mecanismo cinético de la Na⁺/K⁺-ATPasa también conocido como modelo de Albers-Post este involucra una serie de pasos estilo ping-pong que comienza con la unión de iones de sodio intracelular a la proteína catalizada por una fosforilación previa del residuo de Asp³⁶⁹ por la unión de una molécula de ATP y Mg²⁺ como cofactor. Gracias a la participación de los dominios citosólicos de la subunidad alfa es posible llevar a cabo la transferencia del grupo γ -fosforil de la molécula de ATP. El dominio de nucleótido (N) permite la unión de la molécula de ATP, mientras que el dominio de fosforilación (P) cataliza la transferencia del grupo γ -fosforil a la enzima. El tercer dominio denominado actuador (A) es requerido para el proceso de fosforilación y desfosforilación de la enzima y para llevar a cabo la hidrólisis de ATP a través del transporte de iones (Jorgensen et al., 2003; Faller, 2008).

La forma E₁ de la enzima tiene una cara intracelular para sitios de unión de cationes y muestra alta afinidad para sodio y ATP. La fosforilación produce una forma intermedia de la proteína (E₁P) la cual puede ser desfosforilada por ADP en una reacción inversa. Cuando el ADP se aleja, los iones de sodio se unen a la enzima esta ahora ocluida. La estequiometría de la oclusión de los iones transportados es un aspecto clave en el transporte activo de cationes. Posteriormente ocurre otra transición conformacional, los iones de sodio dejan la proteína en la superficie extracelular, siendo liberado de manera rápida el primer ion y de manera más lenta los otros 2. En esta etapa la enzima no es muy sensitiva al ADP, pero si a la hidrólisis acuosa. En esta forma la proteína (E₂P) une los

iones de potasio en la superficie exterior y estos iones ayudan con la desfosforilación de la enzima. El fosfato inorgánico (Pi) es liberado al interior y los iones de potasio son ocluidos para producir un estado intermedio de la proteína (E_2K_2). La liberación de iones potasio en la solución intracelular es catalizada por ATP uniéndose a un sitio con baja afinidad para este. La enzima regresa de su estado E_2 a E_1 con una baja afinidad de iones potasio y estos iones se liberan al interior de la superficie, estando lista la enzima para iniciar un nuevo ciclo. Cabe señalar que este proceso se puede llevar a cabo de 60-80 veces por minuto (Kaplan, 2002; Scheiner-Bobis, 2002).

Regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa

La regulación más directa de la Na^+/K^+ -ATPasa se logra a través de los sustratos sodio, potasio y ATP. El mayor contribuyente que estimula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es el sodio, ya que el ATP está presente en concentraciones saturables en la mayoría de las células. Pequeños cambios en las concentraciones de sodio citoplasmático activan uno o varios canales y transportadores dependientes de sodio pueden causar efectos dramáticos en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. Algunas hormonas parecen alterar la actividad de la proteína por un cambio aparente en su afinidad por el sodio induciendo otros mecanismos en la regulación de la enzima (Therien y Blostein, 2000).

Al ser una proteína transmembrana se ve influenciada por factores como la naturaleza de los constituyentes que forman la membrana son considerados factores importantes en la regulación de la función enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa. El principal efecto de los lípidos en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa está relacionado con la fluidez y espesor de la membrana. Por lo general, los lípidos que promueven la formación de la bicapa lipídica tienden a incrementar la fluidez y espesor de esta promoviendo una actividad óptima de la Na^+/K^+ -ATPasa, así como los lípidos cargados como la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol. La presencia de ácidos grasos libres presentes en la membrana o productos de la vía regulatoria dependiente de la fosfolipasa A_2 (PLA₂) tienden a inhibir la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa (Thieren y Blostein, 2000).

Las interacciones de la Na^+/K^+ -ATPasa con algunas de las proteínas del citoesqueleto han sido documentadas y son conocidas por regular la función de la Na^+/K^+ -ATPasa. Proteínas específicas del citoesqueleto que interactúan con la Na^+/K^+ -ATPasa incluyen anquirinas, espectrinas, aduccinas y moesinas. El principal resultado de estas interacciones se cree que es el ensamblaje correcto, entrega y estabilización de la Na^+/K^+ -ATPasa dentro del compartimento apropiado en la membrana. La anquirina funciona como mediadora entre la Na^+/K^+ -ATPasa y otras proteínas del citoesqueleto a través de asociaciones directas de la enzima con proteínas como la pasina o actina. Dos dominios específicos de la Na^+/K^+ -ATPasa interactúan con la anquirina han sido identificados, de estos, el primer dominio citoplasmático está altamente conservada en las isoformas de la bomba de sodio y en las H, K y Ca^{2+} -ATPasas. La unión de la anquirina al segundo dominio citoplasmático es probable que esta mediada por un *loop* con un motivo de 4 residuos de aminoácido (ALLK). Por otro lado, algunos polimorfismos de aduccinas y filamentos cortos de actina han sido mostrados que estimulan la Na^+/K^+ -ATPasa por el incremento en la afinidad de ATP o por activación de vías de señalización mediadas por cAMP-dependiente de proteínas cinasas (Thieren y Blostein, 2000; Silva y Soares-Da-Silva, 2012).

Algunos factores reguladores en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa son las concentraciones de hormonas tales como las catecolaminas, las hormonas peptídicas y los cardiotónicos. Las catecolaminas y las hormonas peptídicas se unen a receptores específicos y activan cascadas de señalización responsables de la regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa. La vía de la adenilato ciclasa-cAMP-PKA y la PLC-diacilglicerol-PKC son 2 vías conocidas que están involucradas en la regulación de la Na^+/K^+ -ATPasa. Las hormonas natriuréticas como la dopamina pueden inhibir la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en los tubos proximales posiblemente a través del sinergismo de los receptores D1 y D2. La activación de la proteína G acoplada al receptor de dopamina D1 y la hipoxia generada por los ROS pueden promover la endocitosis de la Na^+/K^+ -ATPasa, la cual es dependiente de clatrina e involucra la activación de la vía PKC, la fosforilación de AP-2

y la subunidad alfa de la Na^+/K^+ -ATPasa (Zhang et al., 2008; Silva y Soares-Da-Silva, 2012).

Otra hormona importante que regula la Na^+/K^+ -ATPasa es la insulina, la cual se une al receptor de insulina y activa varias vías de señalización celular que regulan funciones celulares. La insulina modula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa por medio del incremento del flujo de sodio, aumentando la afinidad de la Na^+/K^+ -ATPasa por el sodio intracelular que altera el estado de fosforilación que facilita la translocación de la Na^+/K^+ -ATPasa intracelular a la membrana plasmática. Además, la insulina también puede regular la transcripción, traslado y estabilidad de la Na^+/K^+ -ATPasa la cual ocurre de manera específica por isoforma (Li y Langhans, 2015).

La presencia de glucósidos cardíacos endógenos (GCE) existe en animales y recientemente se ha propuesto un rol fisiológico en la regulación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. Los glucósidos cardíacos endógenos han sido aislados en sangre y orina de mamíferos, así como de varios tejidos en especial del hipotálamo. Actualmente es poca la información que se conoce acerca de estas sustancias debido a la baja concentración, se cree que son sintetizados en la glándula adrenal. Estructuralmente estas moléculas son homólogos de la ouabaína con un núcleo similar al colesterol con un anillo pirona o lactona conteniendo combinaciones de grupos hidroxilo, sulfato o carbohidrato. El principal rol fisiológico de los GCE es en la regulación de la presión sanguínea. El mecanismo por el cual los GCE incrementan la presión sanguínea esta enlazado al equilibrio entre el sodio y el calcio vía intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En miocitos cardíacos y células vasculares de músculo liso la unión de GCE a la Na^+/K^+ -ATPasa inhibe el flujo de Na^+ y Ca^{2+} por medio del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ como una consecuencia de la acumulación del gradiente de Na^+ en el citoplasma e indirectamente incrementa las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} que a su vez modulan el contenido de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático y en la vía de señalización del calcio, generando así un efecto inotrópico positivo. (Thieren y Blostein, 2000; Schoner, 2002; Wang y O'Doherty, 2012).

Glucósidos Cardiotónicos

Desde la antigüedad, la humanidad ha encontrado en la naturaleza la forma de cubrir sus necesidades básicas como alimentación, calzado, transporte y la manera de curar sus afecciones. Las plantas han formado la base para el sistema de medicina tradicional para muchos grupos de humanos por lo que el desarrollo de la química de productos naturales ha permitido la identificación y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas con usos medicinales (Laza-Loaces et al., 2003; Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Dentro de estos grupos de principios activos se encuentran los glucósidos cardiotónicos, los cuales han sido reportados con fines medicinales desde hace aproximadamente 1500 años por diversas culturas. Dichos compuestos han sido utilizados como flechas envenenadas en la cacería, eméticos y tónicos para el corazón. La cultura china utilizaba la secreción obtenida del sapo *Bufo bufo* como un tratamiento ancestral en la medicina tradicional china para aliviar ciertas afecciones, dicha secreción es rica en una clase de compuestos glucósidos denominados bufadienólidos. Otras culturas como la egipcia utilizaban extractos de plantas medicinales obtenidos a partir de diferentes partes de la planta como raíz, tallo, hoja o semillas ricas en glucósidos cardíacos como tónicos cardioprotectores. No obstante, en 1785 William Whitering describió las propiedades medicinales de la planta *Digitalis purpurea* (conocida como digital) en el tratamiento de la hidropesía, enfermedad relacionada con la insuficiencia cardíaca, siendo esta la primera ocasión en que se detallaron los efectos tóxicos de las dosis elevadas de esta planta. Posteriormente se demostró que la planta contenía una variedad de sustancias cardiotónicas sumamente activas de naturaleza esteroidal y glucosiladas conocidas como glucósidos cardiotónicos o en específico cardenólidos (Newman et al., 2008; Izquierdo et al., 2010; Morsy, 2017; El-Seedi et al., 2019).

Estructura Química de los Glucósidos Cardiotónicos

Generalmente los glucósidos cardiotónicos muestran una diversidad estructural considerable, sin embargo, todos los miembros de esta familia de compuestos comparten

una estructura básica en común que los distingue de otros compuestos de naturaleza esteroideal. Estos están formados por 2 estructuras principales, un fragmento denominado aglicona o genina, el cual consiste en un núcleo esteroideal y el residuo de carbohidrato. El núcleo esteroideal está formado por tres anillos cíclicos de 6 carbonos denominados A, B y C, además de un anillo ciclopentano llamado D. Los anillos A/B y C/D están unidos en posición *cis*, mientras que los anillos B/C están unidos en posición *trans* en la estructura esteroideal. En la posición del carbono 14, entre los anillos C y D tienen incorporado un grupo hidroxilo en orientación β , además de tener un grupo metilo en orientación β en la posición del carbono 18. En la posición del carbono 17 del anillo D se encuentra un anillo insaturado. Como muestra la Figura 3, dependiendo del tipo de anillo que tenga esta posición los glucósidos cardiotónicos se clasifican en 2 grandes grupos, si poseen un anillo α -lactona son llamados cardenólidos, si poseen un anillo α -pirona estos compuestos son denominados bufadienólidos (Prassas y Diamandis, 2008; El-Seedi et al., 2019).

En el anillo A, en la posición del carbono 3, los glucósidos cardiotónicos poseen una gran variedad de residuos de carbohidratos unida al núcleo esteroideal. Los carbohidratos que se pueden encontrar más comúnmente en los glucósidos pertenecen al grupo de pentosas o hexosas las cuales incluyen glucosa, ramnosa, arabinosa y xilosa, sin embargo, también es posible encontrar deoxi azucares tales como 6-deoxi o 2,6-dideoxihexosas y sus ésteres metílicos tales como digitoxosa, cimara, diginosa, sarmentosa o fucosa. Aunque los carbohidratos por si mismos no tienen actividad, la adición de carbohidratos al núcleo esteroideal afecta la capacidad farmacodinámica y farmacocinética de los glucósidos, además se sabe que el tipo de carbohidrato unido puede influenciar la potencia de los compuestos. Además, es posible encontrar moléculas con uno o más residuos de carbohidrato unidos, lo cual resulta en una amplia variedad de combinaciones en los compuestos (Newman et al., 2008; El-Seedi et al., 2019).

Aunado a la gran variedad de residuos de carbohidrato que se pueden encontrar unidos a los glucósidos cardiotónicos, también es posible que estos compuestos posean diversas sustituciones en otros sitios del núcleo esteroideal. Dentro de los grupos funcionales que son más comunes están grupos hidroxilos y acetoxi, principalmente en

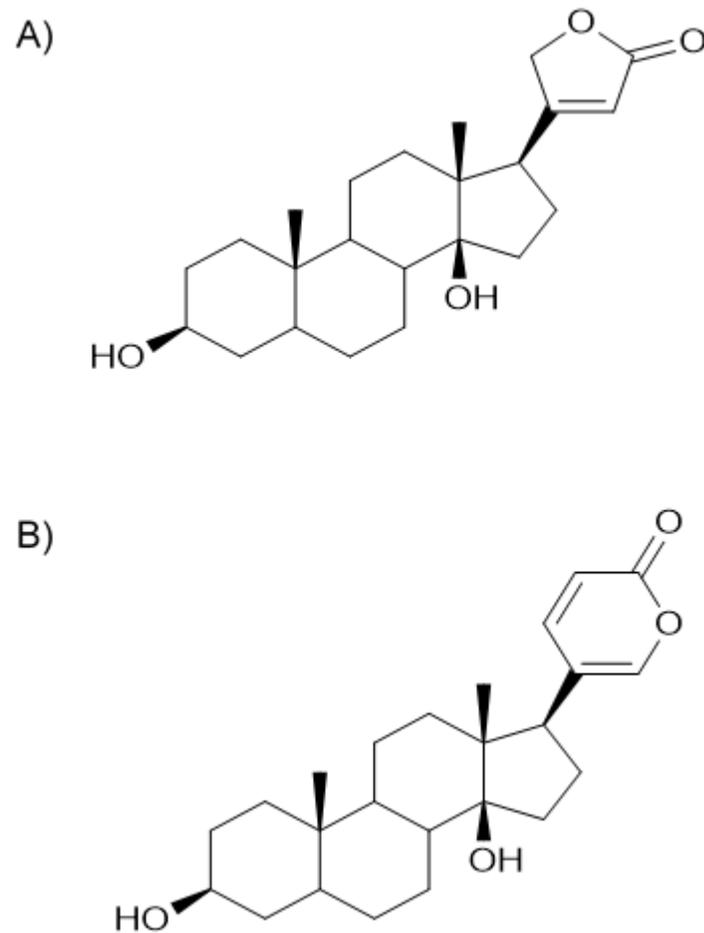


Figura 3. Estructura química de los glucósidos cardiotónicos. Los glucósidos cardiotónicos se clasifican en base a la sustitución de la posición C17. Los cardenólidos (A) se caracterizan por tener un anillo butiril lactona y los bufadienólidos (B) se caracterizan por la presencia de un anillo α -pirona.

sitios como la posición del carbono 12, 15 y 16, lo cual puede afectar las propiedades biológicas de estos compuestos (El-Seedi et al., 2019).

Biosíntesis de Cardenólidos

Los cardenólidos han sido usados por siglos por lo que es necesario conocer el camino biosintético de estos compuestos, sin embargo, este no ha sido elucidado del todo, siendo considerada la vía de los 5 β -cardenólidos la más conocida, pero se presume que pueden existir otras que estén involucradas. Como muestra la Figura 4, la biosíntesis de cardenólidos envuelve la transformación de esteroides a pregnenolona (**1**) presumiblemente por medio de la catálisis de la enzima mitocondrial citocromo P450-dependiente de corte de cadena (P450ccc), sin embargo, no existe evidencia de que esta enzima esté presente en plantas todavía. La pregnenolona es deshidrogenada para ser transformada en isoprogesterona para luego ser convertida en progesterona (**2**) por medio de la acción de la enzima Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD). La progesterona sufre una 5 β -reducción gracias a la enzima progesterona 5 β -reductasa (P5 β R) lo cual genera 5 β -pregnano-3, 20-diona (**3**) (Kreis y Muller-Uri, 2013; Krishna et al., 2015; Züst et al., 2018).

En otra reacción la enzima 3 β -hidroxiesteroide-5 β -oxidoreductasa (3 β HSD) convierte la 5 β -pregnano-3, 20-diona en 5 β -pregnano-3 β -ol-20-ona (**4**). Se teoriza que la conversión de 5 β -pregnano-3 β -ol-20-ona a 5 β -pregnano-3 β , 14 β -diol-20-ona es llevada a cabo por la enzima pregnano 14 β -hidroxilasa (**5**). Así como de manera hipotética se cree que la 5 β -pregnano-3 β , 14 β -diol-20-ona es transformada en 5 β -pregnano-3 β , 14 β -21-triol-20-ona por la enzima 14 β -hidroxipregnano 21 β -hidroxilasa (**6**). Para la formación de anillo lactona se cree que la enzima malonil coenzima A: 21-hidroxipregnano 20-O-maloniltransferasa (21MAT) actúa sobre el 5 β -pregnano-3 β , 14 β -21-triol-20-ona para convertirlo en 20-O-malonil 5 β -pregnano-3 β -14 β -diol-20-diona (**7**). Para la formación del anillo butenólido se desconoce si es por medio de una reacción enzimática o por medio de una reacción espontánea para la conversión a la genina (**8**) (Kreis y Muller-Uri, 2013; Krishna et al., 2015; Züst et al., 2018).

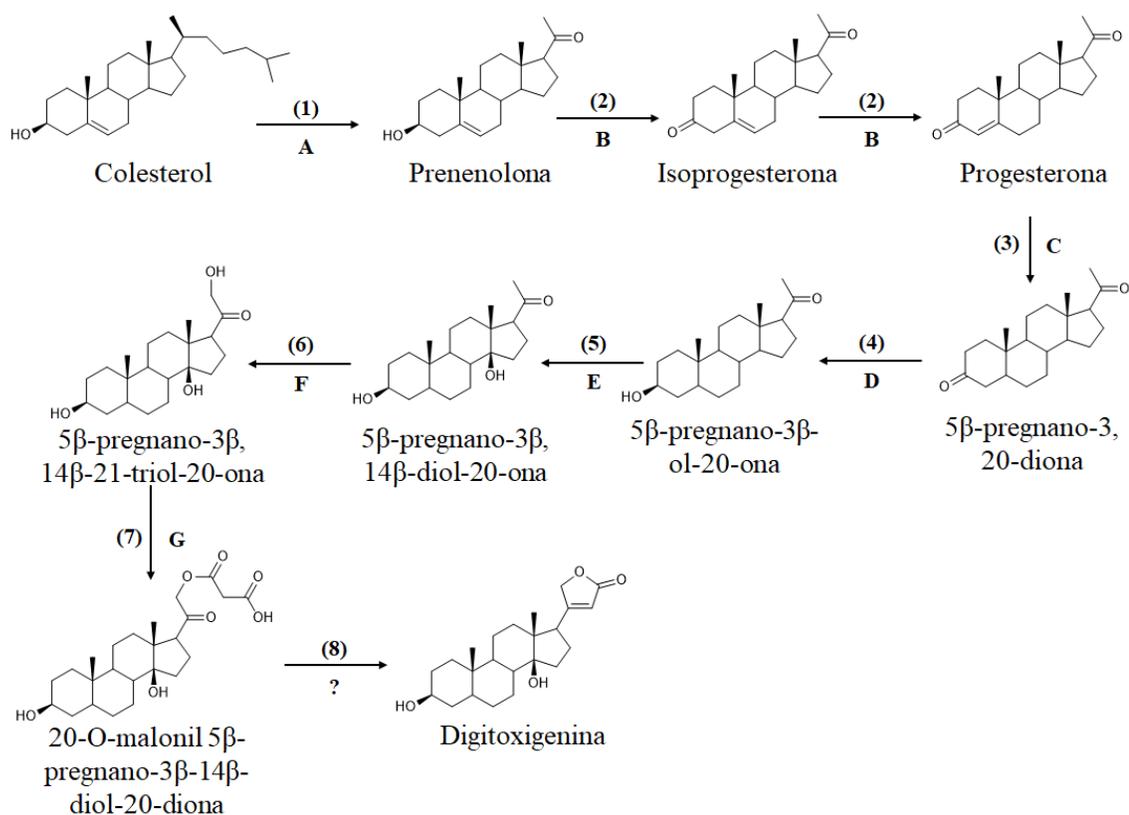


Figura 4. Biosíntesis de los compuestos cardenólidos. Las enzimas involucradas en esta ruta son A) citocromo P450-dependiente de corte de cadena (P450ccc), B) Δ^5 -3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD), C) progesterona 5 β-reductasa (P5βR), D) 3β-hidroxiesteroide-5β-oxidorreductasa (3βHSD), E) pregnano 14β-hidroxilasa, F) 14β-hidroxipregnano 21β-hidroxilasa, G) maloniol coenzima A: 21-hidroxipregnano 20-O-malonioltransferasa (21MAT).

La adición de los residuos de carbohidratos a las estructuras esteroidales de los cardenólidos se cree que se lleva a cabo en las vacuolas de las plantas. La genina es transportada al interior de la vacuola por medio de una enzima glucosidotranslocasa y después es glucosilado por glucosiltransferasas citoplasmáticas. Se teoriza que la conversión de los cardenólidos de geninas a compuestos glucosilados es responsabilidad de varios tejidos de las plantas como el látex de algunas plantas tipo algodoncillo (Krishna et al, 2015).

Cardenólidos y su Potencial Citotóxico

Gracias a la diversidad estructural que presentan los compuestos cardenólidos ha sido posible estudiar sus grandes propiedades farmacológicas con el fin de descubrir su potencial biológico. A estos compuestos se les han atribuido actividades biológicas tales como efectos acaricidas, antivirales, antiinflamatorios y neuroprotectores, no obstante, las principales actividades biológicas por lo que son conocidos son por su efecto cardiotónico y su citotoxicidad en estudios con líneas celulares cancerosas. El primer indicio de las propiedades citotóxicas de los cardenólidos frente a células cancerosas fue establecido por Stenkvist et al., (1980), el cual obtuvo células de cáncer de mama aisladas de mujeres en terapia con *Digitalis*, reportando que las células cancerosas obtenidas de las pacientes mostraban señales benignas comparadas con pacientes control sin tratamiento (Nelson y Mcgrady, 1981; Al-Rajhy et al., 2003; Dunn et al., 2011).

En la actualidad existe una vasta literatura en relación a la citotoxicidad de los cardenólidos y han sido publicados numerosos artículos describiendo las propiedades anticancerígenas de manera *in vitro*. Estudios realizados por Van-Quaquebeke et al., (2005) con el cardenólido semisintético UNBS-1450 en líneas celulares cancerosas humanas A549, Hs683, U373, HCT-15 y LoVo mostraron un potente efecto citotóxico con valores de IC₅₀ de 8, 3, 9, 24 y 10 nM, respectivamente. Por otro lado, Calderón-Montaña et al., (2014) evaluaron la actividad citotóxica del compuesto ouabaína en líneas celulares humanas de piel (UACC62), mama (MCF-7) y pulmón (A549) y sus contrapartes no cancerosas (VH10, MCF-10 y MRC-5, respectivamente, donde la

ouabaína demostró tener potentes efectos citotóxicos sobre las líneas celulares cancerosas, siendo la línea celular de pulmón A549 la más sensible con un valor de IC_{50} de 2.3 nM (Krishna et al., 2015).

Otros cardenólidos que han sido ampliamente estudiados son los derivados de las plantas del género *Digitalis* como la digitoxina y digoxina. Estudios realizados con el cardenólido digitoxina por Hosseini et al., (2017) sobre la línea celular tumoral HeLa y linfocitos humanos mostraron que la digitoxina además de tener un potente efecto citotóxico en contra de la línea celular HeLa también posee un efecto selectivo en contra de líneas celulares tumorales, con un valor de IC_{50} de 5.6 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular HeLa y una IC_{50} de 412.9 $\mu\text{g/mL}$ para los linfocitos humanos. Estudios *in vitro* realizados por Winnicka et al., (2007) con el compuesto digoxina en contra de la línea celular tumoral humana de mama MDA-MB-231 demostraron el efecto citotóxico de este compuesto con una IC_{50} de 70 nM a las 48 horas de tratamiento.

Asimismo, estudios recientes relacionados con la actividad antiproliferativa con los cardenólidos calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido, desglucouzarina y 12,16-dihidroxicatropina aislados de la planta *Asclepias subulata* sobre líneas celulares cancerosas humanas de pulmón (A549), colon (LS-180), próstata (PC-3), la línea celular no tumoral humana (ARPE-19) y la línea celular tumoral murina (RAW 264.7) demostraron que estos compuestos poseen un potencial no solo citotóxico, sino también selectivo ante líneas celulares cancerosas de origen humano como muestra la Tabla I. Cabe señalar que el compuesto con mejor actividad fue la molécula calotropina teniendo un fuerte efecto por debajo de concentraciones de 1.0 μM en las líneas celulares cancerosas de origen humano. Además, la línea celular con mayor susceptibilidad a los compuestos fue la línea celular de pulmón A549 en la cual los cuatro cardenólidos mostraron sus mejores valores de IC_{50} (Rascón-Valenzuela et al., 2015).

Tabla I. Efecto citotóxico de los cardenólidos 12,16- dihidroxicatropina, calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido (C3OG) y desglucouzarina aislados de *Asclepias subulata* en contra de líneas celulares cancerosas humanas, murinas y células no cancerosas humanas.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)				
	RAW 264.7	ARPE-19	A549	LS-180	PC-3
12,16-Dihidroxicatropina	ND	ND	2.48	5.62	11.7
Calotropina	271.62	149.30	0.013	0.06	0.41
C3OG	ND	ND	2.64	3.15	6.62
Desglucouzarina	ND	ND	0.90	6.57	9.68
Doxorrubicina*	0.63	1.02	1.78	6.99	3.18

* Control positivo. IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50%. ND: No determinada. Líneas celulares: RAW 264.7: Leucemia de macrófago murino modificado por virus. ARPE-19: Epitelio de retina pigmentado humano. A549: Adenocarcinoma de pulmón humano. LS-180: Adenocarcinoma colorrectal humano. PC-3: Adenocarcinoma de próstata humano.

Cardenólidos y su Relación con la Na⁺/K⁺-ATPasa

El uso de cardenólidos como terapia en contra del cáncer y el establecimiento de la Na⁺/K⁺-ATPasa como su principal blanco farmacológico ha sido estudiado por décadas. En 1967, Osamu Shiratori estudio la relación de la citotoxicidad de los cardenólidos sobre la línea celular HeLa y la actividad cardíaca de estos, concluyendo que el efecto citotóxico sobre la línea celular se debía a un efecto indirecto en las células probablemente relacionado con la membrana celular. Apoyado por estudios previos relacionados con el transporte activo a través de la membrana y el efecto inhibitorio de esta por los cardenólidos que involucraban la actividad ATPasa de la membrana y por estudios relacionados con la pérdida de adhesión celular por cardenólidos se llegó a la conclusión de que la citotoxicidad de estos compuestos y su actividad cardiotónica podría estar asociada a proteínas ATPasas. Posteriormente, gracias al trabajo de realizado por Skou en 1957 y el descubrimiento de la Na⁺/K⁺-ATPasa, aunado a otros trabajos relacionados con la función y estructura de la proteína se identificó que los cardenólidos formaban un complejo con la Na⁺/K⁺-ATPasa en un sitio de unión conservado y que podía inhibir la actividad enzimática de esta (Shiratori, 1967; Pavlovic, 2020).

Alrededor de hace 50 años que la Na⁺/K⁺-ATPasa fue establecida como uno de los principales blancos moleculares de los cardenólidos por la inhibición específica de esta enzima, por lo que es considerada la teoría más aceptada actualmente en lo que respecta al mecanismo de acción de estos compuestos. Como se mencionó previamente, la interacción de los cardenólidos con la subunidad alfa de la Na⁺/K⁺-ATPasa genera un cambio en la actividad de la bomba, lo cual incrementa la concentración de Na⁺ intracelular y disminuye los niveles de K⁺, desencadenando al denominado efecto inotrópico positivo (Zeino et al., 2015).

Recientemente, la Na⁺/K⁺-ATPasa ha emergido como un atractivo blanco molecular en el diagnóstico, prognosis, tratamiento y prevención del cáncer. Con el pasar de los años se ha establecido la importancia del rol de la Na⁺/K⁺-ATPasa en la regulación del crecimiento celular y la expresión de varios genes relacionados con los perfiles de

isoformas de la enzima principalmente observados en algunos tejidos premalignos y en tumores altamente invasivos. Además, se han observado cambios en la expresión de Na^+/K^+ -ATPasa en células cancerosas, tales como la elevación de su actividad durante la transformación de células malignas, también está descrito que la enzima está involucrada en roles como la supervivencia, proliferación, adhesión y migración celular. Es importante hacer énfasis sobre el hecho de que algunas células cancerosas sobreexpresan la Na^+/K^+ -ATPasa, en especial algunas de las isoformas α , tal es el caso de las células de cáncer de pulmón, riñón, melanomas y gliomas que poseen una sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ o las células de cáncer de colon que sobreexpresan la subunidad $\alpha 3$ (Zeino et al., 2015; Gonçalves de Albuquerque et al., 2017; Zanchett-Schneider et al., 2017).

Aunque la distribución de las diferentes isoformas bajo condiciones patológicas como el cáncer no están del todo claras, la subunidad α es considerada un blanco para nuevas terapias anticáncer. Debido a esto, se ha considerado que la Na^+/K^+ -ATPasa puede no solo tener un rol como bomba de iones, sino también una función como receptor. Bajo este contexto se ha propuesto la teoría del señalosoma, la cual considera que la enzima esta físicamente asociada a un conjunto de proteínas intracelulares que transmiten diferentes señales hacia el ambiente intracelular actuando la Na^+/K^+ -ATPasa como un receptor para los cardenólidos. Se cree que el señalosoma de la Na^+/K^+ -ATPasa provee señales de supervivencia en las células normales cuando se forma el complejo cardenólido- Na^+/K^+ -ATPasa y señales de muerte en células cancerosas (Pierre y Xie, 2006; Gonçalves de Albuquerque et al., 2017).

De acuerdo con la teoría del señalosoma, durante la unión del cardenólido en la Na^+/K^+ -ATPasa ocurren cambios conformacionales en la estructura de la proteína lo que activa una cascada de vías de transducción de señales. Estas vías comienzan con la activación de la proteína tirosina cinasa Src, la cual activa al receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR). Debido a la activación del EGFR, este recluta y estimula la proteína SHC, al receptor de factor de crecimiento unido a proteína 2 (GRB2) y a la proteína adaptadora SOS, liderando la activación de la proteína Ras y la cascada de las MAP cinasas (MAPK). En paralelo, la fosfolipasa C (PLC) y el inositol 3-fosfato (IP3)

permiten a la Na^+/K^+ -ATPasa interactuar con el retículo endoplásmico. Esta estimulación resulta en una liberación temporal de Ca^{2+} en el citoplasma, donde esta perturbación en la homeostasis de Ca^{2+} induce la activación de vías de señalización tales como la de NF- κ B (Silva y Soares da Silva, 2012; Zanchett-Schneider et al., 2017).

Además de las vías de señalización anteriormente mencionadas se sabe que cardenólidos como la ouabaína pueden modular las funciones celulares a través de la activación diferencial de vías de señalización dependiendo del tipo de línea celular, incrementando el nivel de complejidad debido a la activación de algunos mensajeros secundarios específicos para las células y su interacción con otras vías de señalización. Tal es el caso de la proteína Akt, la cual dependiendo de la línea celular puede ser fosforilada vía PI3K o por medio de la vía de las MAP cinasas (Silva y Soares da Silva, 2012). Cardenólidos como la oleandrina pueden aumentar de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando daño oxidativo, así como incrementar la expresión de proteínas como la FasL a causa de su interacción con la Na^+/K^+ -ATPasa (Newman et al., 2008).

Otros compuestos como la digitoxina además de bloquear la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa pueden reducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL por incremento de la liberación de citocromo C y la posterior activación de caspasas, además de tener la capacidad de inhibir la topoisomerasa II (Newman et al., 2008). Compuestos como la calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido, desglucouzarina y 12,16-dihidroxicalotropina pueden afectar el potencial de membrana mitocondrial y activar las caspasas 3, 8 y 9 para llevar a las células a apoptosis (Rascón-Valenzuela et al., 2016). En la Figura 5 se resumen algunos de los mecanismos reportados sobre la citotoxicidad de cardenólidos como ouabaína y digoxina.

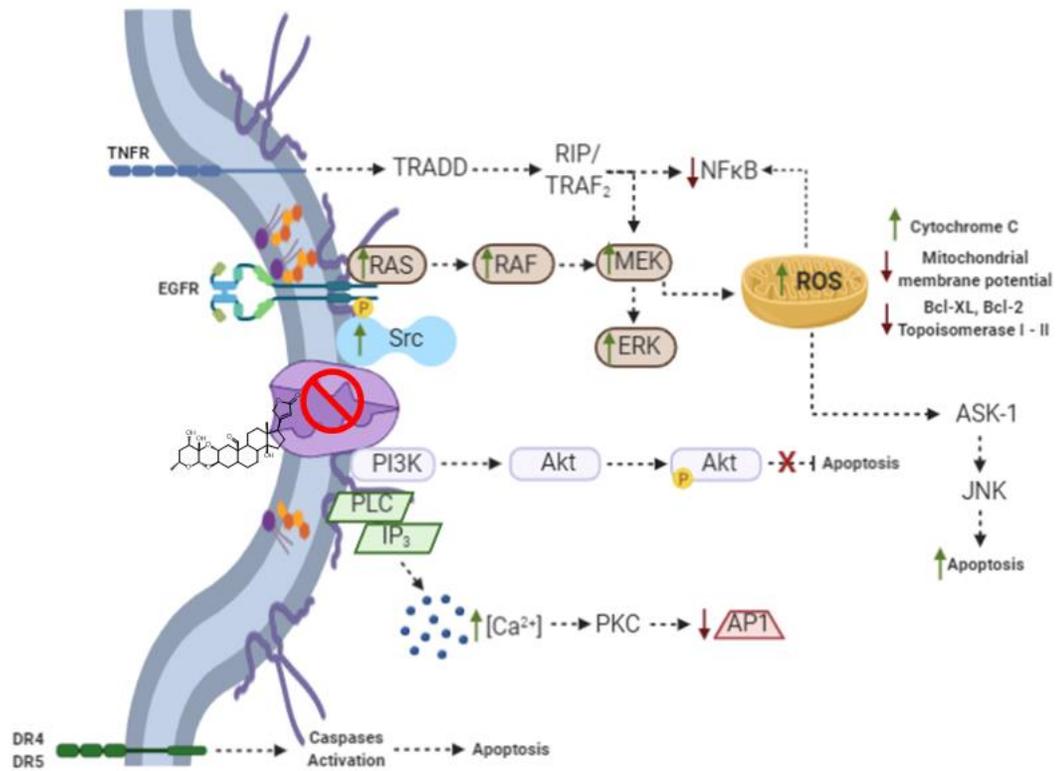


Figura 5. Vías de señalización involucradas en el complejo del señalosoma de la Na^+/K^+ -ATPasa. La interacción de cardenólidos como ouabaína sobre la Na^+/K^+ -ATPasa puede desencadenar el aumento (flecha verde) o disminución (flecha roja) en la expresión de proteínas y segundos mensajeros, así como la activación e inhibición de diversas vías de señalización. PI₃K: Fosfatidilinositol 3-cinasa. PLC: Fosfolipasa C. IP₃: Inositol trifosfato. PKC: Proteína cinasa C. AP-1: Proteína activadora 1. DR: Receptores de muerte 4-5. EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal. ROS: Especies reactivas de oxígeno. TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral. TRADD: Proteína tipo a asociada a dominio de muerte del TNFR. RIP: Proteína de interacción de receptor. TRAF2: TNFR-asociado al factor 2. NF- κ B: Factor nuclear kappa B. ASK-1: Cinasa reguladora de la señal de apoptosis. JNK: Cinasa c-Jun N-terminal [Basado en la figura de Newman et al., 2008].

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de Relación-Estructura Actividad Cualitativa y Cuantitativa (SAR/QSAR)

Formación de la Base de Datos

Para la formación de la base de datos, se recopilaron un total de 58 compuestos cardenólidos reportados con actividad antiproliferativa sobre la línea celular A549. La estructura líder presenta el núcleo esteroidal, el anillo lactona en la posición C17, un grupo hidroxilo en orientación β en la posición C14 y un grupo metilo en orientación β en las posiciones C18 y C19. Los criterios de selección para la recopilación de los datos de actividad antiproliferativa incluyeron: que la determinación de la viabilidad celular estuviera determinada por el método del MTT, la exposición del estímulo de 48 horas y un agente antiproliferativo reportado como control positivo. Los valores de la concentración inhibitoria de la proliferación celular al 50% (IC_{50}) fue expresada en μM . Se manejaron valores de IC_{50} entre los rangos de 0.001-27.0 μM .

Descriptores Moleculares

Las estructuras de los cardenólidos se manejaron en formato 2D, las cuales fueron construidas en el software ChemBioDraw Ultra versión 12.0 (CambridgeSoft, 2009). Los correspondientes SMILES en 2D para cada una de las moléculas fueron generados en el software anteriormente mencionado. Los cálculos de los descriptores moleculares de los compuestos fueron obtenidos a partir de los archivos en formato SMILE 2D usando el software libre PaDEL (<http://www.yapcwsoft.com/dd/padeldescriptor/>). Dentro de los descriptores moleculares calculados están los coeficientes de partición (LogP), número de enlaces rotables, número de aceptores y donadores formadores de puente de hidrógeno, descriptores electrónicos, topológicos, constitucionales, electro-topológicos y geométricos. Se realizaron análisis de regresión lineal entre la actividad antiproliferativa y las propiedades fisicoquímicas para reducir el número de descriptores moleculares para generar posteriormente los modelos matemáticos.

Análisis SAR/QSAR

Los modelos matemáticos descriptivos fueron generados a partir de análisis de regresión lineal múltiple. La actividad antiproliferativa fue expresada en $-\text{Log}(\text{IC}_{50})$, la cual fue considerada la variable dependiente y los descriptores moleculares las variables independientes. Los modelos fueron generados en el software estadístico OriginsProLab versión 8 (OriginsLab, 2008). Cada modelo se reportó con el coeficiente de correlación R , R^2 , R^2_{Adj} , suma de cuadrados residuales (RSS), la raíz del error cuadrático medio (RMSE), y el valor F de Fisher. Estos parámetros fueron calculados usando una significancia estadística de $p=0.05$ (Bravo-Gómez et al., 2009).

Validación de Modelos QSAR

La validación de los modelos obtenidos para los cardenólidos con doble enlace éter fue llevada a cabo por una validación interna usando una validación cruzada aleatorio (*random cross-validation*). Para esto, el set completo de compuestos fue dividido en un set de entrenamiento de 12 moléculas y un set de prueba de 5 compuestos. Las moléculas que conformaron el grupo del set de entrenamiento fueron las siguientes: voruscharina (B1), calotropina (B3), asclepina (B4), uscharidina (B5), 16α -acetoxiasclepina (B6), calotoxina (B8), $3'\beta$ -metoxi- 15β -hidroxicalactina (B9), 15β -hidroxicalactina (B9), 15β -hidroxicalactina (B11), 15β -hidroxicalotropina (B13), 16α -acetoxicalotropina (B14), 16α -hidroxiasclepina (B15) y $12,16$ -dihidroxicalotropina (B17). El set de prueba fue conformado por las moléculas UNBS 1450 (B2), calactina (B7), uscharina (B10), 15β -hidroxiuscharina (B12) y afrósido (B16). Para la selección del set de prueba, 5 moléculas del set completo fueron excluidas, y nuevos modelos fueron generados por análisis de regresión lineal múltiple con los mismos parámetros estadísticos previamente mencionados.

Los modelos matemáticos con un valor de R^2 por encima de 0.70 fueron seleccionados y usados para llevar a cabo la validación externa. Para esto, un grupo de 6 cardenólidos fue seleccionado para realizar la validación externa. Estas moléculas fueron

la 6'-hidroxi-16 α -hidroxicalactina, 16 α -hidroxicalactina, 6'-hidroxicalactina, 2''-oxovoruscharina, 6'-dehidroxigalakinósido y 12-dehidroxigalakinósido (Van-Quaquebeke y col., 2005; Piacente y col., 2009). Estas moléculas no cumplieron con todos los criterios de inclusión para ser incorporadas en la base de datos, pero tienen reportado valores de IC₅₀ en la línea tumoral A549. El set de entrenamiento en este paso se incluyó a los 17 cardenólidos del grupo B. Los análisis de regresión lineal múltiple se llevaron a cabo para comparar los valores de IC₅₀ reportados de estos compuestos en contra de los valores de IC₅₀ predictivos obtenidos con los modelos.

Modelado Molecular

Preparación de Ligandos

Los cardenólidos calotropina, 12, 16-dihidroxicalotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y desglucouzarina fueron utilizados como ligandos para el acoplamiento molecular. El cardenólido ouabaína fue utilizado como ligando de referencia y para validar el método del análisis. Los ligandos fueron diseñados en formato 2D en el software ChemDraw Ultra versión 12 (Cambridge Soft, 2009), respetando las orientaciones de los enlaces, siendo corroboradas las estructuras en bases de datos de compuestos como ZINC (<https://zinc.docking.org/>) y ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Las estructuras de los ligandos fueron exportadas al software Molecular Operating Environment (MOE) versión 2018 (Chemical Computer Group ULC, QC, Canadá), donde fue aplicado el campo de fuerza MMFF94 para minimizar la energía y crear una librería de conformeros de cada ligando.

Preparación del Receptor

Para la realización del acoplamiento molecular se utilizó como receptor la estructura de una proteína Na⁺/K⁺-ATPasa obtenida mediante cristalografía de rayos X. Dicha estructura fue descargada del Banco de Datos de Proteínas (PDB) con código de registro 4HYT (<https://www.rcsb.org>). Esta enzima es una proteína obtenida a partir de un riñón

porcino con una resolución de 3.4 Å, contando con una homología del 98% con la proteína de origen humano (Laursen y col., 2013).

Para realizar el análisis de acoplamiento molecular se eliminaron las subunidades beta y gamma, las moléculas de agua y los ligandos que no están involucrados en el sitio de unión. Para la preparación de la subunidad alfa, se conservó la molécula ouabaína considerada nuestro ligando de referencia y los átomos de iones de magnesio. Posteriormente, la estructura de la subunidad alfa fue preparada usando el protocolo de preparación rápida del software MOE, donde se aplicó el campo de fuerza CHARMM27 para encontrar la conformación de mínima energía de los aminoácidos del receptor.

Docking Molecular

Para generar los modelos de interacción se utilizó la estructura de la subunidad alfa de la Na⁺/K⁺-ATPasa co-cristalizada con el cardenólido ouabaína como ligando de referencia. La librería de cardenólidos previamente mencionada fue usada como ligandos para elucidar la afinidad de unión con el receptor. Un sitio específico donde interactuaba el ligando de referencia fue seleccionado para realizar el *docking* molecular. De acuerdo con el protocolo del software MOE de la función de interacción, el sitio de unión de la proteína permanece rígido, mientras que los cardenólidos se mantuvieron como entidades flexibles.

Tres series estocásticas independientes fueron llevadas a cabo para obtener la convergencia de las posiciones con los mejores puntajes. Se aplicó el protocolo de posicionamiento denominado *Alpha Triangle*, donde 60,000 poses fueron consideradas por cada conformero usando la función de puntaje *London dG* del software MOE. De todas las poses analizadas por el software, las primeras 30 poses con los mejores puntajes de cada ligando fueron sujetas a un refinamiento estructural con un protocolo de ajuste inducido.

La colección de los complejos ligando-receptor obtenidos a través del procedimiento de acoplamiento fueron seleccionadas basándose en la energía de unión expresada en kcal/mol y la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) expresada en

ångstrom. El análisis de los modelos moleculares, las imágenes y los diagramas de interacción entre las poses seleccionadas de los ligandos y los aminoácidos del sitio de unión fueron analizadas y elaboradas en el software Discovery Studio versión 2019 (Biovia, Dassault Systemes Biovia Corp, San Diego, CA, EE.UU.).

Ensayos de Inhibición Enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa

Para determinar si en efecto los cardenólidos utilizados como ligando en la simulación del modelado molecular pueden inhibir la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa de manera *in vitro* se realizaron una serie de ensayos de inhibición enzimática basados en la metodología propuesta por Mugpasao et al., (2015) con ligeras modificaciones. La actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa fue determinada por la cuantificación colorimétrica de ortofosfato (Pi) liberado durante la hidrólisis de ATP de acuerdo al método de Taussky-Shorr (1953). La cuantificación de proteína en las muestras de Na⁺/K⁺-ATPasa se realizó por medio del método de Bradford con el protocolo del fabricante y se utilizó albumina sérica bovina (BSA) como estándar (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (Bradford, 1976). Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo con una enzima adenosina 5'-trifosfatasa (Na⁺/K⁺-ATPasa) comercial obtenida de corteza cerebral porcina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Como inhibidores fueron utilizados los cardenólidos ouabaína como inhibidor de referencia (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y los compuestos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido fueron aislados y caracterizados previamente de *Asclepias subulata* en nuestro grupo de trabajo (Rascón-Valenzuela et al., 2015).

Para iniciar la reacción enzimática se incubaron en una placa de 96 pozos 10 µL de solución Na⁺/K⁺-ATPasa (0.5 U/mL), 4 µL de solución NaCl/KCl (NaCl 1.65 M, KCl 35 mM), 70 µL solución buffer Tris-HCl 30 mM (Tris-HCl 30 mM, EDTA 0.5 mM, MgCl₂ 7.8 mM) a 37 °C por 30 minutos con 6 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) o los compuestos si fuera el caso. El rango de concentraciones evaluados para las moléculas utilizadas en el ensayo fue de 100.0 – 0.001 µM de ouabaína y de 1000.0 – 0.01 µM para calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido. Pasado el periodo de incubación

fueron agregados 20 μL de solución de ATP 22 mM a cada pozo, se agitó suavemente la placa y fue incubada por 15 minutos a 37 °C. Para bloquear la reacción fueron agregados 30 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 30% (w/v) a cada pozo y posteriormente la placa se agitó suavemente para mezclar y se procedió a centrifugar la placa a 3000 rpm por 15 minutos. Finalmente, 50 μL del sobrenadante fueron transferidos a otra placa de 96 pozos y se agregaron 100 μL del reactivo de Taussky-Shorr. La placa se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz y se realizó la lectura de la muestra en un lector de microplacas ThermoScientific Multiskan (Thermo Fisher, Finlandia) a 660 nm. La intensidad del color fue proporcional a la liberación de ortofosfato, siendo este un indicador directo de la hidrólisis de ATP y la actividad Na^+/K^+ -ATPasa. La inhibición de la actividad enzimática de los cardenólidos se manejó en porcentaje de actividad Na^+/K^+ -ATPasa comparada con el respectivo control (pozos sin inhibidores). Los resultados de la inhibición de la actividad enzimática de los cardenólidos fueron expresados en valores de $\text{IC}_{50} \pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

Análisis de Parámetros Cinéticos de la Actividad Na^+/K^+ -ATPasa

Los parámetros cinéticos de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima (V_{max}) de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa de corteza cerebral porcina fueron determinados por medio de la estimación de la velocidad inicial (V_o) por variaciones en las concentraciones de sustrato (ATP). Las concentraciones de ATP utilizadas fueron 0.125, 0.25, 1.0 y 4.0 mM a concentración final utilizando las condiciones estándar previamente mencionadas. Las velocidades iniciales fueron registradas en un lapso de 15 minutos en periodos de 3 minutos. La medición fue llevada a cabo en ausencia de inhibidores manteniendo la concentración de iones de Na^+ , K^+ y Mg^{2+} constantes. Los valores de las pendientes fueron calculados por medio de análisis de regresión lineal para obtener los datos de las V_o para posteriormente ajustar los datos obtenidos al modelo de Michaelis-Menten por medio de análisis de regresión no lineal.

Para la determinación de la naturaleza del tipo de inhibición presentada por los cardenólidos aislados de *Asclepias subulata* y el inhibidor de referencia frente a la

actividad Na^+/K^+ -ATPasa se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , así como el cálculo de la constante de inhibición (K_i). Para esto se realizó el cálculo de la velocidad inicial de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa en presencia y ausencia de los inhibidores a un tiempo fijo de 15 minutos. Las concentraciones de inhibidores utilizadas en los ensayos fueron 0.1 y 1.0 μM . Dichas concentraciones fueron seleccionadas con base a los valores de IC_{50} obtenidos previamente en los ensayos de inhibición enzimática. Los datos de las V_o obtenidas de estos experimentos fueron ajustados al modelo de Michaelis-Menten por medio de análisis de regresión no lineal. La determinación de la naturaleza del tipo de inhibición causada por los cardenólidos fue calculada a partir del diagrama de doble recíproco de Lineweaver-Burk. Todos los experimentos fueron evaluados por triplicado y en tres experimentos independientes.

Diseño de Farmacóforo

Para la propuesta de farmacóforo se realizó una base de datos de 60 compuestos cardenólidos con reporte de inhibición enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa a partir de la literatura disponible. El criterio de selección para la base de datos fueron los siguientes: el valor del efecto inhibitorio estuviera expresado en IC_{50} y que la enzima utilizada en los ensayos sea una Na^+/K^+ -ATPasa de corteza cerebral porcina (comercial).

Para obtener los datos de las posibles estructuras farmacofóricas de los cardenólidos se realizó un análisis exploratorio por medio de modelado molecular en el cual se analizó la interacción de los cardenólidos de la base de datos sobre la Na^+/K^+ -ATPasa usando los cardenólidos como ligandos y la proteína Na^+/K^+ -ATPasa porcina (4HYT) como receptor. Las estructuras 2D de los ligandos fueron realizadas en el software ChemDraw Ultra versión 12 (Cambridge Soft, 2009) respetando las orientaciones de los enlaces para posteriormente ser exportadas al software Discovery Studio versión 2019, donde fue aplicado el campo de fuerza MMFF94 para minimizar la energía de los ligandos y crear la librería de conformeros de estos. Como receptor se utilizó la estructura cristalográfica de la Na^+/K^+ -ATPasa de riñón porcino obtenida del PDB (Código 4HYT) previamente optimizada en los *docking* moleculares anteriormente mencionados.

El acoplamiento molecular se llevó a cabo en el software UCSF Chimera versión 1.13.1 (Universidad de California, San Francisco, CA, EE.UU.) utilizando un modelo de receptor rígido y ligandos flexibles en el mismo sitio de unión del ligando ouabaína en las coordenadas espaciales *center* (-55.4782, 81.2577, -46.6604) y *size* (17.2372, 11.102, 22.006). Se realizaron tres series estocásticas independientes para obtener las conformaciones con los mejores puntajes. Cada *docking* molecular generó un máximo de 10 poses por análisis. Los datos de los complejos ligando-receptor obtenidos en el procedimiento de acoplamiento fueron seleccionados en base a la energía de unión expresada en Kcal/mol y el valor de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) expresada en ángstrom. El análisis de los modelos moleculares, imágenes y diagramas de interacción de las poses seleccionadas de los ligandos y los aminoácidos del sitio de unión fueron analizadas y elaboradas en el software Discovery Studio versión 2019 (Biovia, Dassault Systemes Biovia Corp, San Diego, CA, EE.UU.).

Análisis Estadístico

Los datos de las curvas de inhibición de la Na⁺/K⁺-ATPasa fueron ajustados por análisis de regresión no lineal asumiendo el modelo clásico de una curva dosis-respuesta para estimar la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀). Los análisis de regresión no lineal, así como los ajustes al modelo de Michaelis-Menten, los cálculos de los parámetros cinéticos K_m, V_{max}, K_i y los diagramas de doble recíprocos de Lineweaver-Burk se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software Inc., USA). La diferencia de las medias de los resultados de la actividad Na⁺/K⁺-ATPasa fueron analizados por análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido por una prueba de Tukey usando el software IBM SPSS statistics versión 20 (IBM Inc., Hong Kong).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

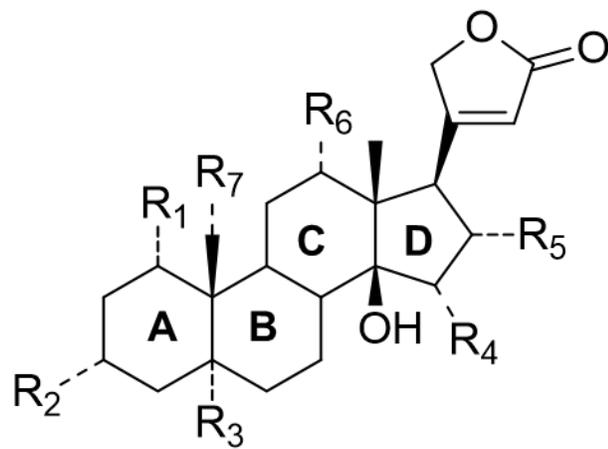
Análisis de Relación-Estructura Actividad Cualitativa (SAR)

Con la finalidad de determinar el efecto de los cardenólidos y sus modificaciones estructurales sobre la actividad antiproliferativa en la línea celular humana de pulmón A549 se llevó a cabo un análisis teórico de relación estructura-actividad. Para esto, se formó una base de datos de cardenólidos con 58 compuestos, los cuales fueron divididos en 2 grupos y son enlistados en el Anexo I y II. El grupo denominado como A incluye moléculas *tipo digital* y sus geninas, mientras que el llamado grupo B, fue conformado por cardenólidos *tipo doble enlace*. La naturaleza y posición de cada sustitución en los cardenólidos se muestra en la Figura 6.

Las Tablas II y III muestran las diferentes sustituciones encontradas en los diversos cardenólidos utilizados para el análisis SAR. Nuestras observaciones revelan que los principales grupos sustituyentes en los cardenólidos fueron grupos hidroxilos, grupos acetoxi y diversos carbohidratos como ramnosa, glucosa y digitoxósidos. Para el caso de la posición C1, la sustitución más frecuente fue un grupo hidroxilo; sin embargo, esta parece no tener relevancia en la actividad antiproliferativa. En el caso de la posición C2, solo el compuesto afrogenina (A36) presentó esta modificación, y al igual que la posición C1 no afecta la citotoxicidad.

Para las sustituciones en la posición C3, la principal modificación observada fue la incorporación de los residuos de carbohidrato. Esta sustitución está presente en ambos grupos de carbohidratos analizados en este trabajo. Esta modificación parece jugar un rol esencial en la actividad antiproliferativa exhibida por estos compuestos. Los cardenólidos donde está ausente el residuo de carbohidrato en esta posición generalmente presentan una disminución de su actividad antiproliferativa.

A)



B)

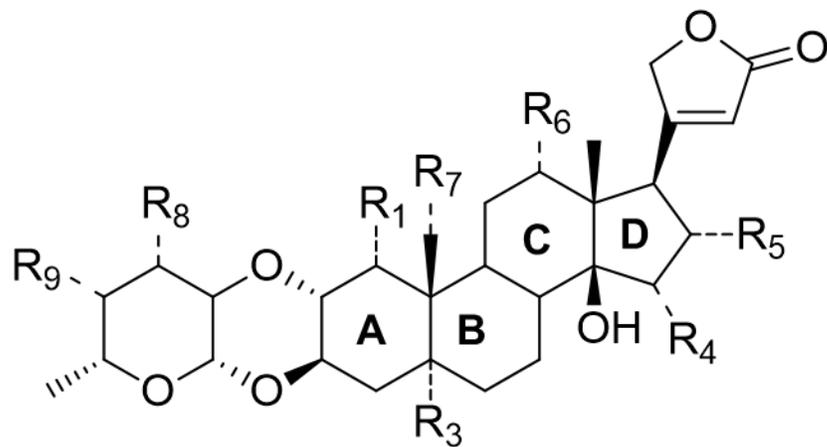


Figura 6. Estructura andamio de los compuestos cardenólidos y los sitios de sustitución estudiados para el análisis SAR. A) Cardenólidos *tipo digital*. B) Cardenólidos *tipo doble enlace*.

Tabla II. Sustituciones de las moléculas *tipo digital* y el efecto antiproliferativo expresado en valores de IC₅₀ en la línea celular A549.

	IC ₅₀ (μM)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
A1	0.0053	OH	Rhm	OH	H	H	H	CH ₂ OH
A2	0.0193	H	Dgt-4'-Glc	H	H	H	H	CH ₃
A3	0.0328	H	Rhm	OH	H	H	H	CHO
A4	0.0335	H	Dgt	H	H	H	H	CH ₃
A5	0.047	H	Cym	OH	H	H	H	CH ₃
A6	0.0585	H	Dgt-4'-Dgt	H	H	H	H	CH ₃
A7	0.06	H	Rhm	H	H	Ac	H	CH ₃
A8	0.0631	H	Rhm-4'-Glu	H	H	H	H	CH ₃
A9	0.065	H	Glu	H	H	Ac	H	CH ₃
A10	0.088	H	AME	H	H	H	H	CH ₃
A11	0.123	H	Cym	OH	H	H	H	CHO
A12	0.133	H	Dgt (3)-4'-Glu	H	H	H	OH	CH ₃
A13	0.133	H	Dgt (3)-4'	H	H	H	OH	CH ₃
A14	0.153	H	Dgt-4'-Dgt	H	H	H	OH	CH ₃
A15	0.185	H	Dgt (3)-4'-CH ₃	H	H	H	H	CH ₃
A16	0.207	H	Dgt (3)-4'-CH ₃	H	H	H	OH	CH ₃
A17	0.219	H	OH	OH	H	Ac	H	CH ₃
A18	0.22	H	Dgt (3)-4'-CH ₃	H	H	H	H	CH ₃
A19	0.236	H	MAA	H	H	H	H	CH ₃
A20	0.241	H	Dgt (4)	H	H	H	OH	CH ₃
A21	0.264	H	Dgt (2)-4'- Dgt(3'Ac)-4'-Glu	H	H	H	OH	CH ₃

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50%. H: Hidrógeno. OH: Grupo hidroxilo. CH₃: Grupo metilo. Dgt: Digitoxósido. Glu: Glucosa. Rhm: Ramnosa. Cym: Cimarosa. Dig: Digitoxosa. AME: Amantadina etilamina. MAA: Morfonilil acetilamina. POD: Fosfato O-dimetil. PiOD: Fosfito O-dimetil. Ac: Grupo acetato. Δ: Doble enlace.

Tabla II. Sustituciones de las moléculas *tipo digital* y el efecto antiproliferativo expresado en valores de IC₅₀ en la línea celular A549. (Continuación)

	IC ₅₀ (μM)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
A22	0.276	H	POD	H	H	H	H	CH ₃
A23	0.34	H	Dig	OH	H	Ac	H	CH ₃
A24	0.368	H	Dgt (3)	H	H	H	H	CH ₃
A25	0.49	OH	Glu	OH	H	H	H	CH ₃
A26	0.539	H	OH	OH	H	Ac	H	CH ₃
A27	0.55	H	OH	H	H	H	OH	CH ₂ OH
A28	0.604	H	OH	H	H	H	H	CH ₃
A29	0.607	H	Dig-4'-Glu (2)	OH	H	H	H	CHO
A30	0.609	H	Dgt-4'-Glu	H	H	OH	H	CH ₃
A31	0.64	H	OH	H	H	H	H	CH ₃
A32	0.66	H	Glu-6'-Glu	H	H	H	H	CH ₃
A33	0.795	H	PiOD	H	H	H	H	CH ₃
A34	0.9	H	Glu	H	H	H	H	CH ₃
A35	1.01	H	OH	H	H	H	OH	CHO
A36	1.69	H	OH	H	OH	H	H	CH ₃
A37	1.84	H	OH	OH	H	OH	H	CH ₃
A38	2.64	H	Glu	H	H	H	H	CHO
A39	5.6	H	Glu – 2'Glu	H	H	H	H	CH ₃
A40	14.4	H	OH	OH	H	H	H	CH ₃
A41	26.04	H	OH	OH	H	Δ ¹⁶⁻¹⁷	H	CH ₃
A42	27.2	OH	OH	OH	H	H	H	CH ₃

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50%. H: Hidrógeno. OH: Grupo hidroxilo. CH₃: Grupo metilo. Dgt: Digitoxósido. Glu: Glucosa. Rhm: Ramnosa. Cym: Cimarosa. Dig: Digitoxosa. AME: Amantadina etilamina. MAA: Morfonilil acetilamina. POD: Fosfato O-dimetil. PiOD: Fosfito O-dimetil. Ac: Grupo acetato. Δ: Doble enlace.

Tabla III. Sustituciones de los cardenólidos *tipo doble enlace* y el efecto antiproliferativo expresado como IC₅₀ en la línea celular A549.

	IC ₅₀ (μM)	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉
B1	0.005	H	H	H	CHO	H	
B2	0.008	H	H	H	CH ₂ OH	H	
B3	0.013	H	H	H	CHO	H	OH
B4	0.017	H	H	H	CHO	H	Ac
B5	0.0189	H	H	H	CHO	H	C=O
B6	0.0316	H	Ac	H	CHO	H	Ac
B7	0.036	H	H	H	CHO	H	OH
B8	0.058	H	H	H	CHO	OH	OH
B9	0.065	OH	H	H	CHO	H	O-CH ₃
B10	0.104	H	H	H	CHO	H	
B11	0.127	OH	H	H	CHO	H	OH
B12	0.157	OH	H	H	CHO	H	
B13	0.182	OH	H	H	CHO	H	OH
B14	0.186	H	Ac	H	CHO	H	OH
B15	0.24	H	OH	H	CHO	H	Ac
B16	0.347	OH	H	H	CH ₃	H	OH
B17	2.48	H	OH	OH	CHO	H	OH

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50%. H: Hidrógeno. OH: Grupo hidroxilo. CH₃: Grupo metilo. Ac: Grupo acetato. C=O: Grupo cetona.

Como muestra la Figura 7, compuestos como la digitoxigenina (A31) muestran mayores valores de IC_{50} (0.64 μM) en comparación con su análogo glucosado, la digitoxigenina monodigitoxósido (A4) con valores de IC_{50} de 0.0335 μM . La eliminación del residuo glucosado de la posición C3 de la molécula A31 representa una disminución en la potencia inhibitoria de aproximadamente 20 veces.

Para los cardenólidos *tipo digital*, el número y posición de las unidades de carbohidratos parece modificar su actividad antiproliferativa. Los cardenólidos con 2 o más residuos de carbohidratos usualmente presentaron un menor efecto antiproliferativo en la línea celular que moléculas con un solo residuo. Un claro ejemplo de este comportamiento sobre la actividad antiproliferativa son las moléculas digitoxigenina monodigitoxósido (A4), digitoxigenina bidigitoxósido (A6) y digitoxina (A24). Estos compuestos poseen uno, dos y tres unidades de carbohidrato respectivamente. Los valores de IC_{50} se van incrementando dependiendo de la cantidad de residuos de carbohidratos, con IC_{50} de 0.0335, 0.0585 y 0.368 μM para los compuestos A4, A6 y A24 respectivamente.

Igualmente, la posición del grupo sustituyente modifica la citotoxicidad. El cardenólido digitoxigenina bidigitoxósido (A6), el cual contiene unida el segundo residuo de carbohidrato en la posición C4' mostró una IC_{50} de 0.0585 μM . Cambiando el sitio de unión de la segunda unidad de carbohidrato a C6' como la digitoxigenina gentobiósido (A32) con IC_{50} de 0.66 μM y a C2' como la digitoxigenina soforósido (A39), la cual tiene un valor de IC_{50} reportado de 5.6 μM muestran que se produce una disminución en la actividad antiproliferativa.

En el caso de moléculas sintéticas, la incorporación de grupos amino y fosfatos en la posición C3 produce un efecto antiproliferativo sobre la línea celular A549. Compuestos tales como la digitoxigenina 3 β [2-1 (amantadina)-1-on-etilamina] (A10) y la digitoxigenina 3-(fosfato-O-dimetil) (A22) incrementaron el efecto antiproliferativo en contraste con la genina natural digitoxigenina (A31) con valores de IC_{50} de 0.088, 0.276 y 0.64 μM , respectivamente (Figura 8).

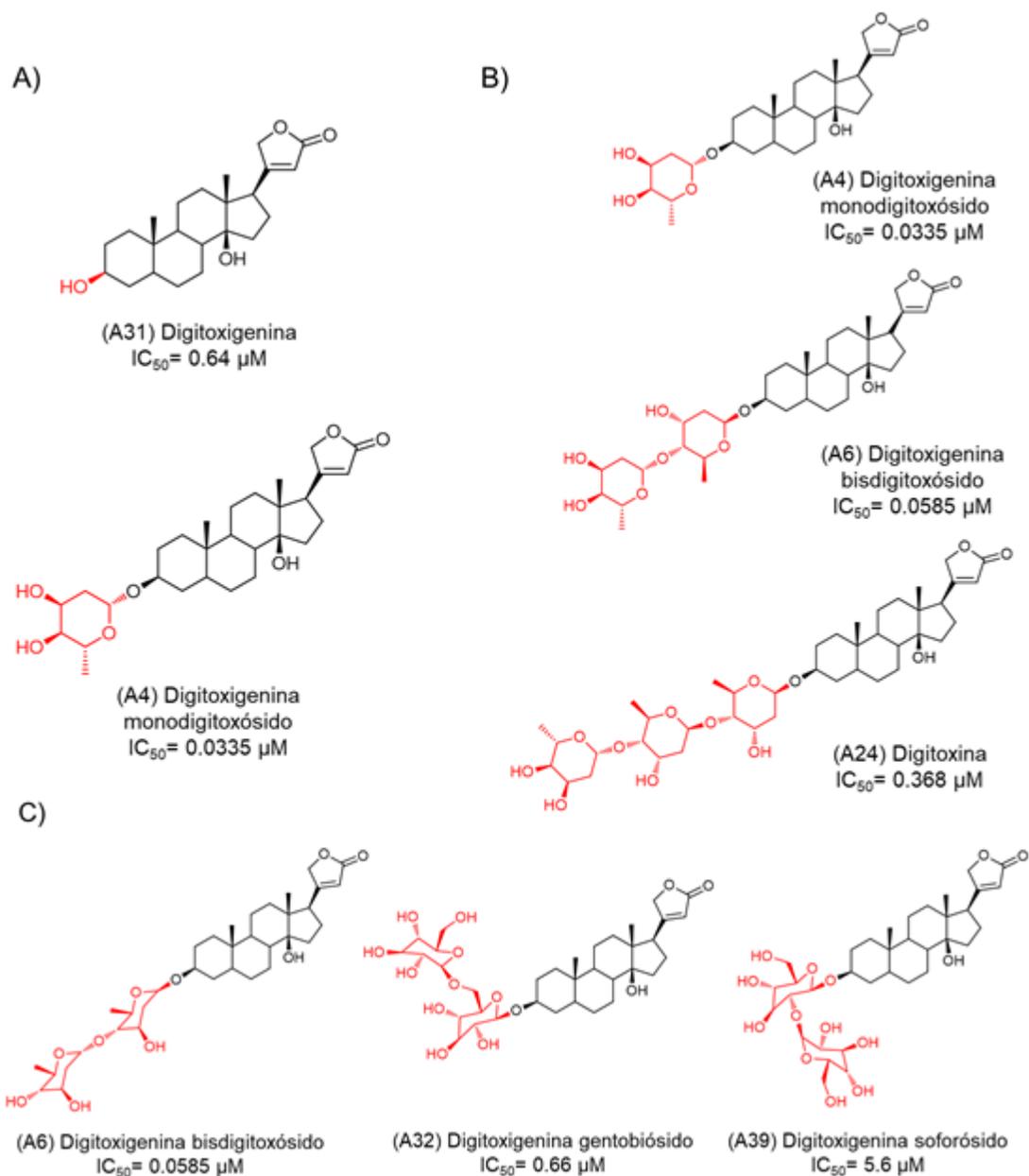
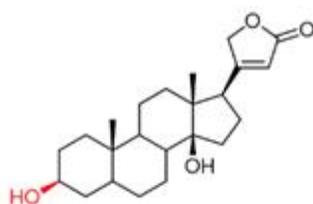
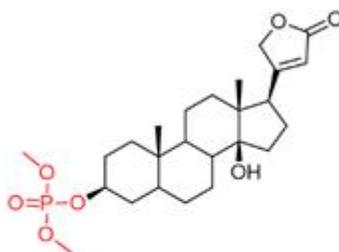


Figura 7. Principales sustituciones del grupo carbohidrato de los cardenólidos *tipo digital*.

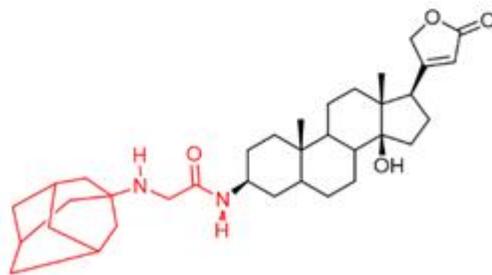
A) Presencia y ausencia del grupo carbohidrato. B) Número de carbohidratos en el carbono 3. C) Sitio de sustitución del segundo grupo carbohidrato. Las estructuras marcadas en color rojo representan la diferencia de las sustituciones entre los cardenólidos.



(A31) Digitoxigenina
 $IC_{50} = 0.64 \mu M$



(A22) Digitoxigenina
3-(fosfato-O-dimetil)
 $IC_{50} = 0.276 \mu M$



(A10) Digitoxigenina 3 β [2-1
(amantadina)-1-on-etilamina]
 $IC_{50} = 0.088 \mu M$

Figura 8. Efecto sobre la actividad antiproliferativa en la línea celular A549 por las sustituciones en la posición C3 de los cardenólidos sintéticos digitoxigenina 3-(fosfato-O-dimetil) y digitoxigenina 3 β [2-(1-amantadina)-1-on-etilamina] en comparación a la digitoxigenina. Las estructuras marcadas en color rojo representan la diferencia de las sustituciones entre los cardenólidos.

Lo anteriormente mencionado sugiere que el residuo de carbohidrato no es del todo esencial para los efectos antiproliferativos de los cardenólidos. No obstante, la presencia de grupos funcionales que actúen como grupos formadores de puentes de hidrógeno, ya sea con función de donadores o aceptores, es esencial para la actividad antiproliferativa encontrada en los compuestos sintéticos.

Para los cardenólidos denominados como *doble enlace*, el sitio de modificación más usual fue la posición C3' ubicada en el residuo de carbohidrato como se muestra en la Figura 9. En dicha posición se encontraron como grupos sustituyentes anillos tiazoles, grupos cetonas, hidroxilos y acetato principalmente. La presencia de anillos tiazol incrementó la actividad antiproliferativa en la línea celular A549 en cardenólidos como la voruscharina (B1) o UNBS 1450 (B2) con valores de IC_{50} de 0.005 y 0.008 μM respectivamente. La presencia de grupos acetato u O-metilo causaron una disminución en la actividad biológica de los cardenólidos.

De la misma manera, la orientación de los grupos hidroxilos en la posición C3' parece producir un efecto sobre la actividad antiproliferativa. Compuestos como la calotropina (B3, 0.013 μM), la cual presenta un grupo hidroxilo en orientación α , mostró tres veces más potencia antiproliferativa que su análogo calactina (B7), la cual tiene un grupo hidroxilo en orientación β con una IC_{50} de 0.039 μM . Por otro lado, las modificaciones en la posición C4' y en otros sitios del carbohidrato son inusuales, y solo el cardenólido calotoxina (B8) presentó un grupo hidroxilo adicional en esta posición. Sin embargo, esta sustitución parece disminuir la citotoxicidad en comparación con los otros compuestos que no presentaron esta modificación. Por otra parte, no se encontraron cardenólidos con modificaciones en la posición C4. Por el contrario, se encontraron sustituciones en la posición C5, principalmente en los cardenólidos *tipo digital*, siendo grupos hidroxilos las moléculas sustituyentes. No obstante, esta sustitución parece no tener alguna relevancia en la actividad antiproliferativa en la línea celular A549. Tampoco se encontraron moléculas con sustituciones en las posiciones C6 a C10 en la base de datos generada en este trabajo.

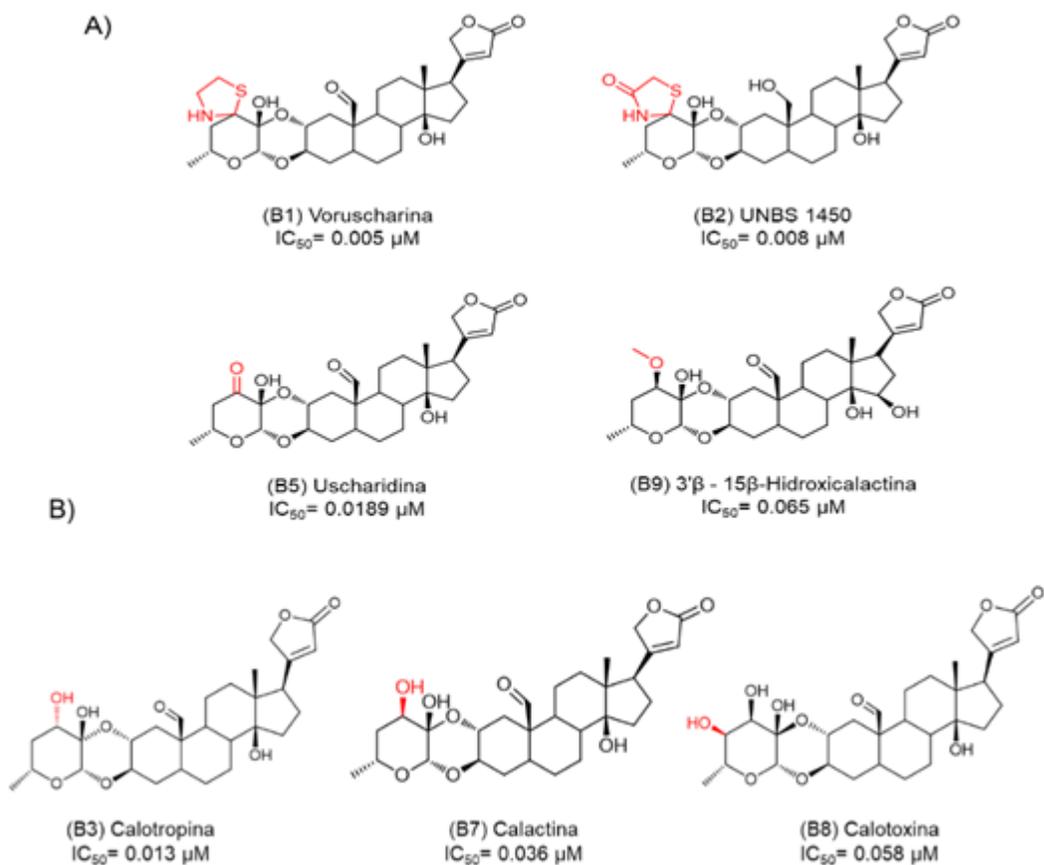


Figura 9. Principales sustituciones observadas en los cardenólidos *tipo doble enlace* y su efecto sobre la actividad antiproliferativa en la línea celular A549. A) Principales modificaciones. B) Diferencia de la actividad antiproliferativa en la línea celular A549 entre los compuestos calotropina, calactina y calotoxina. Las estructuras marcadas en color rojo representan la diferencia de las sustituciones entre los cardenólidos.

En el caso de la posición C11, solo la molécula ouabaína (A1) presentó una sustitución con un grupo hidroxilo en orientación α . Debido a esto, no es posible establecer una asociación con la actividad antiproliferativa. De la misma manera, en el caso de la posición C12, la modificación más frecuente fue la presencia de grupos hidroxilos en orientación β , y generalmente, esta sustitución causó una disminución en la citotoxicidad de estos compuestos. Compuestos como la digoxigenina bidigitoxósido (A14) y la β -metildigoxina (A16) mostraron menor actividad antiproliferativa con valores de IC_{50} de 0.153 y 0.207 μM , en comparación con sus análogos la digitoxigenina bidigitoxósido (A6) y la β -metildigitoxina (A15) con valores de IC_{50} de 0.058 y 0.185 μM respectivamente.

Para el caso de las modificaciones en el anillo D de núcleo esteroidal, las principales modificaciones encontradas fueron en las posiciones C15 y C16 (Figura 10). Las sustituciones más frecuentes fueron la presencia de grupos hidroxilos en orientación β para la posición C15, produciendo una disminución en la actividad antiproliferativa de la línea celular A549. Cardenólidos como la calotropina (B3) y calactina (B7) presentaron mejor actividad antiproliferativa que sus análogos 15 β -hidroxicalotropina (B13) y 15 β -hidroxicalactina (B11), los cuales presentan una modificación en la posición C15, con valores de IC_{50} de 0.013, 0.036 μM y 0.182, 0.127 μM respectivamente. La inclusión del grupo hidroxilo en esta posición produce una caída de la actividad antiproliferativa de aproximadamente 10 veces.

De manera similar a las sustituciones en la posición C15, las modificaciones en la posición C16 afectaron la citotoxicidad de los cardenólidos en la línea celular A549 de manera negativa. Las sustituciones más comunes encontradas en esta posición fueron grupos hidroxilo y acetoxi en orientación α . Moléculas como la 16 α -hidroxiasclepina (B15) con una IC_{50} de 0.24 μM y la 16 α -acetoxiasclepina (B16) con valores de IC_{50} de 0.0316 μM mostraron menor actividad antiproliferativa que la asclepina (B4), la cual presentó un valor de IC_{50} de 0.017 μM . Además, el efecto de los compuestos con grupos hidroxilos fue más débil en comparación con las moléculas que presentaron el grupo acetoxi.

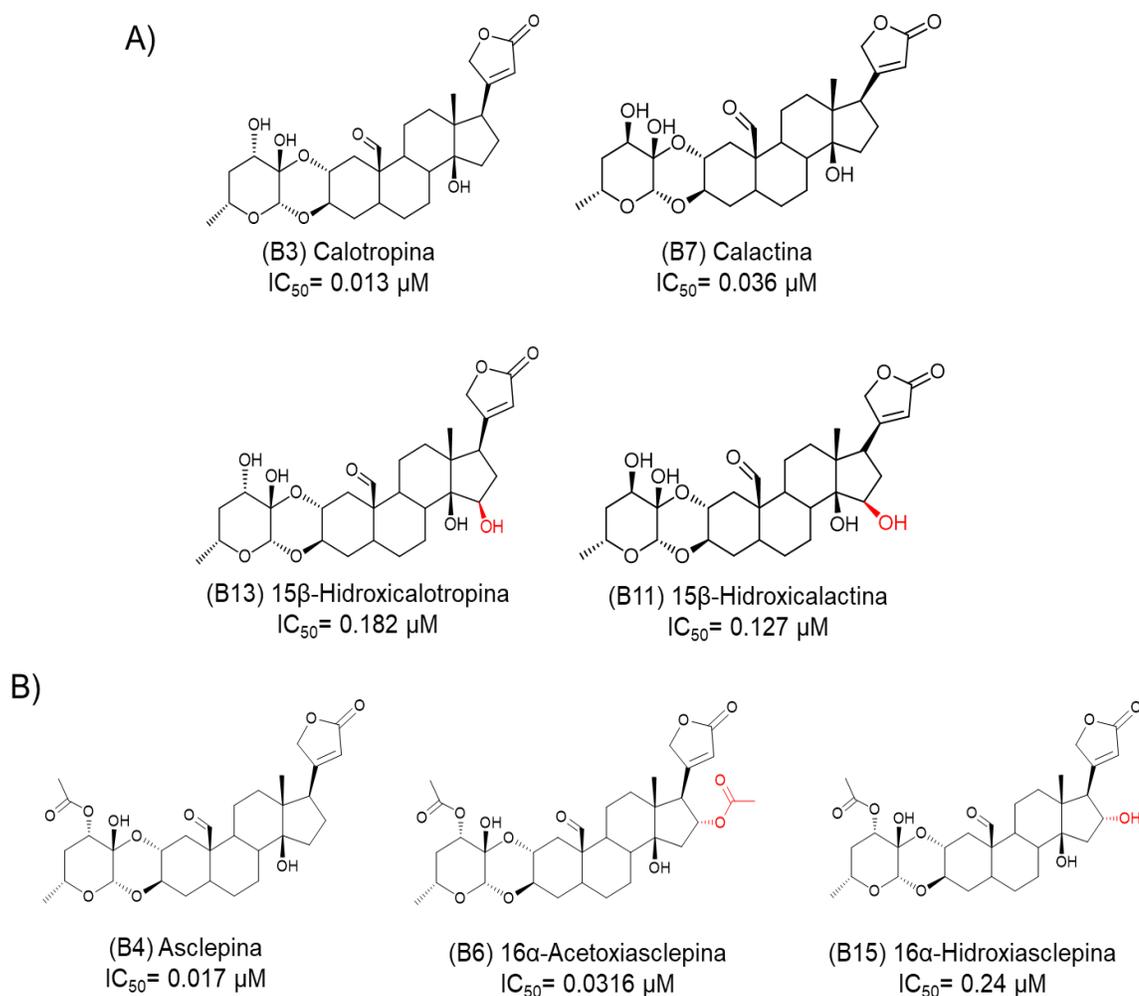


Figura 10. Efectos de las sustituciones en el anillo esteroidal de los cardenólidos sobre la actividad antiproliferativa de la línea celular A549. A) Sustituciones en la posición C15 de los cardenólidos. B) Sustituciones en la posición C16 de los cardenólidos. Las estructuras marcadas en color rojo representan la diferencia de las sustituciones entre los cardenólidos.

Para la posición C19, las modificaciones más usuales fueron la incorporación de los grupos CH₃, CH₂OH y CHO. Algunas moléculas *tipo doble enlace* presentaron grupos CHO en este sitio. Para las moléculas *tipo digital*, las modificaciones fueron más diversas. Sin embargo, estas sustituciones parecen no tener relevancia en la actividad antiproliferativa. Por otro lado, solo un cardenólido manifestó la presencia de dobles enlaces entre los carbonos C16 y C17 y dicho compuesto presentó un valor de IC₅₀ muy alto. No obstante, esta información no es concluyente, debido a la falta de moléculas con esta característica. Otras características como el peso molecular y el número de sustituciones no mostraron un efecto aparente sobre la actividad antiproliferativa. En la Figura 11 se resumen los principales efectos de las diferentes sustituciones de los cardenólidos sobre la actividad antiproliferativa en la línea celular A549.

Análisis de la Relación Estructura-Actividad Cualitativa (QSAR)

Para el desarrollo de los modelos de QSAR se llevaron a cabo análisis de regresión lineal múltiple (MLR). Previamente, 62 descriptores moleculares fueron seleccionados para construir las ecuaciones matemáticas. Inicialmente, se utilizó un set de 58 moléculas para el desarrollo de los modelos matemáticos. Sin embargo, ningún modelo cumplió con los criterios para describir la actividad antiproliferativa de los cardenólidos estudiados en este trabajo. Debido a esto, el set completo fue dividido en 2 grandes grupos de moléculas de acuerdo a su estructura andamio.

Los modelos de QSAR fueron obtenidos con una cantidad máxima de 2 descriptores moleculares por cada ecuación para describir la relación entre la actividad antiproliferativa y la estructura molecular de los cardenólidos. En el caso de las moléculas *tipo digital*, no fue posible encontrar alguna correlación entre la actividad antiproliferativa y los descriptores moleculares usados. Sin embargo, para las moléculas denominadas como *tipo doble enlace* si fue posible generar modelos de QSAR. Los valores calculados para cada descriptor molecular usados para generar las ecuaciones de QSAR son mostrados en la sección de Anexos.

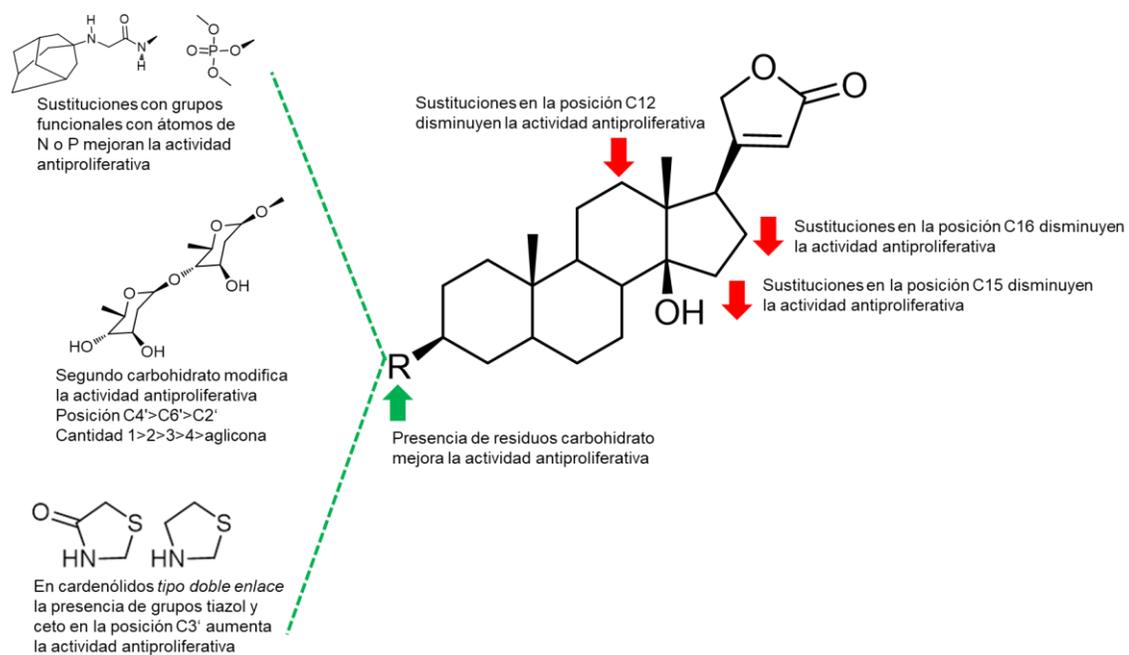


Figura 11. Resumen del análisis de relación estructura-actividad (SAR) de los cardenólidos y la actividad antiproliferativa en la línea celular A549.

Para seleccionar los mejores modelos de regresión lineal se utilizó el criterio establecido por Todeschini et al. (2004), el cual indica que modelos con coeficientes de correlación $R^2 \geq 0.70$ pueden ser considerados como aceptables. Basados en esta observación, como se muestra en la Tabla IV, se seleccionaron 8 posibles modelos QSAR para describir la actividad antiproliferativa de los cardenólidos tipo doble enlace en la línea celular cancerosa humana de pulmón A549.

Posterior a la selección de los modelos anteriormente mencionados, se realizó una validación interna, para considerar cuales de estos posibles modelos podrían ser utilizados para describir la actividad antiproliferativa de la línea celular A549. De estos 8 modelos, solo los modelos B, E, F, G y H fueron considerados adecuados para la validación externa. Dichos modelos presentaron un valor de R^2 de 0.76, 0.75, 0.77, 0.78 y 0.75 respectivamente. Además, estos modelos presentaron valores de IC_{50} predictivos muy similares a los recopilados de la literatura. De acuerdo a ciertos autores como Veerasamy et al. (2011), en las validaciones internas, valores de una $R^2 \geq 0.6$ son considerados apropiados para ser modelos matemáticos con capacidad predictiva. Los resultados de los modelos de QSAR obtenidos de la validación interna pueden ser consultados en la Anexos.

Para formar el set de prueba para la validación externa se obtuvieron 6 moléculas de la literatura con actividad antiproliferativa de la literatura. Este set incluyó los compuestos cardenólidos 6'-hidroxi-16 α -hidroxicalactina, 16 α -hidroxicalactina, 6'-hidroxicalactina, 2''-oxovoruscharina, 6'-dehidroxighalakinósido y 12-dehidroxighalakinósido. La Figura 12 muestra las estructuras químicas de estos compuestos. Los descriptores moleculares previamente mencionados fueron calculados para estas moléculas, y los valores fueron empleados para calcular los valores de IC_{50} predictivos de acuerdo con los modelos de QSAR seleccionados.

Basados en los resultados de los coeficientes de correlación de la validación externa, los modelos F y H cumplieron con valores de R^2 adecuados.

Tabla IV. Modelos QSAR propuestos para los cardenólidos *tipo doble enlace*.

Modelo	Modelo Propuesto
A	-Log (IC ₅₀) = -2.2993 ALogP ² +85.353 Mv -53.357 n=17 RSS=1.778 R=0.87 R ² =0.75 R _{adj} =0.72 RMSE=0.356 F=22.75
B	-Log (IC ₅₀) = -40.8592 JGT -0.6693 LAInd +27.96314 n=17 RSS=1.769 R=0.87 R ² =0.76 R _{adj} =0.72 RMSE=0.355 F=22.17
C	-Log (IC ₅₀) = 3.98306 MLFER _S -0.42373 ETA _α +7.83359 n=17 RSS=1.895 R=0.86 R ² =0.74 R _{adj} =0.70 RMSE=0.36 F=20.2
D	-Log (IC ₅₀) = 4.34186 MLFER _S -1.00955 SHCsatu -15.41199 n=17 RSS=1.803 R=0.86 R ² =0.75 R _{adj} =0.72 RMSE = 0.356 F=21.6
E	-Log (IC ₅₀) = -12.49956 ETA _{EtA} B + 0.20146 DELS -5.80838 n=17 RSS=1.838 R=0.86 R ² =0.75 R _{adj} =0.71 RMSE=0.36 F=21.08
F	-Log (IC ₅₀) = 0.27069 DELS -1.89543 nHBAcc -4.51388 n=17 RSS=1.626 R=0.88 R ² =0.77 R _{adj} =0.74 RMSE=0.34 F=24.7
G	-Log (IC ₅₀) = -13.1563 ETA _{EtA} B +0.2049 DELS ² -5.41881 n=17 RSS=1.623 R=0.88 R ² =0.77 R _{adj} =0.74 RMSE=0.34 F=24.8
H	-Log (IC ₅₀) = -0.58551 LAInd -39.24085 Mi +299.26609 n=17 RSS=1.81 R=0.86 R ² =0.75 R _{adj} =0.71 RMSE=0.359 F=21.5

-Log (IC₅₀): Actividad antiproliferativa de los cardenólidos sobre la línea celular tumoral humana A549. RSS: suma de residuos cuadrados. R: Coeficiente de correlación. R²: Coeficiente de correlación al cuadrado. R_{adj}: Coeficiente de correlación ajustado. RMSE: Suma de la raíz cuadrada del promedio. ALogP²: Coeficiente de partición atómico. Mv: Volumen atómico promedio de Van der Waals. LAInd: Índice de lipoafinidad. JGT: Índice de carga topológica global. ETA_α: Conteo de núcleos de un vértice no hidrógeno. ETA_{EtA}B: Índice de ramificación. SHCsatu: hidrógenos unidos a C en sp³ unidos a C no saturados. Mi: Promedio del primer potencial de ionización. DELS: Suma de las diferencias intrínsecas del estado del átomo. MLFER_S: Polarizabilidad/depolaridad combinada. nHBAcc: Número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno.

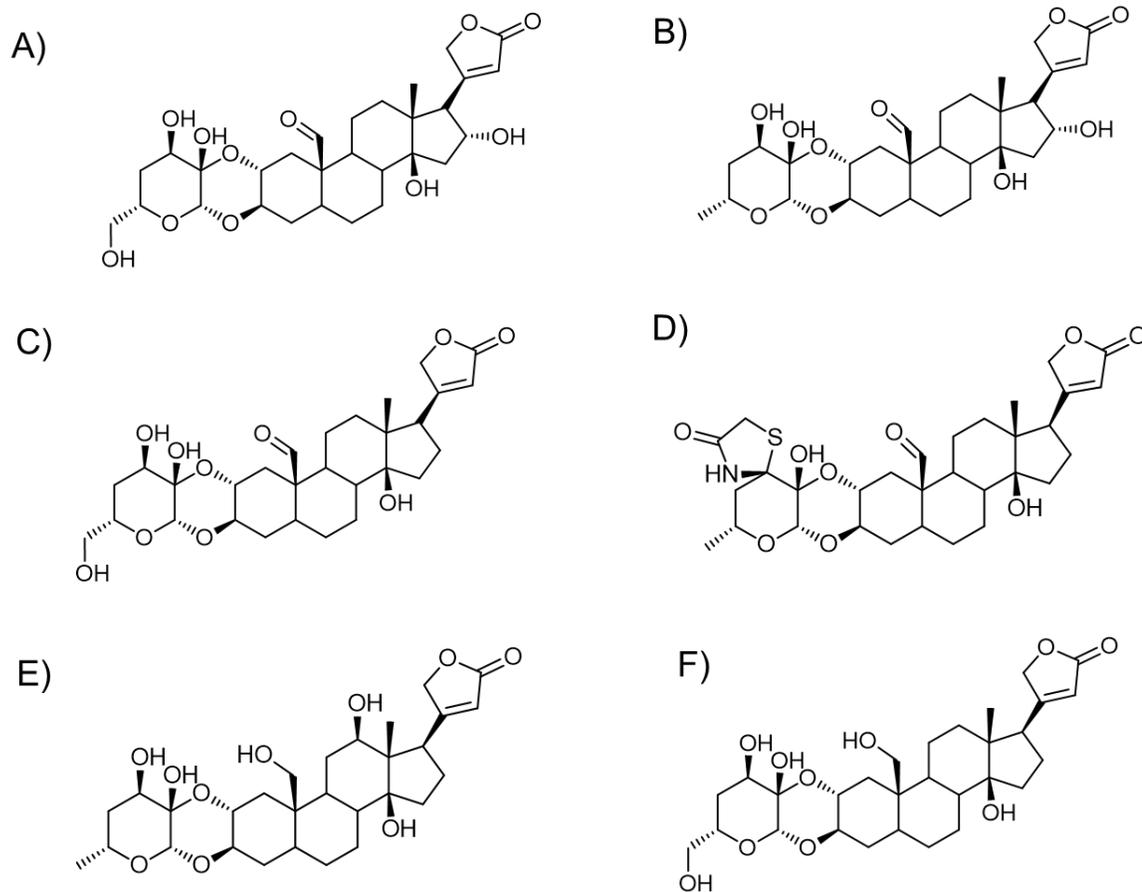


Figura 12. Moléculas utilizadas para la validación externa de los modelos QSAR. A) 6'-hidroxi-16 α -hidroxicalactina. B) 16 α -hidroxicalactina. C) 6'-hidroxicalactina. D) 2''-oxovoruscharina. E) 6'-dehidroxigalaktinósido. F) 12-dehidroxigalaktinósido.

Los modelos de QSAR F y H se muestran enseguida junto con los parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal y su descripción. Los datos de la regresión lineal de estos modelos se muestran en la Figura 13 y en las Tablas V y VI.

$$\begin{aligned} \text{F) } -\text{Log (IC}_{50}\text{)} &= 0.27069 \text{ DELS} - 1.89543 \text{ nHBACC} - 4.51388 \\ n &= 17 \quad \text{RSS} = 1.626 \quad \text{R} = 0.88 \quad \text{R}^2 = 0.75 \quad \text{R}_{\text{adj}} = 0.71 \quad \text{RMSE} = 0.34 \\ \text{F} &= 24.7 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{H) } -\text{Log (IC}_{50}\text{)} &= -0.58551 \text{ LAInd} - 39.24085 \text{ Mi} + 299.26609 \\ n &= 17 \quad \text{RSS} = 1.81 \quad \text{R} = 0.86 \quad \text{R}^2 = 0.75 \quad \text{R}_{\text{adj}} = 0.71 \quad \text{RMSE} = 0.359 \\ \text{F} &= 21.5 \end{aligned}$$

Donde n es el número de moléculas usadas para generar la ecuación, R es el coeficiente de correlación, R^2 es el coeficiente de correlación al cuadrado, R_{adj} es el coeficiente de correlación ajustado, RSS es la suma de residuos cuadrados, RMSE es la suma de la raíz cuadrada del promedio, F es el radio de varianza y $-\text{Log (IC}_{50}\text{)}$ es la actividad antiproliferativa de los cardenólidos en la línea celular cancerosa de pulmón A549.

DELS es un descriptor molecular perteneciente al grupo de los descriptores de estado electro-topológico y tipo de átomo. Este descriptor es una medida de la carga total transferida en la molécula de acuerdo a la composición atómica y puede ser interpretado como la probabilidad de interacción con otras moléculas (Kier y Hall, 1990). nHBACC es un descriptor molecular que representa el número de grupos aceptores para formar puentes de hidrógeno en la molécula (Todeschini y col., 2004). El índice de lipoafinidad (LAInd) es un descriptor molecular que forma parte de la familia de descriptores de estado electro-topológico de tipo de átomo, que engloba la contribución del $\log P_{\text{oct}}$ de los átomos diferentes al nitrógeno y oxígeno. Este descriptor considera la contribución de los átomos de carbono y algunos átomos con baja capacidad para formar puentes de hidrógeno como Cl y F . Finalmente, Mi es un descriptor constitucional que representa la energía primaria de ionización y está relacionado con la naturaleza de los enlaces químicos entre las moléculas (Todeschini y col., 2004).

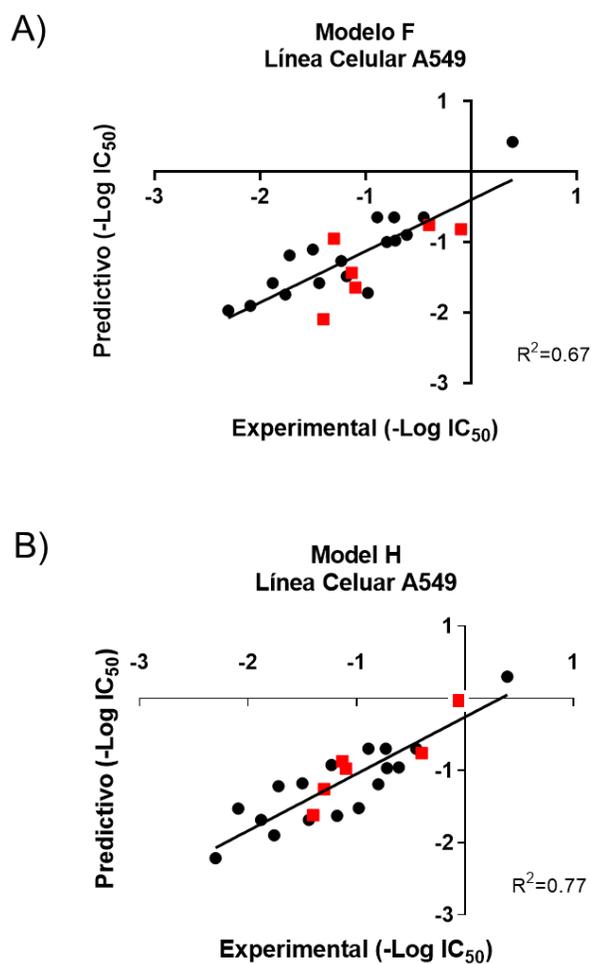


Figura 13. Resultados de la regresión lineal de la validación externa de los modelos QSAR de los cardenólidos *tipo doble enlace*. A) Modelo QSAR F. B) Modelo QSAR H. Los compuestos externos utilizados en la validación externa están marcados como cuadros color rojo.

Tabla V. Valores de $-\text{Log}(\text{IC}_{50})_{A549}$ experimentales y predictivos obtenidos con el modelo F de QSAR.

Molécula	DELS	nHBAcc	$-\text{Log}(\text{IC}_{50})_{A549}$ Experimental	$-\text{Log}(\text{IC}_{50})_{A549}$ Predictivo	Residual
Voruscharina	72.42638	9	-2.3	-1.96765	-0.332346
UNBS 1450	79.67828	10	-2.09	-1.90007	-0.189933
Calotropina	73.86288	9	-1.88	-1.57881	-0.301193
Asclepina	80.2648	10	-1.76	-1.7413	-0.018698
Usscharidina	75.31276	9	-1.72	-1.18634	-0.533661
16 α -Acetoxiasclepina	96.63386	12	-1.5	-1.10122	-0.398779
Calactina	73.86288	9	-1.44	-1.57881	0.1388070
12-Dehidroxighalakinosido*	78.96827	10	-1.398	-2.09226	0.6942587
6'-Dehidroxighalakinosido*	83.1946	10	-1.3	-0.94823	-0.351765
Calotoxina	82.02129	10	-1.23	-1.26584	0.0358370
3 β -metoxi-15 β -hidroxicalactina	81.22442	10	-1.18	-1.48154	0.3015417
2''-Oxovoruscharina*	81.40642	10	-1.13	-1.43228	0.3022766
6'-Hidroxicalactina*	80.63345	10	-1.097	-1.64151	0.5445102
Usscharina	73.35353	9	-0.98	-1.71668	0.7366829
15 β -Hidroxicalactina	84.31099	10	-0.89	-0.64604	-0.243961
15 β -Hidroxiusscharina	83.01786	10	-0.8	-0.99608	0.1960754
15 β -Hidroxicalotropina	84.31099	10	-0.73	-0.64604	-0.083961
16 α -Acetoxicalotropina	90.09339	11	-0.72	-0.97623	0.2562302
16 α -Hidroxiasclepina	90.3967	11	-0.61	-0.89413	0.2841272
Afrósido	84.31099	10	-0.45	-0.64604	0.1960381
16 α -Hidroxicalactina*	83.91331	10	-0.398	-0.75369	0.3556872
6'-Hidroxi-16 α -hidroxicalactina*	90.6898	11	-0.097	-0.81479	0.7177874
12,16-Dihidroxicalotropina	95.26818	11	0.39	0.424534	-0.034533

Los valores predictivos y experimentales de IC_{50} están expresados en $-\text{Log}(\text{IC}_{50})$. Los valores experimentales de las moléculas fueron obtenidos de la literatura. Los compuestos usados como set de validación externo están marcados con (*).

Tabla VI. Valores de $-\text{Log}(\text{IC}_{50})_{A549}$ experimentales y predictivos obtenidos con el modelo H de QSAR.

Moléculas	LAind	Mi	$-\text{Log}(\text{IC}_{50})_{A549}$ Experimental	$-\text{Log}(\text{IC}_{50})_{A549}$ Predictivo	Residual
Voruscharina	4.82804	7.61078	-2.3	-2.21425	-0.085747
UNBS 1450	3.22732	7.61718	-2.09	-1.52816	-0.561844
Calotropina	3.06467	7.62359	-1.88	-1.68446	-0.195543
Asclepina	3.58636	7.62127	-1.76	-1.89887	0.1388725
Usscharidina	3.18645	7.60993	-1.72	-1.21973	-0.50027
16 α -Acetoxiasclepina	2.08845	7.62523	-1.5	-1.17723	-0.322775
Calactina	3.06467	7.62359	-1.44	-1.68446	0.2444565
12-Dehidroxighalakinosido*	1.658436	7.642964	-1.398	-1.62136	0.2233640
6'-Dehidroxighalakinosido*	1.036251	7.642964	-1.3	-1.25707	-0.042931
Calotoxina	1.31907	7.63031	-1.23	-0.92609	-0.303911
3 β -metoxi-15 β -hidroxicalactina	2.40622	7.63199	-1.18	-1.62855	0.4485506
2"-Oxovoruscharina*	2.958757	7.604516	-1.13	-0.87398	-0.256019
6'-Hidroxicalactina*	1.404553	7.630311	-1.097	-0.97618	-0.120824
Usscharina	4.51544	7.59781	-0.98	-1.52227	0.5422678
15 β -Hidroxicalactina	0.93002	7.63031	-0.89	-0.6983	-0.191703
15 β -Hidroiuscharina	2.65157	7.61718	-0.8	-1.19105	0.3910485
15 β -Hidroxicalotropina	0.93002	7.63031	-0.73	-0.6983	-0.031703
16 α -Acetoxicalotropina	1.573	7.62762	-0.72	-0.96921	0.2492095
16 α -Hidroxiasclepina	1.55316	7.62762	-0.61	-0.95759	0.3475929
Afrósido	0.93002	7.63031	-0.45	-0.6983	0.2482961
16 α -Hidroxicalactina*	1.03613	7.630311	-0.398	-0.76046	0.3624608
6'-Hidroxi-16 α -hidroxicalactina*	-0.62522	7.636864	-0.097	-0.04485	-0.052146
12,16-Dihidroxicalotropina	-1.20898	7.63686	0.39	0.297082	0.0929178

Los valores predictivos y experimentales de IC_{50} están expresados en $-\text{Log}(\text{IC}_{50})$. Los valores experimentales de las moléculas fueron obtenidos de la literatura. Los compuestos usados como set de validación externo están marcados con (*).

De acuerdo a los modelos de QSAR, la hidrofobicidad y la capacidad de formar interacciones tipo puente de hidrógeno son esenciales para describir la actividad antiproliferativa de estos compuestos sobre la línea celular tumoral de pulmón humano A549. Además, los modelos generados durante el análisis de relación estructura-actividad cuantitativa tienen una calidad estadística y potencial predictivo aceptables.

Considerando el modelo F, las moléculas con un alto número de átomos electronegativos, principalmente grupos funcionales con átomos de oxígeno mostraron una menor actividad antiproliferativa. Compuestos como la calotropina (B3) con un valor de DELS de 73.8 mostraron mejor actividad antiproliferativa ($IC_{50} = 0.0013 \mu M$) que moléculas como la calotoxina (B8), 15 β -hidroxicalotropina (B13) y la 12,16-dihidroxicalotropina (B17) con valores de DELS de 82.0, 84.0 y 95.0, así como valores de IC_{50} de 0.058, 0.182 y 2.48 μM , respectivamente.

En el caso del descriptor nHBAcc, la presencia de este descriptor en los modelos de QSAR indican que las moléculas con menos grupos aceptores para formar puentes de hidrógeno presentan mejor actividad antiproliferativa. El cardenólido calotropina (B3) presenta 9 átomos con posibilidad de formar puentes de hidrógeno en comparación con la molécula calotoxina (B8), 15 β -hidroxicalotropina (B13) y 12, 16-dihidroxicalotropina (B17) con un mayor número de átomos aceptores con posibilidad de formar puentes de hidrógeno.

Por otro lado, el modelo H indica que las moléculas con altos valores de índice de lipoafinidad presentaron mejores actividades antiproliferativas. Asclepina (B4, 0.017 μM) presentan mejor actividad antiproliferativa que el compuesto 16 α -acetoxiasclepina (B6, 0.031 μM) y 16 α -hidroxiasclepina (B15, 0.24 μM) con valores de LAInd de 3.58, 0.93 y 1.2, respectivamente. Otros compuestos como la calotropina (B3, 0.013 μM), 15 β -hidroxicalotropina (B13, 0.182 μM) y 12,16-dihidroxicalotropina (B17, 2.48 μM) muestran el mismo comportamiento con valores de LAInd de 3.06, 0.93 y 1.2, respectivamente. En el caso del descriptor molecular Mi, un bajo número de átomos con alto potencial de ionización puede beneficiar la actividad antiproliferativa. El compuesto

12,16-dihidroxicatropina (B17) presenta un valor de M_i de 7.636864, tiene 2 grupos hidroxilos en su estructura y es 290 veces menos activa que su análogo catropina (B3) con valores de M_i de 7.62359. Debido a la similitud estructural de los cardenólidos tipo doble enlace, los valores de M_i son muy similares, sin embargo, la diferencia es suficiente para ser usado como descriptor molecular.

Ambos modelos muestran que los grupos funcionales capaces de participar como aceptores en la formación de puentes de hidrógeno son esenciales para la actividad antiproliferativa de estos cardenólidos. Sin embargo, un excesivo número de estos grupos contribuye de manera negativa en la actividad antiproliferativa. Una disminución en los átomos electronegativos también tiene un impacto en el carácter hidrofóbico de la molécula, la cual puede mejorar la actividad antiproliferativa.

Los estudios de relación estructura-actividad son considerados necesarios en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos en contra de diferentes afecciones tales como el cáncer. La información de SAR en los compuestos cardenólidos es debatible o confusa. Este trabajo está enfocado en el estudio de cardenólidos identificados en especies de la familia Apocynaceae y sus efectos citotóxicos en la línea celular A549. Los resultados muestran que el residuo carbohidrato en la posición C3 de los cardenólidos induce la modulación más importante en el efecto antiproliferativo en las células de cáncer de pulmón humano. Además, los compuestos semisintéticos con grupos amino o fosfato en la posición C3 mostraron efectos antiproliferativos, pero no tan efectivos como los observados con la unión del carbohidrato.

Solo una unidad de carbohidrato es considerada necesaria para la mejora de la actividad antiproliferativa. La incorporación de más grupos de carbohidratos en diferentes posiciones contribuye negativamente a la inhibición de la proliferación celular por los cardenólidos. Por otro lado, algunas modificaciones en los cardenólidos tipo doble enlace en la posición C3' como anillos tiazol, grupos hidroxilo y grupos carbonilo aumentan la actividad antiproliferativa de algunos compuestos. Es importante señalar que los grupos previamente mencionados pueden actuar como aceptores de puente de hidrógeno. Los

resultados obtenidos en el análisis SAR resaltan la importancia de los sustituyentes con la capacidad de formar puentes de hidrógeno en la posición C3 del cardenólido. De acuerdo con los modelos de QSAR obtenidos en el análisis realizado, la presencia de heteroátomos en la estructura de los cardenólidos es fundamental para que las moléculas tengan un efecto biológico en la línea celular. Los descriptores moleculares DELS, Mi y nHBAcc indican la importancia de los grupos funcionales con heteroátomos para incrementar la probabilidad de interactuar el sitio de unión del blanco farmacológico, lo que coincide con el hecho de la presencia de sobreexpresión de la proteína Na^+/K^+ -ATPasa en células tumorales humanas, la cual es considerada el principal blanco farmacológico de los compuestos cardiotónicos (Newman et al., 2008).

Como se mencionó previamente, los cardenólidos son inhibidores de la proteína transmembrana Na^+/K^+ -ATPasa. Estudios con ouabaína y la Na^+/K^+ -ATPasa reportan que algunos componentes estructurales como los grupos hidroxilos del residuo de carbohidrato son considerados esenciales para establecer el complejo enzima-cardenólido gracias a la función de aceptores de puentes de hidrógeno con los aminoácidos del sitio extracelular (Yatime et al., 2011). Zhang et al. (2007) evaluó un grupo de cardiotónicos aislados de la planta *Streptocaulon griffithi* donde reportó que la glucosilación en la posición C3 era crucial para el potente efecto inhibitorio en el crecimiento celular. Esta observación es similar a la propuesta por Cao et al. (2018) el cual reportó que la presencia de diferentes grupos de carbohidrato juega un rol importante en la actividad antiproliferativa en contra de las líneas celulares cancerosas de un grupo de cardenólidos aislados de la planta *Nerium oleander*. Khatri et al. (2019) reportó que el residuo carbohidrato en la posición C3 de los derivados de la ouabagenina son importantes para desempeñar su actividad citotóxica y la modificación de esta afecta la actividad antiproliferativa en líneas celulares HEK293T y HeLa.

En contraste, autores como Mijatovic et al. (2012) sostienen la idea que el carbohidrato en la posición C3 es importante para causar un efecto en la línea celular, pero no es fundamental para la unión de los cardenólidos con el blanco farmacológico. De acuerdo con este hecho, la presencia de grupos sustituyentes con la capacidad de actuar

como aceptores/donadores de puentes de hidrógeno en los cardenólidos en lugar del grupo carbohidrato favorece la actividad antiproliferativa observada sobre la línea celular A549. Autores como Melero et al. (2000) reportan que cardenólidos semisintéticos con sustituciones como grupos éster, alcoholes, ácidos carboxílicos, cetonas, o amidas en la posición C3 tienen potentes efectos cardiotónicos, debido a la interacción con aminoácidos presentes en el sitio de unión.

Lo mencionado anteriormente concuerda con el resultado del coeficiente negativo para el descriptor molecular Mi en el modelo H de QSAR. La presencia de átomos con fuerte potencial de ionización como N, S y O pueden facilitar las interacciones para estabilizar los complejos entre el sitio de unión de la enzima y los cardenólidos. Algunos ejemplos de esto son los compuestos voruscharina y UNBS 1450 los cuales tienen un anillo tiazol en la posición C3'. Es importante resaltar que la incorporación de este anillo mejora la actividad antiproliferativa comparada con calotropina que contiene un grupo OH en la misma posición. También es importante considerar que la incorporación de más carbohidratos puede afectar el efecto antiproliferativo de los cardenólidos. Estudios con cardenólidos aislados de la planta *Thevetia peruviana* mostraron que el incrementar el número de carbohidratos disminuye la actividad antiproliferativa de los cardenólidos sobre las líneas celulares (Tian et al., 2015). Autores como Pessoa et al. (2018) mencionan que el número y tipo de carbohidrato pueden modificar la afinidad de unión de los cardenólidos con la Na⁺/K⁺-ATPasa. Esto encaja con los resultados obtenidos en los modelos de QSAR, donde un limitado número de átomos polarizables y los aceptores de puentes de hidrógeno son necesarios para la actividad antiproliferativa. Un incremento en la cantidad de heteroátomos electronegativos y por ende un aumento en la cantidad de grupos aceptores de puentes de hidrógeno contribuyen negativamente a la actividad antiproliferativa.

Por otro lado, con respecto a la posición de las sustituciones dentro del grupo esteroidal, los resultados del análisis SAR muestran que las modificaciones en los anillos esteroidales, en particular en las posiciones 15 y 16 disminuyen la actividad antiproliferativa de los cardenólidos. Estudios realizados por Mijatovic et al. (2012)

concluyeron que la presencia de dobles enlaces, grupos hidroxilos y acetoxi en el anillo D no son beneficiosos para los efectos citotóxicos de las moléculas. Esto es reforzado por estudios realizados por Banuls et al. (2013), el cual concluyó que la presencia de grupos polares en las posiciones C15 y C16 no son favorables para los efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer humanos y murinos, posiblemente debido a un efecto estérico o por fuerzas de repulsión. Asimismo, estudios relacionados con la afinidad de cardenólidos con la Na^+/K^+ -ATPasa llevados a cabo por Weiland et al. (1995) demostraron que la introducción de grupos hidroxilos adicionales en el núcleo esteroidal reduce la afinidad de unión de cardenólidos con la proteína, posiblemente a la presencia de grupos funcionales candidatos a formar puentes de hidrógeno causando fuerza de repulsión dentro del sitio de unión.

Considerando lo anteriormente mencionado, el coeficiente negativo del descriptor LAind obtenido en el modelo H del análisis de QSAR concuerda con estas teorías. Los valores del descriptor LAind consideran la presencia de átomos diferentes a N u O, principalmente los átomos de carbono y otros con baja capacidad de formar interacciones por puente de hidrógeno incrementan la lipoafinidad de las moléculas (Liu et al., 2001). En contraste a la presencia de grupos hidroxilos en el residuo carbohidrato, su presencia en el anillo esteroidal disminuye la actividad antiproliferativa en la línea celular A549. Adicionalmente, se sabe que un número significativo de residuos de carbohidrato aumenta propiedades como la hidrofiliidad y la solubilidad de los compuestos cardiotónicos (El-Seedi et al., 2019). Cornelius et al. (2013) describe que en el caso del cardenólido ouabaína, el número de grupos hidroxilos no afecta su capacidad para interactuar con la Na^+/K^+ -ATPasa, sin embargo, un número excesivo de estos sustituyentes, en específico, en el anillo esteroidal puede ser no favorable para una unión adecuada de los cardenólidos con la enzima.

En resumen, la actividad antiproliferativa de los cardenólidos sobre la línea celular A549 puede ser descrita por los modelos F y H del análisis de QSAR, siendo la capacidad de tener sustituyentes que actúen como aceptores de puentes de hidrógeno, las características lipofílicas y el número de átomos electronegativos de los cardenólidos tipo

doble enlace características importantes para facilitar la interacción de los compuestos con el blanco farmacológico. Por otro lado, los cardenólidos deberían de tener un número limitado de grupos hidroxilos en la estructura cercana al grupo carbohidrato, además de preferencia mantener libres de estos sustituyentes los carbonos de los anillos C y D para producir mejores efectos antiproliferativos de acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de SAR y QSAR.

Modelado Molecular

Validación de *Docking* Molecular

Para validar la metodología utilizada en la obtención de los modelos moleculares de los cardenólidos obtenidos de *Asclepias subulata* y la proteína Na⁺/K⁺-ATPasa se llevó a cabo una validación por medio de un *docking* molecular entre la molécula co-cristalizada ouabaína y la estructura cristalográfica de la Na⁺/K⁺-ATPasa (4HYT).

Dentro de los resultados obtenidos para el ligando de referencia se generaron aproximadamente 30 posibles modelos de interacción, de los cuales la pose 2 fue seleccionada como el mejor modelo para ouabaína, esto basado en su valor de RMSD (1.067 Å) y de energía de interacción (-9.6539 Kcal/mol). Como se muestra en el mapa de interacción 2D de la Figura 14, el modelo de validación para el ligando de referencia ouabaína (estructura en color blanco) presentó interacciones del tipo hidrofóbicas y tipo puente de hidrógeno muy similares a las que se reportan en la estructura cristalográfica. En el caso de los puentes de hidrógeno se puede remarcar la interacción del residuo Thr⁷⁹⁷ con el grupo hidroxilo β en la posición C14, la interacción entre el aminoácido Gln¹¹¹ y el grupo hidroxilo β en la posición C19 y el grupo hidroxilo β de la posición C1, así como la formación del puente de hidrógeno entre el aminoácido Asn¹²² y el grupo hidroxilo β de la posición C1.

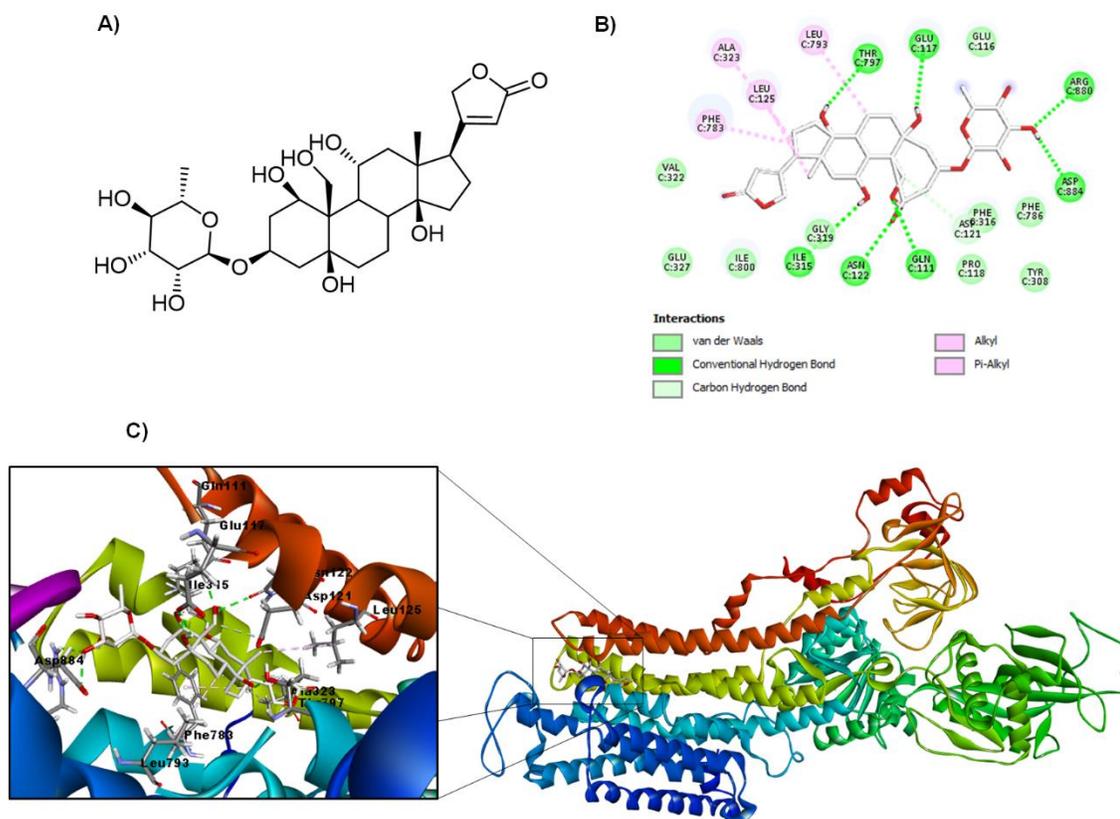


Figura 14. *Docking* molecular del ligando de referencia ouabaína usado en el modelo molecular con el receptor Na^+/K^+ -ATPasa (PDB 4HYT). A) Estructura química de la ouabaína. B) Mapa de interacción 2D del ligando de referencia ouabaína (blanco) con el receptor Na^+/K^+ -ATPasa. C) Modelo molecular del ligando de referencia ouabaína con el receptor Na^+/K^+ -ATPasa. Los puentes de hidrógeno están marcados como líneas intermitentes color verde. Las interacciones hidrofóbicas están marcadas como líneas intermitentes color rosa.

Este modelo de validación también presentó otros puentes de hidrógeno con diferentes residuos de aminoácidos como el formado por la Ile³¹⁵ con el grupo hidroxilo β de la posición C11 y las interacciones entre los aminoácidos Asp⁸⁸⁴ y Arg⁸⁸⁰ con el grupo hidroxilo β de la posición C3' del residuo carbohidrato.

Por otro lado, este modelo mostró una variedad de interacciones hidrofóbicas, de las cuales podemos remarcar la interacción alquil del aminoácido Phe⁷⁸³ con los anillos esteroidales B y D, la interacción entre el residuo Leu¹²⁵ con el grupo metilo de la posición C18, el aminoácido Ala³²³ con el anillo esteroideal D y el aminoácido Phe³¹⁶ con el grupo metilo de la posición C6' del grupo carbohidrato. De acuerdo con el ligando ouabaína de la estructura cristalográfica de la Na⁺/K⁺-ATPasa (Laursen et al., 2013), este cardenólido presentó los mismos puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Thr⁷⁹⁷ y el OH β -C14, así como las interacciones entre la Gln¹¹¹ y Glu¹¹⁷ con el grupo OH β -C19 y el grupo OH-C5, respectivamente. Aunado a esto, este compuesto presenta interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos Phe⁷⁸³ y el anillo D, Leu¹²⁵ y el grupo metilo de C18 y la Leu⁷⁹³ y el anillo B del núcleo esteroideal de la ouabaína. Comparando las interacciones presentes en el modelo molecular de validación con las interacciones presentes en la estructura cristalográfica podemos considerar que ambos modelos son similares en el posicionamiento de la estructura y en el tipo de interacciones presentes en estas por lo que se puede concluir que el modelo de validación para ouabaína y las condiciones utilizadas para llevar a cabo los modelos moleculares son aceptables y de confianza para el desarrollo de nuestro trabajo.

Modelos Moleculares de los Cardenólidos Aislados de *Asclepias subulata* con la Na⁺/K⁺-ATPasa.

Modelo Molecular de Calotropina y 12,16-Dihidroxicalotropina

Posterior a la validación de las condiciones para llevar a cabo los modelos de interacción, para esto, se realizaron los *docking* moleculares entre la estructura de la Na⁺/K⁺-ATPasa y los cardenólidos aislados de *A. subulata*, siendo estos utilizados como ligandos bajo las mismas condiciones utilizadas en el *docking* molecular de validación con ouabaína.

La primera molécula utilizada como ligando fue el cardenólido calotropina, el cual generó aproximadamente 23 posibles modelos, de las cuales, la mejor opción basados en su valor de RMSD y energía de unión fue el modelo número 7. Dicha pose mostró un valor de RMSD de 1.05 Å y una energía de unión de -7.2007 Kcal/mol. Como indica el mapa de interacción 2D de la Figura 15, el ligando calotropina puede interactuar con el receptor gracias a algunas interacciones como los puentes de hidrógeno, de los cuales podemos resaltar la interacción entre el aminoácido Thr⁷⁹⁷ con el grupo hidroxilo β de la posición C14 del cardenólido, así como la interacción con el residuo Gln¹¹¹ y el grupo aldehído de la posición C19. Dichas interacciones están presentes en la estructura cristalográfica de la Na⁺/K⁺-ATPasa con el ligando de referencia ouabaína. Otra observación fue el puente de hidrógeno formado entre el grupo hidroxilo β de la posición C3' y el aminoácido extracelular Glu¹¹⁶.

Por otro lado, el modelo muestra varias interacciones hidrofóbicas, entre las cuales destaca el enlace formado entre el residuo Phe⁷⁸³ con los anillos esteroidales B y D de la molécula, la interacción π-alquil entre el aminoácido Phe⁷⁸⁶ y el grupo metilo de la posición C6' y la interacción tipo alquil entre el aminoácido Leu¹²⁵ y el grupo metilo de la posición C18. Cabe resaltar que estas interacciones hidrofóbicas también están presentes en el complejo ouabaína - Na⁺/K⁺-ATPasa.

Para el ligando 12,16-dihidroxicatropina se generaron aproximadamente 24 posibles conformaciones con el receptor, de las cuales la pose 1 fue seleccionada de acuerdo a su valor de RMSD (1.6 Å) y su energía de unión (-9.2856 Kcal/mol). Como se observa en el mapa de interacción 2D de la Figura 16, el ligando 12,16-dihidroxicatropina puede interactuar con el sitio activo del receptor con algunos tipos de interacciones, acentuando las interacciones hidrofóbicas, principalmente la interacción π-alquil entre el aminoácido Phe⁷⁸³ y el anillo esteroide B del cardenólido y la interacción π-σ con el grupo metilo de la posición C18. Comparando este modelo con el ligando de referencia y su análogo calotropina podemos señalar que ambas moléculas presentaron una interacción hidrofóbica con el mismo aminoácido y el anillo B del núcleo esteroide

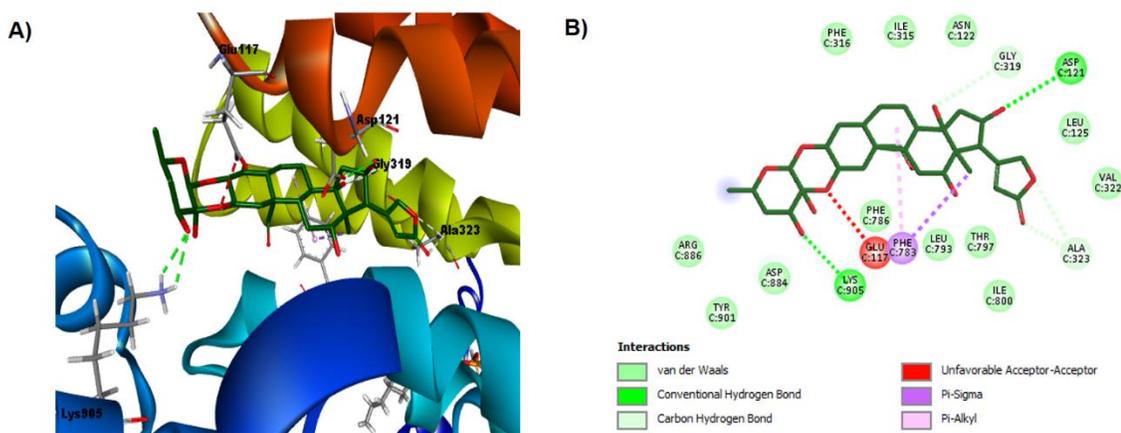


Figura 16. *Docking* molecular de la Na^+/K^+ -ATPasa y el ligando 12,16-dihidroxicardenólido (verde). A) Modelo molecular del cardenólido 12, 16-dihidroxicardenólido y la Na^+/K^+ -ATPasa. B) Mapa de interacción 2D del cardenólido 12, 16-dihidroxicardenólido como ligando y la Na^+/K^+ -ATPasa como receptor. Los puentes de hidrógeno están marcados con líneas intermitentes color verde. Las interacciones hidrofóbicas están marcadas con líneas color rosa y púrpura. Las interacciones no favorables están marcadas con líneas intermitentes color rojo.

similar a la de este compuesto, lo cual podría implicar que este residuo podría ser importante para la interacción de cardenólidos con el sitio activo de la Na^+/K^+ -ATPasa.

En el caso de los puentes de hidrógeno este modelo mostró que la molécula puede interaccionar con el aminoácido Asp¹²¹ y el grupo hidroxilo de la posición C16, además, puede formar un puente de hidrógeno entre el residuo Lys⁹⁰⁵ y el hidroxilo α de la posición C3'. Cabe destacar que este modelo presentó una interacción no favorable con el aminoácido Glu¹¹⁷ y uno de los oxígenos del enlace éter. Aunado a esto, es de resaltar que las interacciones por puente de hidrógeno de esta molécula fueron diferentes a las presentadas por el análogo calotropina y el ligando de referencia ouabaína, principalmente por las diferencias estructurales de los compuestos, sin embargo, podemos inferir que tal vez la función de los puentes de hidrógeno sería la de estabilizadores del complejo ligando-receptor.

Modelos Moleculares de Corotoxigenina 3-O-Glucopiranosido y Desglucouzarina

En el caso del cardenólido corotoxigenina 3-O-glucopiranosido se generaron 27 posibles conformaciones con el receptor, de las cuales la pose 1 fue seleccionada conforme a sus valores de RMSD y energía de unión, los cuales fueron de 1.225 Å y -9.2133 Kcal/mol, respectivamente. Como se observa en el mapa de interacción 2D la Figura 17, el ligando corotoxigenina 3-O-glucopiranosido (estructura naranja) puede interaccionar con diversos residuos de aminoácidos del sitio activo. Dentro de estas interacciones podemos destacar los puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Thr⁷⁹⁷ con el grupo hidroxilo β de la posición C14, la interacción entre el residuo Gln¹¹¹ y el grupo aldehído de la posición C19 y la formación de los enlaces entre los aminoácidos Glu¹¹⁶ y Glu³¹² con los grupos hidroxilos de las posiciones C3' y C6' respectivamente. De acuerdo con nuestro ligando de referencia 3 de los 4 puentes de hidrógeno del complejo ouabaína- Na^+/K^+ -ATPasa están presentes en nuestro modelo, esto debido a la similitud estructural entre la corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y la ouabaína.

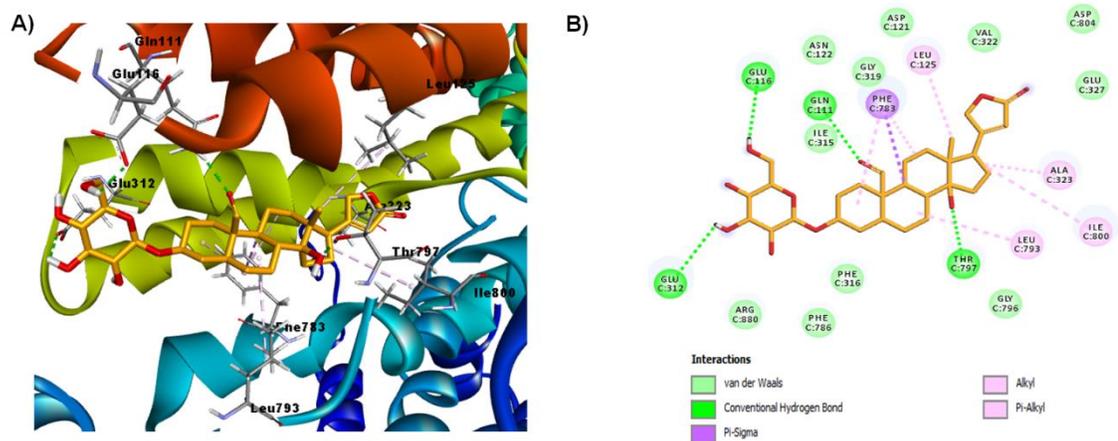


Figura 17. *Docking* molecular de la Na⁺/K⁺-ATPasa y el ligando corotoxigenina 3-O-glucopiranosido (naranja). A) Modelo molecular del cardenólido corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y la Na⁺/K⁺-ATPasa. B) Mapa de interacción 2D del cardenólido corotoxigenina 3-O-glucopiranosido como ligando y la Na⁺/K⁺-ATPasa como receptor. Los puentes de hidrógeno están marcados con líneas intermitentes color verde. Las interacciones hidrofóbicas están marcadas con líneas color rosa y púrpura.

Además de las interacciones tipo puente de hidrógeno previamente mencionadas, el ligando corotoxigenina 3-O-glucopiranosido presentó una serie de interacciones hidrofóbicas, entre las cuales podemos señalar la interacción π - σ del aminoácido Phe⁷⁸³ con el anillo esteroidal B y las interacciones π -alquil con los anillos esteroidales A y C. Otras interacciones que se manifestaron en el modelo fue la interacción entre el residuo de Leu¹²⁵ con el grupo metilo de la posición C18, la interacción del anillo esteroidal B con el aminoácido Leu⁷⁹³ y los enlaces de la Ala³²³ e Ile⁸⁰⁰ con la estructura del ciclopentano (anillo esteroidal D). A excepción de la interacción entre la Ile⁸⁰⁰, casi todas las interacciones hidrofóbicas coinciden con las interacciones presentadas por la ouabaína en la estructura cristalográfica y en los modelos de validación, lo cual incrementa la posibilidad de que este compuesto genere un complejo ligando-receptor estable.

En el caso de las interacciones hidrofóbicas podemos resaltar la interacción π -alquil entre el aminoácido Phe⁷⁸³ con el anillo esteroidal A y B. También la interacción tipo alquil formada entre el residuo Leu¹²⁵ y el grupo metilo de la posición C18 y las interacciones entre los aminoácidos Ala³²³ e Ile⁸⁰⁰ con el anillo esteroidal D. Comparando las interacciones presentes entre el modelo molecular del ligando desglucouzarina con la ouabaína se puede observar que ambas moléculas presentan interacciones similares con los mismos aminoácidos, lo cual indica que este compuesto podría formar un complejo ligando-receptor similar al que forma la ouabaína con la Na⁺/K⁺-ATPasa.

El último cardenólido evaluado como ligando fue el compuesto desglucouzarina. Para este ligando se obtuvieron aproximadamente 30 posibles conformaciones, de estas la pose número 9 fue seleccionada de acuerdo a su valor de RMSD (1.984 Å) y su energía de unión (-7.6226 Kcal/mol). De acuerdo al mapa de interacción 2D de la Figura 18, el ligando desglucouzarina (estructura púrpura) presentó interacciones principalmente del tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas con el receptor.

Es de resaltar que este ligando solo puede formar 2 posibles puentes de hidrógeno, estos fueron entre el residuo de Thr⁷⁹⁷ y el grupo hidroxilo en orientación β de la posición C14 y la interacción formada entre el aminoácido Glu¹¹⁶ y el grupo hidroxilo β de la posición C6' del residuo carbohidrato.

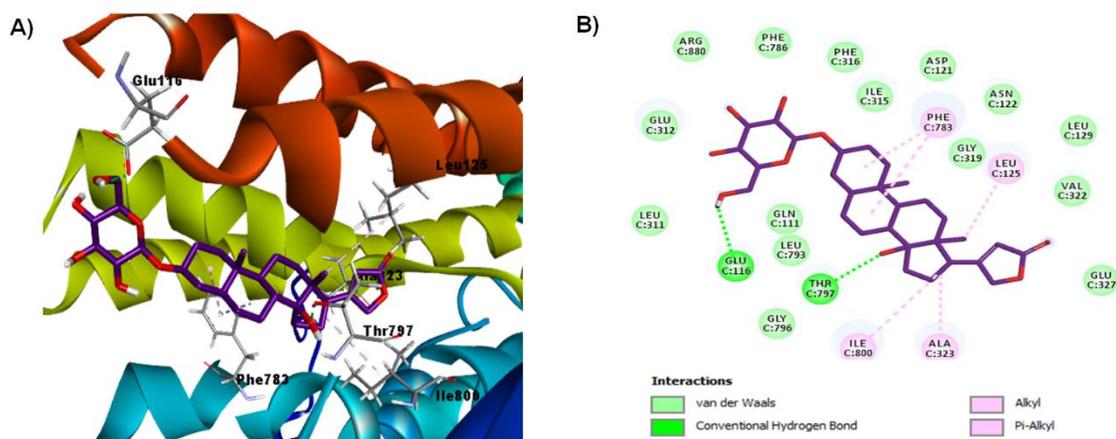


Figura 18. *Docking* molecular de la Na^+/K^+ -ATPasa y el ligando desglucouzarina (púrpura). A) Modelo molecular del cardenólido desglucouzarina y la Na^+/K^+ -ATPasa. B) Mapa de interacción 2D del cardenólido desglucouzarina como ligando y la Na^+/K^+ -ATPasa como receptor. Los puentes de hidrógeno están marcados con líneas intermitentes color verde. Las interacciones hidrofóbicas están marcadas con líneas color rosa.

Como se muestra en el resumen de la Tabla VII, la mayoría de los cardenólidos usados como ligandos en nuestros modelos presentaron casi las mismas interacciones que nuestro ligando de referencia. De estas interacciones podemos remarcar la presencia de la interacción hidrofóbica de los ligandos con el aminoácido Phe⁷⁸³, la cual estuvo presente en todos los modelos incluyendo el modelo de validación. Un aminoácido por destacar es el residuo Ala³²³ el cual aparece formando interacciones como puente de hidrógeno no convencional con el anillo lactona de los ligandos y como una interacción hidrofóbica principalmente con el anillo esteroideal D.

Otra interacción que resaltar es el enlace hidrofóbico entre la Leu¹²⁵ y el grupo metilo de la posición C18 de los cardenólidos, la cual estuvo presente en casi todos los modelos con excepción del ligando 12, 16-dihidroxicatropina. Un comportamiento similar se observó en el caso de los puentes de hidrógeno, donde casi todos los modelos presentaron una interacción con el aminoácido Thr⁷⁹⁷ y el grupo hidroxilo de la posición C14 con excepción del ligando 12,16-dihidroxicatropina. En el caso de este ligando esta interacción está ausente, quizá a causa de que la conformación de este compuesto se ve comprometida por la interacción del grupo hidroxilo de la posición C16 y el aminoácido Asp¹²¹, así como la influencia de la interacción no favorable presentada con el aminoácido Glu¹¹⁷. Siendo muy notable que la presencia de grupos sustituyentes polares en el anillo esteroideal D pueden afectar la distribución electrónica de este compuesto dentro del sitio activo, modificando la posible interacción con los aminoácidos cercanos y la estabilidad de la estructura del compuesto en el complejo ligando-receptor.

La importancia de los aminoácidos del sitio de unión de la Na⁺/K⁺-ATPasa ha sido recientemente estudiado. En la naturaleza existen especies de insectos que expresan una inmunidad natural en contra de los cardenólidos, debido a modificaciones en algunos residuos de aminoácidos en la estructura de la proteína.

Tabla VII. Resumen de los ligandos, energía de unión, valores de RMSD, número de puentes de hidrógeno y contacto con aminoácidos del receptor usados en el *docking* molecular.

Ligandos	Energía de unión (Kcal/mol)	RMSD (Å)	Puente de hidrógeno	Contacto con residuos aminoácidos del receptor
Ouabaína	-9.6539	1.067	6	Gln ¹¹¹ , Glu ¹¹⁷ , Asp ¹²¹ , Asn ¹²² , Leu ¹²⁵ , Glu ³¹² , Ala ³²³ , Phe ⁷⁸³ , Phe ⁷⁸⁶ , Leu ⁷⁹³ , Thr ⁷⁹⁷
Corotoxigenina 3-O-glucopiranosido	- 9.2163	1.2250	5	Gln ¹¹¹ , Glu ¹¹⁶ , Leu ¹²⁵ , Glu ³¹² , Ala ³²³ , Phe ⁷⁸³ , Thr ⁷⁹⁷ , Arg ⁸⁸⁰
Desglucouzarina	- 7.6226	1.0884	3	Leu ¹²⁵ , Glu ³¹² , Gly ³¹⁹ , Ala ³²³ , Phe ⁷⁸³ , Thr ⁷⁹⁷ , Arg ⁸⁸⁰
Calotropina	- 7.2007	1.0538	3	Gln ¹¹¹ , Glu ¹¹⁶ , Asp ¹²¹ , Leu ¹²⁵ , Gly ³¹⁹ , Ala ³²³ , Phe ⁷⁸³ , Leu ⁷⁹³ , Thr ⁷⁹⁷
12,16-Dihidroxicalotropina	-9.2856	1.602	2	Asp ¹²¹ , Gly ³¹⁹ , Ala ³²³ , Glu ¹¹⁷ , Phe ⁷⁸³ , Lys ⁹⁰⁵

Los aminoácidos que forman puentes de hidrógeno esta remarcados en color verde. Los valores de RMSD están expresados en ángstroms.

Estudios realizados con la Na⁺/K⁺-ATPasa de la mariposa monarca han demostrado que cardenólidos como la ouabaína poseen menos afinidad de unión debido a la modificación del aminoácido Asn¹²², el cual está sustituido por una His¹²² (Petschenka et al., 2018).

Otros estudios con Na⁺/K⁺-ATPasa obtenida del insecto *Oncopeltus fasciatus* y ouabaína mostraron que la modificación de aminoácidos como la Gln¹¹¹ por Thr¹¹¹, Asp¹²² por His¹²², Phe⁷⁸⁶ por Asp⁷⁸⁶, así como el cambio de la Thr⁷⁹⁷ por una Ala⁷⁹⁷ disminuyen la afinidad de unión del cardenólido con la enzima (Bramer et al., 2015). Estudios mutagénicos con la Na⁺/K⁺-ATPasa y H⁺/K⁺-ATPasa demostraron que los aminoácidos como Thr⁷⁹⁷ y Phe⁷⁸³, Ile³¹⁵, Glu³¹², Gly³¹⁹ y Asp⁸⁰⁴ son considerados importantes para la interacción de la ouabaína con la H⁺/K⁺-ATPasa de manera similar que en la Na⁺/K⁺-ATPasa (Qiu et al., 2003; Qiu et al., 2005). Aunado a esto, se sabe que los cardenólidos son menos tóxicos en contra de la Na⁺/K⁺-ATPasa de origen murino debido a la modificación de los aminoácidos Gln¹¹¹ por Arg¹¹¹ y Asn¹²² por Asp¹²² (Akimova et al., 2015) lo que resalta la importancia de aminoácidos conservados en el sitio de unión tales como Gln¹¹¹, Asn¹²², Asp¹²¹, Ile³¹⁵, Glu³¹², Gly³¹⁹, Phe⁷⁸³, Phe⁷⁸⁶ y Thr⁷⁹⁷ para que los cardenólidos puedan unirse adecuadamente a la proteína y desencadenar un efecto inhibitorio.

De acuerdo a lo reportado por Laursen et al. (2013) en sus estudios de cristalografía con ouabaína y la Na⁺/K⁺-ATPasa, este compuesto se une en una cavidad en el sitio extracelular de la proteína, donde el núcleo esteroidal de la ouabaína forma interacciones entre la superficie α no polar de la molécula y las cadenas hidrofóbicas laterales de los aminoácidos Ile³¹⁵, Phe³¹⁶, Gly³¹⁹, Phe⁷⁸³ y Leu⁷⁹³. Como mostraron los modelos moleculares realizados en el presente trabajo, todos los cardenólidos presentaron una o más interacciones hidrofóbicas con alguno de los aminoácidos reportados en la estructura cristalográfica con la Na⁺/K⁺-ATPasa, resaltando los enlaces con los aminoácidos Leu¹²⁵, Ala³²³, Leu⁷⁹³ y Phe⁷⁸³ lo que sugiere que los cardenólidos utilizados como ligandos pueden tener una manera similar para interactuar con el receptor como lo hace la ouabaína.

Adicionalmente, Laursen et al. (2013) menciona que la superficie β de la ouabaína participa en una extensa red de interacciones con las cadenas polares del sitio de unión en la proteína. En el caso de ouabaína este cardenólido establece puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la posición C19 con los aminoácidos Gln¹¹¹ y Asn¹²², así como el grupo hidroxilo de la posición C14 y la Thr⁷⁹⁷. De acuerdo a nuestras observaciones, los ligandos calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y desglucouzarina presentaron el puente de hidrógeno entre el aminoácido Thr⁷⁹⁷ y el grupo hidroxilo de la posición C14, lo cual incrementa la posibilidad de que estos compuestos puedan formar un complejo ligando-receptor con la Na⁺/K⁺-ATPasa. También el ligando calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido presentaron en los modelos moleculares la interacción entre el aminoácido Gln¹¹¹ y el átomo de oxígeno del carbonilo del grupo aldehído de la posición C19. Cabe señalar que en el caso de la molécula desglucouzarina no se presentó esta interacción debido a que la sustitución en la posición C19 es un grupo metilo en lugar del grupo aldehído. Una observación importante con respecto a las interacciones por puente de hidrógeno presentadas por los ligandos y los aminoácidos del sitio de unión de la Na⁺/K⁺-ATPasa es que la contribución del oxígeno del grupo carbonilo y del grupo hidroxilo en los puentes de hidrógeno fue la de aceptor, al igual que la del átomo de oxígeno de los grupos hidroxilos en la ouabaína, lo que refuerza lo obtenido en los modelos de QSAR con relación a la importancia de los grupos funcionales que actúan como aceptores de puentes de hidrógeno.

De acuerdo con Laursen et al. (2015) el residuo de carbohidrato de la ouabaína queda expuesto en el espacio extracelular de la cavidad donde se encuentra el sitio de unión en donde se encuentran aminoácidos con residuos polares como Glu¹¹⁶, Glu³¹², Arg⁸⁸⁰ o Asp⁸⁸⁴, lo que puede implicar la posibilidad de interacciones entre los grupos funcionales de los carbohidratos y estos aminoácidos. Sumado a lo anterior se ha demostrado que una de las funciones del carbohidrato de la ouabaína es la de estabilizar el complejo enzima-cardenólido a través de la interacción del grupo hidroxilo del carbono 3' con grupos funcionales que funjan como aceptores o donadores de puente de hidrógeno en el sitio de unión (Cornelius et al., 2013). Este hecho puede explicar los diferentes

aminoácidos que pudieron formar alguna interacción con los carbohidratos de los cardenólidos utilizados como ligandos en los modelos moleculares.

En el caso de la molécula 12,16-dihidroxicatropina el modelo molecular indica que este ligando puede formar interacciones con otros aminoácidos debido a la presencia del grupo hidroxilo de la posición C16, formando un puente de hidrógeno con el aminoácido Asp¹²¹ causando una conformación diferente de la molécula en comparación a los otros cardenólidos usados como ligandos y de la ouabaína. Como se había mencionado en el análisis SAR, la presencia de grupos funcionales en el anillo D no es beneficiosos para la actividad citotóxica debido a un posible impedimento estérico o por fuerza de repulsión. Además, estudios de la afinidad de los cardenólidos con la Na⁺/K⁺-ATPasa mostraron que la introducción de grupos hidroxilos adicionales en el anillo esteroideal puede reducir la afinidad de unión de los cardenólidos con la proteína (Morsy, 2017) lo que sugiere que las sustituciones que posee esta molécula en la estructura esteroideal le dificultan obtener una conformación óptima en comparación a los otros ligandos que carecen de estas.

De acuerdo a los resultados observados en los modelados moleculares las moléculas calotropina, corotoxigenina 3-O-glucopiranosido y desglucouzarina pueden formar interacciones similares a la ouabaína principalmente por puentes de hidrógeno con aminoácidos como Thr⁷⁹⁷ y Gln¹¹¹, así como interacciones hidrofóbicas con aminoácidos no polares como Phe⁷⁸³ o Leu¹²⁵ considerados de importancia para la unión de los cardenólidos con la Na⁺/K⁺-ATPasa lo que sugiere que estos cardenólidos pueden tener una adecuada interacción con el sitio de unión de la proteína y como consecuencia pueden tener la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa en modelos *in vitro*.

Efecto Inhibitorio de los Cardenólidos Sobre la Actividad Enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa

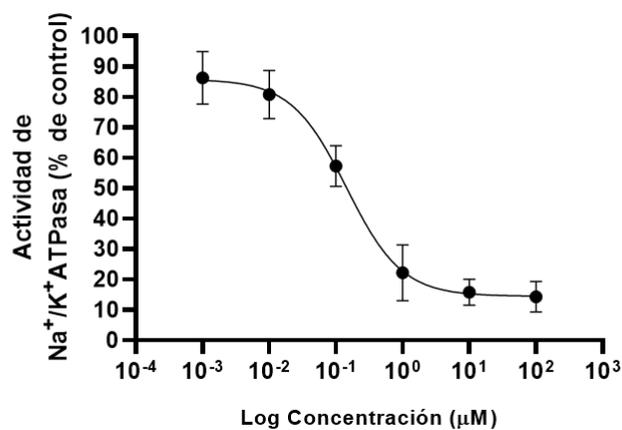
Para determinar la influencia de los cardenólidos ouabaína, calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido sobre la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa de corteza cerebral porcina se llevaron a cabo una serie de ensayos de inhibición enzimática *in vitro* con los

cardenólidos previamente mencionados como inhibidores a diferentes concentraciones. Como se muestra en la Figura 19, el primer compuesto evaluado fue nuestra molécula de referencia ouabaína. Como se puede observar en la gráfica, la ouabaína induce un efecto clásico de dosis-respuesta sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa, con un 80% de inhibición entre concentraciones de 100.0 – 1.0 μM , con un valor de IC_{50} de $0.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$.

Para el compuesto calotropina, los resultados muestran un comportamiento muy similar al observado al inhibidor de referencia ouabaína, con un efecto dosis-respuesta sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa, manteniendo una inhibición cercana al 80% entre concentraciones de 1000.0-1.0 μM con un valor de IC_{50} de $0.27 \pm 0.06 \mu\text{M}$. El cardenólido corotoxigenina 3-O-glucopiranosido presentó un valor de IC_{50} de $0.87 \pm 0.2 \mu\text{M}$, y similar a los compuestos evaluados previamente, esta molécula exhibió un efecto dosis-respuesta sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa, manteniendo un efecto inhibitorio del 80% entre las concentraciones de 1000.0-100.0 μM .

Los glucósidos cardenólidos son bien conocidos por ser inhibidores específicos de la Na^+/K^+ -ATPasa y por servir como fármacos en el tratamiento de fallas cardíacas a través de los años (Reinhard et al., 2013). En el presente trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria de los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido aislados de *Asclepias subulata* y la molécula ouabaína sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa donde todos los compuestos evaluados demostraron inhibir a la enzima en concentraciones por debajo de los 1.0 μM . Observando los valores de IC_{50} presentados por los cardenólidos podemos destacar que el compuesto más potente fue el compuesto de referencia ouabaína, la cual presentó un valor de IC_{50} de 0.12 μM . Dicho valor de IC_{50} es cercano a los reportes previos de la inhibición de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa para este compuesto.

A)



B)

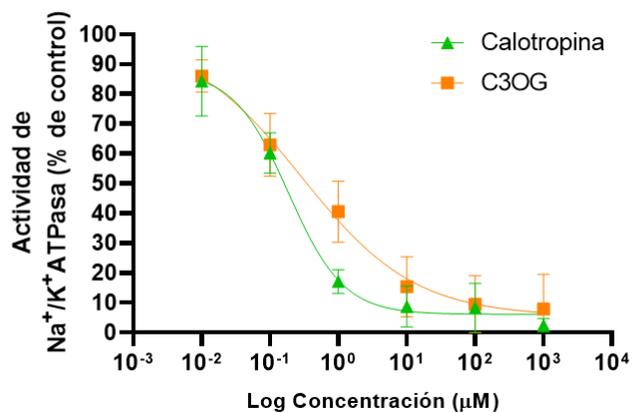


Figura 19. Efecto inhibitorio de los cardenólidos sobre la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa. A) Gráfica de inhibición enzimática de la ouabaína. B) Gráfica de inhibición enzimática de calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido. Gráficas ajustadas por regresión no lineal. Las concentraciones están graficadas en escala logarítmica.

Estudios realizados por Mugpasao et al., (2015) con ouabaína y la Na^+/K^+ -ATPasa demostraron que este compuesto puede inhibir la actividad de la enzima con un valor de IC_{50} de $0.105 \mu\text{M}$. Por otro lado, estudios llevados a cabo por Yang et al., (2017) con ouabaína y la Na^+/K^+ -ATPasa reportaron un valor de IC_{50} de $0.147 \mu\text{M}$ para la inhibición enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa por el compuesto. Estos datos demuestran que la ouabaína es un buen compuesto de referencia para la inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa para los ensayos.

Asimismo, en el presente trabajo se demostró que el compuesto calotropina inhibe la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa con un valor de IC_{50} de $0.27 \mu\text{M}$ lo cual coincide con evaluaciones de otros grupos de investigación. Estudios realizados por Agrawal et al. (2021) con el compuesto calotropina y la Na^+/K^+ -ATPasa reportan que este compuesto puede inhibir la actividad Na^+/K^+ -ATPasa con un valor de IC_{50} de $0.27 \mu\text{M}$. Cabe señalar que el valor de IC_{50} obtenido para este compuesto es muy cercano al reportados en compuestos como la digitoxina el cual es utilizado como control positivo en ensayos de inhibición enzimática con la Na^+/K^+ -ATPasa. Estudios realizados por Ren et al., (2019) evaluaron la capacidad de digitoxina de inhibir la actividad Na^+/K^+ -ATPasa donde reportaron un valor de IC_{50} de $0.23 \mu\text{M}$. Dicho valor de IC_{50} reportado para calotropina siendo tan próximo al reportado para compuestos utilizados como control como lo es digitoxina nos sugiere que este calotropina posee una gran capacidad de inhibir la actividad Na^+/K^+ -ATPasa.

Aunado a lo anterior, podemos observar que calotropina en comparación a sus análogos derivados de su isómero calactina muestra mejores efectos inhibitorios sobre la actividad Na^+/K^+ -ATPasa. Estudios realizados con los compuestos calactina, 16α -hidroxicalactina, $6'$ -hidroxicalactina y $3\text{-O-}\beta\text{-D-glucopiranosilcalactina}$ sobre la actividad inhibitoria de la Na^+/K^+ -ATPasa reportaron valores de IC_{50} de 0.4 , 0.5 , 0.5 y $1.7 \mu\text{M}$, respectivamente (Piacente et al., 2009). Este hecho refuerza la información obtenida en los estudios de relación estructura-actividad realizados en el presente trabajo, donde los cardenólidos análogos de calotropina y calactina con sustituciones en las posiciones C15 y C16 mostraron menores valores de IC_{50} para la actividad antiproliferativa en la línea

celular A549, lo que nos sugiere que puede existir una relación entre el efecto de la actividad antiproliferativa de los compuestos con la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa.

Con respecto al compuesto corotoxigenina 3-O-glucopiranosido este es el primer estudio que reporta el efecto inhibitorio de este compuesto sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa, en el cual se reporta un valor de IC_{50} de $0.87 \mu\text{M}$. Comparando su efecto inhibitorio con compuestos como la ouabaína podemos observar una gran diferencia en cuanto a los valores obtenidos de IC_{50} . Esto nos puede indicar que este compuesto podría verse afectado por alguna diferencia en las interacciones de los aminoácidos del sitio de unión y afectar la potencia de inhibición sobre la enzima.

Obtención de los Parámetros Cinéticos y Naturaleza del Tipo de Inhibición de los Cardenólidos Aislados de *A. subulata* sobre la Actividad Na^+/K^+ -ATPasa

Determinación de los Parámetros Cinéticos de la Actividad Na^+/K^+ -ATPasa

Para determinar los parámetros cinéticos y la naturaleza del tipo de inhibición de los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido sobre la actividad Na^+/K^+ -ATPasa se realizó una cinética enzimática en ausencia de los inhibidores para establecer los valores de K_m y V_{max} de la enzima. Bajo esta premisa se realizó una cinética enzimática con varias concentraciones de sustrato, en este caso ATP y la variación del efecto de este sobre el tiempo.

Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron 0.125, 0.25, 1.0 y 4.0 mM de ATP a concentración final y el rango de tiempo evaluado de la enzima con el sustrato fue de 15 minutos, con mediciones cada 3 minutos. Como muestra la Figura 20, se observa que la liberación de ortofosfato a través del tiempo mantiene una tendencia lineal, principalmente a las concentraciones de 1.0 y 4.0 mM de ATP lo que nos sugiere que nuestro sistema enzimático no consume todo el sustrato en el tiempo de evaluación utilizado en los ensayos de inhibición.

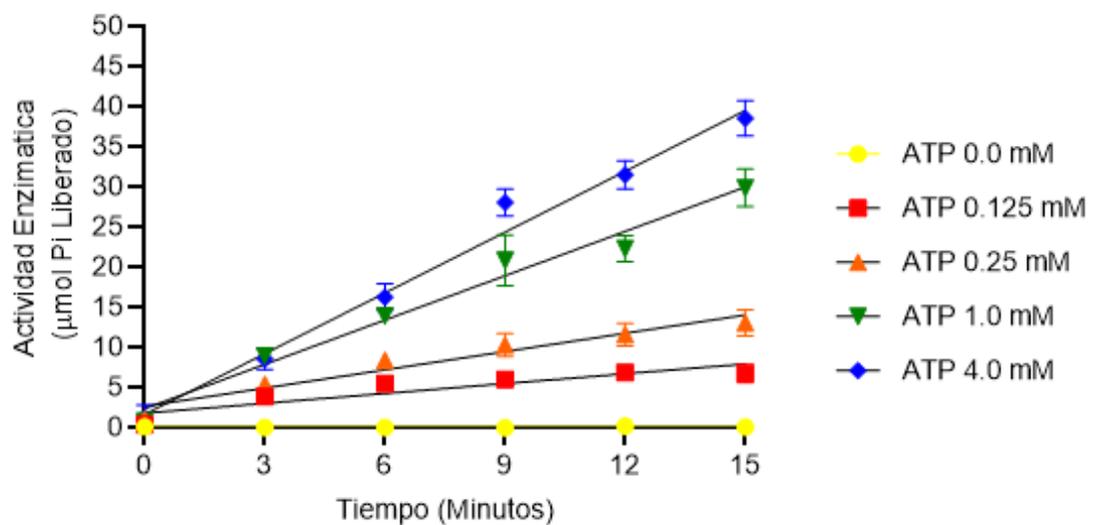


Figura 20. Efecto de la concentración de sustrato (ATP) a través del tiempo sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa. Todas las concentraciones de sustrato se realizaron por triplicado. Los resultados se obtuvieron de tres ensayos independientes.

Por otro lado, obtenida la gráfica del efecto del sustrato a través del tiempo en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa se calcularon los valores de las pendientes a partir de un análisis de regresión lineal, esto con la finalidad de obtener el valor de las velocidades iniciales (V_o). Como se muestra en la Figura 21, los datos obtenidos de las pendientes se ajustan correctamente a un modelo clásico de cinética Michaelis-Menten con un valor de $R^2=0.97$. Los valores aparentes de K_m y V_{max} obtenidos de los datos de la cinética enzimática fueron de 0.68 ± 0.08 mM y 3.6 ± 0.4 μmol de Pi liberado/mg de proteína/min.

Determinación de los Parámetros Cinéticos de la Actividad Na^+/K^+ -ATPasa en Presencia de Inhibidores

Obtenidos los valores de las constantes cinéticas de la enzima solo en presencia de sustrato, se realizó la obtención de los valores de las constantes cinéticas K_m y V_{max} de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa en presencia de dos concentraciones de inhibidores (0.1 y 1.0 μM) con el fin de estimar el tipo de inhibición que causan los cardenólidos sobre la enzima, así como la potencia de afinidad de estos por medio del cálculo de la K_i .

En lo que concierne a los cardenólidos aislados de *Asclepias subulata*, los datos obtenidos para los compuestos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido se ajustaron adecuadamente a un modelo típico de cinética de Michaelis-Menten como se puede observar en las gráficas de la Figura 22. De acuerdo a los valores obtenidos para la K_m y V_{max} aparentes de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa en presencia de los inhibidores utilizados en los ensayos se observó una disminución de ambos parámetros conforme se incrementaba la concentración de los cardenólidos, lo cual nos indica que el tipo de inhibición que causan los compuestos en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa es de naturaleza acompetitiva. Este dato se refuerza al analizar el diagrama de doble recíproco de Lineweaver-Burk que se muestra en la Figura 22, en el cual se observa un patrón de líneas paralelas entre sí, lo cual indica que los inhibidores son de tipo acompetitivos.

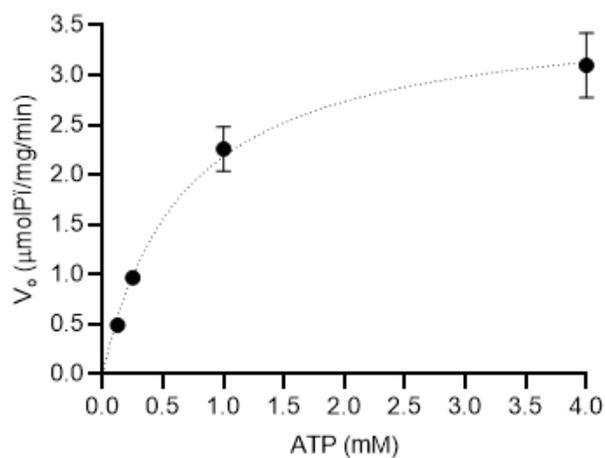


Figura 21. Determinación de la velocidad inicial (V_0) de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa. Los datos se ajustaron a un modelo Michaelis-Menten por regresión no lineal. Todas las concentraciones de sustrato se evaluaron por triplicado y en tres ensayos independientes.

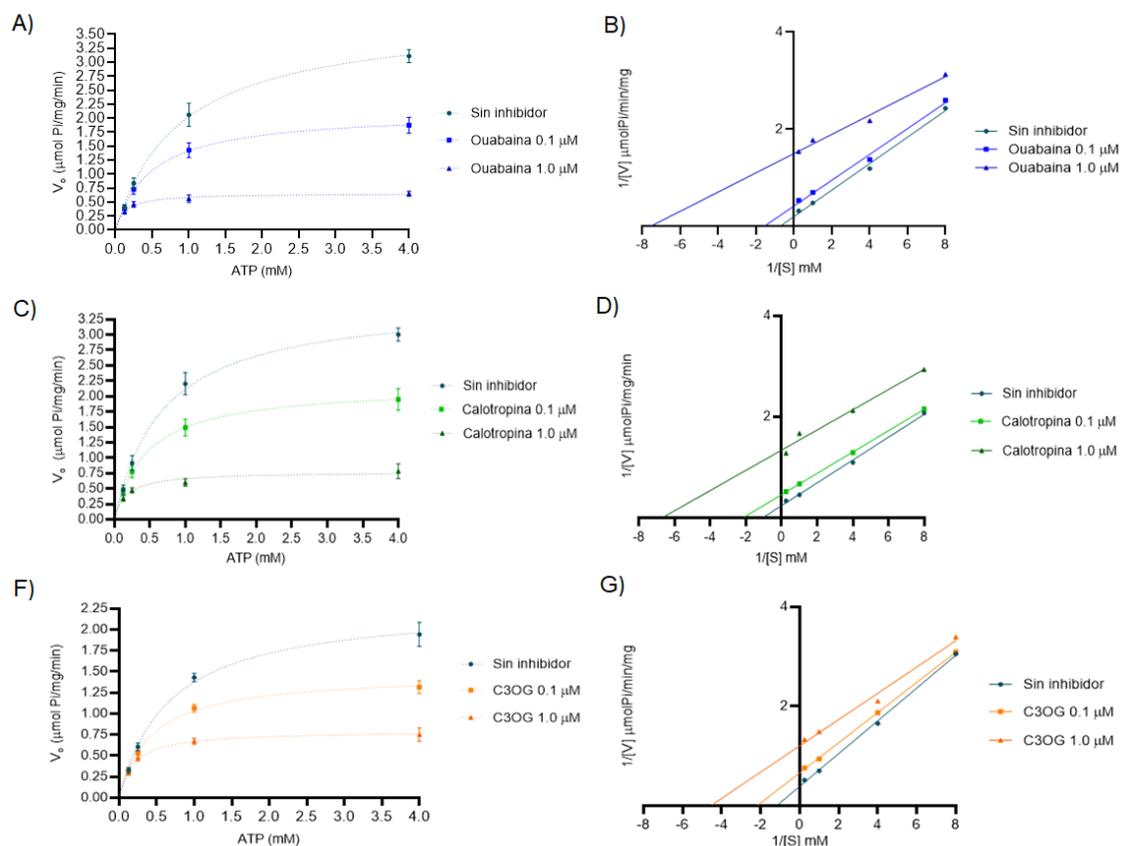


Figura 22. Inhibición de la Na⁺/K⁺-ATPasa de corteza cerebral porcina en ausencia o presencia de los cardenólidos aislados de *A. subulata* y ouabaína a diferentes concentraciones de sustrato. A) Ajuste de Michaelis-Menten de ouabaína a 0.1 y 1.0 μM. B) Diagrama de Lineweaver-Burk de ouabaína a 0.1 y 1.0 μM. C) Ajuste de Michaelis-Menten de calotropina a 0.1 y 1.0 μM. D) Diagrama de Lineweaver-Burk de calotropina a 0.1 y 1.0 μM. E) Ajuste de Michaelis-Menten de corotoxigenina 3-O-glucopiranósido a 0.1 y 1.0 μM. F) Diagrama de Lineweaver-Burk de corotoxigenina 3-O-glucopiranósido a 0.1 y 1.0 μM. Los datos fueron obtenidos de tres experimentos independientes, cada concentración por triplicado.

Al igual que las moléculas aisladas de *Asclepias subulata*, el cardenólido utilizado como referencia, la ouabaína mostró la misma tendencia al analizar su efecto sobre la actividad Na^+/K^+ -ATPasa con una disminución de los valores de K_m y V_{\max} aparentes conforme se incrementó la concentración del compuesto y un patrón de líneas paralelas entre sí en el diagrama de doble recíproco de Lineweaver-Burk de la Figura 22, mostrando que al igual que calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido, ouabaína inhibe a la enzima Na^+/K^+ -ATPasa de manera acompetitiva.

Para determinar la potencia de afinidad de los cardenólidos sobre la Na^+/K^+ -ATPasa se calculó el valor de la constante de inhibición (K_i) para cada compuesto. El valor de la K_i para ouabaína fue de $0.16 \pm 0.04 \mu\text{M}$ mostrando que este compuesto posee una gran afinidad en el complejo enzima-sustrato. Para el caso de los compuestos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido, los valores de K_i calculados fueron de 0.20 ± 0.03 y $0.52 \pm 0.05 \mu\text{M}$, respectivamente, mostrando que calotropina tiene una mejor afinidad de unión en el complejo Na^+/K^+ -ATPasa –sustrato en comparación de corotoxigenina 3-O-glucopiranosido, siendo el valor de K_i de calotropina muy cercano al valor presentado por el compuesto ouabaína utilizado como referencia en nuestros ensayos. Los datos obtenidos de los parámetros cinéticos de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa en presencia de los inhibidores se resume en la Tabla VIII.

Dentro de la gama de propiedades biológicas reportadas para los compuestos cardenólidos, quizá la más antigua ha sido su capacidad cardiotónica gracias a su capacidad de inhibir a la enzima Na^+/K^+ -ATPasa. En el presente trabajo se demostró que los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido aislados de *A. subulata* pueden inhibir la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa. Además de esto se realizaron cinéticas enzimáticas para determinar el tipo de inhibición que causan los cardenólidos en la enzima. Gracias a la obtención de las constantes cinéticas K_m y V_{\max} y a los diagramas de Lineweaver-Burk se observó que estos compuestos inhiben la actividad Na^+/K^+ -ATPasa por un mecanismo acompetitivo.

Tabla VIII. Análisis cinético de la actividad Na⁺/K⁺-ATPasa de corteza cerebral porcina en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los cardenólidos ouabaína, calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido.

Parámetro cinético	Concentración de inhibidor	Inhibidor		
	(μ M)	Ouabaína	Calotropina	C3OG ^b
K_m (mM)	0.0	0.88 \pm 0.09	0.68 \pm 0.12	0.66 \pm 0.1
	0.1	0.47 \pm 0.06	0.45 \pm 0.1	0.42 \pm 0.04
	1.0	0.12 \pm 0.01	0.17 \pm 0.1	0.12 \pm 0.01
V_{max} ^a	0.0	3.8 \pm 0.6	3.56 \pm 0.06	2.2 \pm 0.18
	0.1	2.11 \pm 0.14	2.17 \pm 0.1	1.47 \pm 0.10
	1.0	0.66 \pm 0.04	0.77 \pm 0.1	0.80 \pm 0.06
K_i (μ M)		0.16 \pm 0.04	0.20 \pm 0.03	0.52 \pm 0.05
Tipo de inhibición		Acompetitiva	Acompetitiva	Acompetitiva

Todos los valores fueron obtenidos por triplicado y de tres experimentos independientes. Los datos son expresados como promedio \pm desviación estándar. Los valores de K_m y V_{max} aparentes fueron calculados por ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten por regresión no lineal. ^a Los valores de V_{max} esta expresado en μ mol de Pi liberado/mg de proteína/min. ^b Corotoxigenina 3-O-glucopiranosido.

Esta observación es importante dado que es la primera vez que se reporta el tipo de inhibición sobre la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa para los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido. La inhibición acompetitiva es un tipo de inhibición inusual, desde un punto de vista cinético este tipo de inhibición se caracteriza por la disminución de los valores de K_m y V_{max} conforme se incrementa la concentración del inhibidor y por un patrón de líneas paralelas entre sí en los diagramas de Lineweaver-Burk (Cornish-Bodwen, 1986, Ramsay y Tipton, 2017).

Los inhibidores acompetitivos tienen la particularidad de solo unirse al complejo enzima-sustrato y no a la enzima sola. En esencia la unión del sustrato crea un sitio de unión para el inhibidor por lo que la presencia del sustrato funciona como un promotor lo que los vuelve potentes moduladores farmacológicos en la función enzimática otorgándoles no solo potencia sino también especificidad ante el complejo enzima-sustrato (Kenakin, 2012; Boulton et al., 2018).

Como se reporta en el presente trabajo, no solo los cardenólidos aislados de *A. subulata* presentan esta naturaleza de inhibición, también el compuesto ouabaína mostró el mismo comportamiento ante la enzima. Estudios realizados por Lindberg (1982) demostraron que la ouabaína podía actuar como un inhibidor acompetitivo en la Na^+/K^+ -ATPasa cuando se usaba como sustrato el MgATP . En este contexto, esta naturaleza de inhibición ha sido reportada en estudios con otros tipos de cardenólidos. Estudios realizados con digitoxina y gitoxina en ensayos de inhibición enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa mostraron que estos compuestos actúan como inhibidores acompetitivos (Krstic et al., 2004; Colovic et al., 2009). Por otro lado, estudios de inhibición enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa con los cardenólidos glucostreblósido, streblósido y mansonin obtenidos de la planta *Streblus asper* muestran que estos compuestos inhiben a la enzima por medio de un mecanismo acompetitivo o anticompertitivo (Bai et al., 2019).

De acuerdo con el modelo de Alber-Post propuesto para el mecanismo de intercambio iónico de la Na^+/K^+ -ATPasa, la enzima sufre una fosforilación en un residuo de Asp^{369} por una molécula de ATP lo que genera el cambio conformacional en la proteína

pasando de un estado E_1 a E_2 generando de esta manera la cavidad que permite que los cardenólidos puedan interactuar con el sitio de unión de la Na^+/K^+ -ATPasa (Silva y Soares da Silva, 2012).

Diseño de Farmacóforo

Con el fin de establecer que partes de las moléculas de los cardenólidos son importantes para que estos compuestos puedan interactuar con el sitio de unión de la Na^+/K^+ -ATPasa se realizó un análisis exploratorio por medio de los modelados moleculares de los compuestos con la proteína.

En este análisis exploratorio se consideraron los aminoácidos que interaccionan con los cardenólidos utilizando como base la información del cardenólido ouabaína que viene en la estructura cristalográfica utilizada como receptor, así como las distancias entre los enlaces y la parte de la estructura del cardenólido que interacciona con el aminoácido.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis exploratorio de los modelados moleculares se puede observar un patrón de aminoácidos presentes en las interacciones de los cardenólidos con el sitio de unión de la Na^+/K^+ -ATPasa tales como Gln^{111} , Gly^{119} , Asp^{121} , Ala^{323} , Leu^{125} , Phe^{783} , Phe^{786} , Leu^{793} , Thr^{797} y Ile^{800} . Por otro lado, en menor medida se observaron interacciones con aminoácidos como Glu^{117} , Asp^{122} , Glu^{312} , Ile^{315} , Arg^{880} , Val^{881} , Asp^{885} y Arg^{886} . Para el tipo de interacciones formadas por el ligando en el sitio de unión del receptor la mayoría fueron puentes de hidrógeno convencional, interacciones hidrofóbicas y enlaces carbono-hidrógeno.

Como se puede observar en la Figura 23, las interacciones por medio de puentes de hidrógeno convencional fueron principalmente entre el grupo hidroxilo en orientación β de la posición del carbono 14 con el aminoácido Thr^{797} donde el átomo de oxígeno del grupo OH ejerce una función de aceptor del puente de hidrógeno, dicho enlace tuvo en promedio una distancia de $2.08 \pm 0.4 \text{ \AA}$ ($n = 40$).

Otro aminoácido que presenta interacción con este grupo OH es el residuo Asp^{121} , pero en este caso el grupo OH cumple la función de donador en la formación del puente

de hidrógeno con una distancia promedio de $2.49 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ($n = 14$). Otro puente de hidrógeno presente en la mayoría de los modelados moleculares es el formado entre los grupos sustituyentes de la posición del carbono 19, donde el aminoácido Gln¹¹¹ puede interactuar con el átomo de oxígeno del grupo aldehído y del grupo hidroxilo, donde dicho átomo de oxígeno ejerce una función de aceptor para la formación del puente de hidrógeno con una distancia promedio de $2.34 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ($n = 24$). Otros tipos de interacciones presentes fueron los puentes de carbono-hidrógeno, destacando la llevada a cabo entre el aminoácido Gly³¹⁹ y el carbono 21 con una distancia de $3.38 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 23$).

Como se puede observar en la Figura 23, las interacciones hidrofóbicas fueron más frecuentes, destacando una mayor variedad de aminoácidos con los que los compuestos pueden interactuar. El aminoácido que tuvo mayor presencia de interacciones con las moléculas fue el residuo Phe⁷⁸³, el cual demostró tener una gran capacidad de interacción con diversas partes del núcleo esteroidal de los cardenólidos. Dentro de las interacciones que ocurrieron con mayor frecuencia entre este aminoácido y los cardenólidos destacan la interacción del anillo A del núcleo esteroidal con esta Phe⁷⁸³ con una distancia promedio de $5.14 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 20$). También destaca la interacción entre el anillo B del núcleo esteroidal con la Phe⁷⁸³ con una distancia promedio de $4.81 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ($n = 26$). Cabe señalar que este aminoácido presentó interacciones específicas con 2 enlaces en particular, uno fue el enlace formado entre el carbono 11 y carbono 12, se mantuvo presente en muchos de los modelos moleculares y mostró una distancia de $4.41 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ($n = 25$). Otra interacción similar presente en los modelados moleculares fue la del enlace entre los carbonos 16 y 17 con una distancia de $4.18 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ($n = 35$). Por otro lado, este aminoácido presentó esporádicas interacciones con partes del cardenólido como los carbonos 7 ($n = 3$), 9 ($n = 5$), 10 ($n = 1$), 11 ($n = 2$), 12 ($n = 3$), 15 ($n = 7$), 18 ($n = 3$) y 19 ($n = 5$), así como con los enlaces formados entre los carbonos 10 - 11 ($n = 1$) y 15 - 16 ($n = 2$).

Aminoácidos como la Phe⁷⁸⁶ también presentaron múltiples interacciones principalmente con la estructura esteroidal, en especial con el anillo A de la estructura esteroidal con una distancia cercana a los $5.14 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 13$).

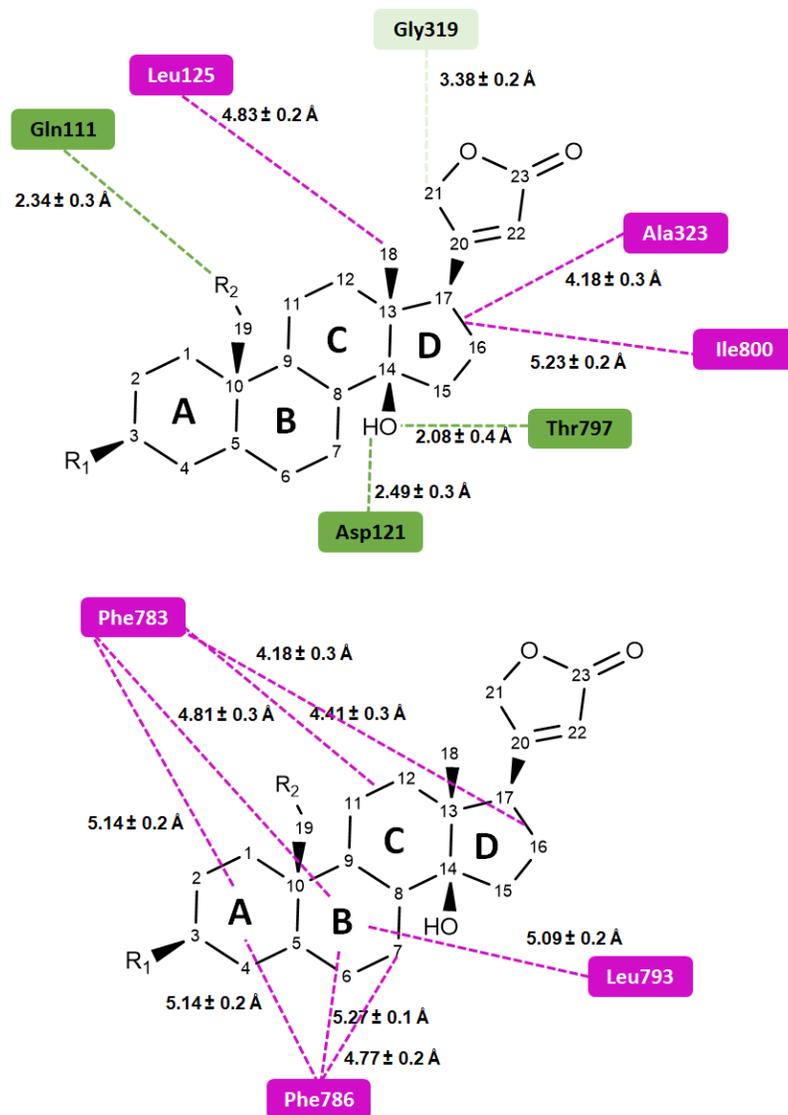


Figura 23. Principales interacciones entre los compuestos cardenólidos en el sitio de unión de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa. Los aminoácidos que presentaron interacciones hidrofóbicas están coloreados en color rosa. Los aminoácidos que presentaron interacciones tipo puente de hidrógeno están coloreados en color verde. Los aminoácidos que interactúan por medio de puente carbono-hidrógeno están marcados en color verde claro. R₁= OH o carbohidrato. R₂= grupo aldehído y grupo OH.

Otras estructuras de los cardenólidos que presentaron interacciones con este aminoácido en menor medida fueron el carbono 7 y el anillo B del núcleo esteroidal. Otros aminoácidos involucrados en la formación de interacciones hidrofóbicas fueron el residuo Leu⁷⁹³, el cual interaccionó principalmente con el anillo B del núcleo esteroidal con una distancia cercana a los $5.09 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 26$). En menor medida este aminoácido presentó también interacciones con el carbono 7 de la estructura esteroidal. En el caso del aminoácido Leu¹²⁵ este mostró interacciones con el grupo metilo del carbono 18 con una distancia de $4.83 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 13$). Por otro lado, el aminoácido Ile⁸⁰⁰ interaccionó con el enlace entre el carbono 16 y 17 a una distancia de $5.23 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 11$). De manera similar el aminoácido Ala³²³ presentó interacción con el enlace entre el carbono 16 y 17 con una distancia promedio de $4.18 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ($n = 19$).

Para las interacciones que estuvieron presentes con los grupos hidroxilos en los residuos de carbohidratos no se observó un patrón generalizado entre los compuestos y los aminoácidos del sitio de unión de la Na⁺/K⁺-ATPasa. Sin embargo, se pueden destacar la presencia de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Glu¹¹⁶ y el grupo hidroxilo del carbono 2' de los cardenólidos similares a la calotropina con una distancia promedio de $2.58 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 6$) donde los grupos hidroxilos del carbohidrato ejercieron como donadores para la formación del puente de hidrógeno. También se puede destacar la presencia del puente de hidrógeno entre el aminoácido Glu³¹² y el grupo hidroxilo del carbono 3' de algunos cardenólidos *tipo-digital* con una distancia cercana a $2.68 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 3$) y el puente de hidrógeno entre el residuo Arg⁸⁸⁰ y el átomo de oxígeno que une el residuo de carbohidrato con el anillo esteroidal en el carbono 3 con una distancia de $2.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$ ($n = 4$).

Basados en los resultados obtenidos de los modelados moleculares con los cardenólidos de la base de datos utilizados como ligandos podemos observar que hay estructuras específicas de la molécula que interactúan con aminoácidos de relevancia para que estos compuestos puedan interactuar con el sitio de unión de la enzima, entre los cuales podemos destacar el grupo hidroxilo del carbono 14, el grupo aldehído e hidroxilo de la sustitución del carbono 19, así como los anillos cíclicos A y B del núcleo esteroidal,

el grupo metilo del carbono 18, el enlace formado entre los carbonos 11-12 y 16-17, así como la presencia del carbono 21 perteneciente al anillo lactona por lo que nuestros resultados sugieren que estas estructuras pueden ser consideradas los farmacóforos para estos compuestos utilizados en el análisis exploratorio. La Figura 24 resume las posibles estructuras farmacofóricas de los cardenólidos usados en el análisis exploratorio.

Uno de los métodos en el diseño de fármacos asistidos por computadora es el diseño de farmacóforos. Un farmacóforo se define como “las características mínimas necesarias para garantizar la interacción de una molécula con un blanco farmacológico específico desencadenando en la activación o inhibición de un efecto biológico de interés” (Qing et al., 2014).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis exploratorio se observó que los anillos A y B del núcleo esteroideal están involucrados en diversas interacciones con aminoácidos no polares como fenilalaninas o leucinas lo que nos indica la importancia de la hidrofobicidad de las moléculas. Este hecho coincide con lo encontrado en los análisis de QSAR donde una de las características que influyen de manera positiva el efecto antiproliferativo de los cardenólidos *tipo doble enlace* sobre la línea celular A549 es la lipoafinidad. Bajo esta idea, y dado que la cavidad en donde interactúan los compuestos es en su mayoría de naturaleza hidrofóbica podemos asumir que la interacción de aminoácidos como la Phe⁷⁸³ y Phe⁷⁸⁶ considerados esenciales para que los cardenólidos interactúen con la Na⁺/K⁺-ATPasa ayudan a los compuestos a tomar una configuración adecuada dentro del sitio de unión. De acuerdo a estudios computacionales entre la ouabaína y la Na⁺/K⁺-ATPasa se ha reportado que el núcleo esteroideal de los glucósidos cardiotónicos adopta una conformación de silla a diferencia de otros compuestos con estructuras esteroidales presumiblemente gracias a un efecto de apilamiento por las interacciones con los residuos Phe⁷⁸³ y Phe⁷⁸⁶ (Yatime et al., 2011).

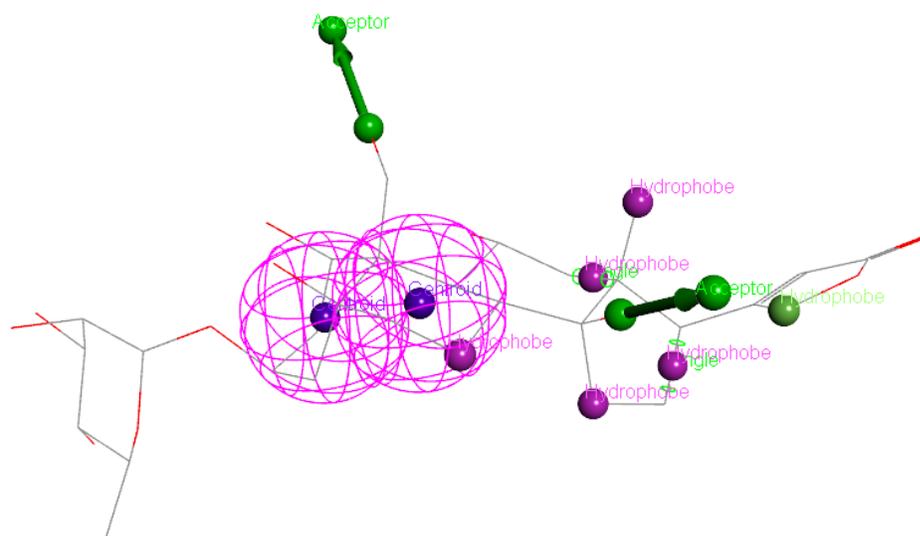


Figura 24. Posibles estructuras farmacofóricas de los cardenólidos para su interacción con el sitio de unión de la Na^+/K^+ -ATPasa. Las flechas de color verde representan estructuras aceptores para formar puentes de hidrógeno. La red esférica color rosa representa centroides con características hidrofóbicas. Las esferas color rosa representan átomos con característica hidrofóbica. Se utilizó la estructura de ouabaína como andamio.

Otra característica de resaltar en el análisis exploratorio es la importancia que muestran los enlaces entre los carbonos que forman los anillos C y el anillo de ciclopentano, en especial los enlaces formados entre los carbonos 11-12 y 16-17 respectivamente. Considerando los datos obtenidos del análisis SAR refuerza el hecho de que las sustituciones en las posiciones del anillo C en especial en el C12 y las sustituciones en las posiciones C16 del anillo D afectan de manera negativa el efecto antiproliferativo de los compuestos sobre la línea celular A549. Esto se puede ver reflejado en la diferencia de actividad antiproliferativa y de inhibición sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa de los compuestos calactina y 16 α -hidroxicalactina en el cual el compuesto con la sustitución del grupo OH en el C16 presentó menores valores de IC_{50} en ambas actividades.

Otro caso similar es el de los compuestos digitoxina y gitoxina, en el cual el cardenólido gitoxina posee un grupo OH en la posición C16 y este compuesto demostró tener menor potencia de inhibición que su análogo digitoxina, además de no presentar la interacción entre la Phe⁷⁸³ con el enlace C16-17 lo que demuestra la importancia que tiene esta estructura sobre el efecto en la Na^+/K^+ -ATPasa. Al igual que el caso anterior, la diferencia de actividad antiproliferativa en la línea celular A549 entre los compuestos calotropina y 12,16-dihidroxicalotropina demuestra que estas sustituciones impactan de manera negativa en el efecto biológico, lo que se realiza en los modelados moleculares donde el compuesto con las sustituciones no interactuó con los mismos aminoácidos que el resto de los compuestos sometidos al modelado.

En el caso de la importancia del grupo hidroxilo de la posición del C14 la importancia de este grupo funcional ha sido resaltada no solo en estudios relacionados con la capacidad citotóxica de los cardenólidos sino también en su importancia para que los compuestos puedan interactuar con la Na^+/K^+ -ATPasa. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis QSAR, la cantidad de grupos aceptores de puentes de hidrógeno están involucrados en el efecto citotóxico de los cardenólidos sobre la línea celular A549, lo cual coincide con los datos obtenidos en el análisis exploratorio, donde los átomos de oxígeno de los grupos OH del carbono 14 y del grupo carbonilo del carbono 19 funcionan como aceptores de puentes de hidrógeno los aminoácidos Thr⁷⁹⁷ y Gln¹¹¹ respectivamente,

los cuales se ha demostrado que son importantes para una correcta interacción de los cardenólidos y la Na⁺/K⁺-ATPasa (Qiu et al., 2005).

Basados en los resultados del presente trabajo podemos reafirmar la importancia de las sustituciones de los grupos funcionales en la estructura de los cardenólidos no solo para potenciar o disminuir su efecto antiproliferativo ante la línea celular A549, sino también en lo que respecta al efecto inhibitorio sobre la Na⁺/K⁺-ATPasa. Además, los resultados nos muestran la relación que existe entre la capacidad citotóxica de los compuestos y la inhibición de la Na⁺/K⁺-ATPasa lo que nos sugiere que los efectos citotóxicos sobre la línea celular A549 causados por los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido aislados de *Asclepias subulata* están relacionados con su capacidad de inhibir a la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos de los análisis quimioinformáticos y a los ensayos de inhibición enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa se concluye que los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido son potenciales inhibidores de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa, misma a la que se le atribuye la capacidad citotóxica y selectiva de los cardenólidos sobre la línea celular cancerosa A549.

RECOMENDACIONES

Evaluar las posibles vías de señalización que activan los cardenólidos calotropina y corotoxigenina 3-O-glucopiranosido en las líneas celulares de cáncer humano de pulmón (A549).

Explorar el diseño de farmacóforo por medio de un método basado en estructura o por dinámica molecular.

REFERENCIAS

- Abbas, Z., Rehman, S. 2018. Neoplasm. Chapter 6: An overview of cancer treatment modalities. *Intechopen*. <https://www.intechopen.com/chapters/60895>.
- Agrawal, A.A., Boroczky, K., Haribal, M., Hastings, A.P., White, R.A., Jiang, R.W., Duplais, C. 2021. Cardenolides, toxicity and the costs of sequestration in the coevolutionary interaction between monarchs and milkweeds. *PNAS*, 118(16), 1-18.
- Akimova, O.A., Tverskoi, A.M., Smolyaninova, L.V., Mongin, A.A., Lopina, O.D., La, J., Dulin, N.O., Orlov, S.N. 2015. Critical role of the $\alpha 1$ - Na⁺, K⁺-ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain. *Apoptosis*. 20(9): 1200-1210.
- Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A.A., Cabrera-Galeana, P., Motola-Kuba, D., Anaya, P., Rivera-Rivera, S., Cárdenas-Cárdenas, E. 2018. Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gac. Mex. Oncol.* 17:28-34.
- Al-Rajhy, D.H., Alahmed, A.M., Hussein, H.I., Kheir, S.M. 2003. Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii*. *Pest. Manag. Sci.* 59: 1250-1254.
- Bai, Y., Zhu, W., Xu, Y., Xie, Z., Akihisa, T., Manosroi, J., Sun, H., Feng, F., Liu, W., Zhang, J. 2019. Characterization, quantification, similarity evaluation and combination with Na⁺, K⁺-ATPase of cardiac glycosides from *Streblus asper*. *Bioorg. Chem.* 87: 265-275.
- Barret, J.C. 1993. Mechanism of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 100: 9-20.
- Banuls, L.M., Urban, E., Gelbcke, M., Dufasne, F., Kopp, B., Kiss, R., Zehl, M. 2013. Structure-activity relationship analysis of bufadienolides-induced *in vitro* growth inhibitory effects on mouse and human cancer cells. *J. Nat. Prod.* 76(6): 1078-1084.

- Boik J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. 1st Edition. Oregon Medical Press, LLC. Minesota, EE.UU. ISBN 0-9648280-1-4.
- Boulton, S., Selvaratnam, R., Blondeau, J.P., Lezoualc'h, F., Melacini, G. 2018. Mechanism of selective enzyme inhibition through uncompetitive regulation of an allosteric agonist. *J. Am. Chem. Soc.* 140: 9624-9637.
- Bramer, C., Dobler, S., Deckert, J., Stemmer, M., Petschenka, G. 2015. Na⁺/K⁺-ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae). *Proc. Royal Soc. B.* 282(1805): 1-9.
- Bravo-Gómez, M.E., García-Ramos, J.C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L. 2009. Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinate)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *J. Inorg. Biochem.* 103(2):299-309.
- Calderón-Montaña, J.M., Burgos-Morón, E., López-Lázaro, M. 2014. The in vivo antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. *Oncogene.* 33: 2947-2948.
- Clausen, M.V., Hilbers, F., Poulsen, H. 2017. The structure and function of the Na, K,-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.* 8(371): 1-16.
- Colovic, M., Krstic, D., Krinulovic, K., Momic, T., Vijacic, A., Vasic, V. 2009. Na⁺/K⁺-ATPase: activity and inhibition. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 83(9): 1602-1608.
- Compton, C. 2020. Cancer: the enemy from within. Ed. Springer Nature. Cham, Suiza. ISBN 978-3-030-40651-6.
- Cornelius, F., Kanai, R., Toyoshima, C. 2013. A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 228(9): 6602-6616.
- Cornish-Bowden, A. 1986. Why is uncompetitive inhibition so rare?. *FEBS.* 203(1):3-7.

- Cui, X., Xie, Z. 2017. Protein interaction and Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction. *Molecules*. 22(990): 1-20.
- Dar, A.M., Mir, S. 2017. Molecular docking: Approaches, types, applications and basic challenges. *J. Bioanal. Tech.* 8(2): 1-3.
- Dunn, D.E., He, D.N., Yang, P., Johansen, M., Newman, R.A., Lo, D.C. 2011. In vitro and in vivo neuroprotective activity of the cardiac glycoside oleandrin from *Nerium oleander* in brain slice-based stroke models. *J. Neurochem.* 119(4):805-814.
- Durlacher, C.T., Chow, K., Chen, X.W., He, Z.H., Zhang, X., Yang, T., Zhou, S.F. 2015. Targeting Na⁺/K⁺-translocating adenosine triphosphatase in cancer treatment. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42: 427-443.
- El-Seedi, H.S., Khalifa, S.A.M, Taher, E.A., Farag, M.A., Saeed, A., Gamal, M., Hegazy, M.E.F., Youssef, D., Musharraf, S.G., Alajlani, M.M., Xiao, J., Efferth, T. 2019. Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. *Pharmacol. Res.* 141: 123-175.
- Esposito, E.X., Hopfinger, A.J., Madura, J.D. 2004. Chemoinformatics. Chapter 6: Methods for applying the Quantitative Structure-Activity Relationship paradigm. *Methods Mol. Biol.* Ed. Humana Press. Nueva Jersey, EE.UU.
- Faller, L.D. 2008. Mechanistic studies of sodium pump. *Arch. Biochem. Biophys.* 476: 12-21.
- Fan, J., Fu, A., Zhang, L. 2019. Progress in molecular docking. *Quant. Biol.* 7(2): 83-89.
- Faubert, B., Solmonson, A., De Berardinis, J. 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*. 368(152): 1-10.
- Fernando, J., Jones, R. 2015. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery*. 33(3): 131-135.
- Geering, K. 1997. Na/K-ATPase. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 6: 434-439.

- Geering, K. 2008. Functional roles of the Na, K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17: 526-532.
- Gonçalves de Albuquerque, C.F., Ribeiro-Silva, A., da Silva, C.I., Castro-Faria-Neto, H.C., Burth, P. 2017. Na/K-pump and beyond: Na/K-ATPase as modulator of apoptosis and autophagy. *Molecules.* 22(578): 1-18.
- Hassan-Baig, M., Ahmad, K., Roy, S., Ashraf, J.M., Adil, M., Haris-Siddiqui, M., Khan, S., Kamal, M.A., Provaznik, I., Choi, I. 2016. Computer aided drug design: success and limitations. *Curr. Pharm. Des.* 22: 572-581.
- Heins, M., Wahl, J., Lerch, H., Kaiser, F., Reinhard, E. 1978. Preparation of beta-methyldigoxin by hydroxylation of beta-methyldigitoxigenin in fermenter cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Med.* 33(1): 57-62.
- Hosseini, M., Taherkhani, M., Nohooji, M.G. 2017. Introduction of *Adonis aestivalis* as a new source of effective cytotoxic cardiac glycoside. *Nat. Prod. Res.* 1-6.
- Izquierdo, Y., Pérez-Alonso, N., Jiménez, E. 2010. Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos. *Biot. Veg.* 10(3): 131-141.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Karlsh, J.D. 2003. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 817-849.
- Jung, J., Ryu, S., Ki, I.A., Woo, H.A., Lee, K. 2018. Some biological consequences of the inhibition of Na, K-ATPase by Transitionally Controlled Tumor Protein (TCTP). *Int. J. Mol. Sci.* 19(1657):1-14.
- Kaplan, J.H. 2002. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 511-535.
- Khatri, H.R., Bhattarai, B., Kaplan, W., Li, Z., Curtis-Long, M.J., Aye, Y., Nagorny, P. 2019. Modular total synthesis and cell-based anticancer activity evaluation of ouabagenina and other cardiotonic steroids with varying degrees of oxygenation. *J. Am. Chem. Soc.* 141: 4849-4860.

- Kenakin, T.P. 2012. Enzyme as drug targets. Pharmacology in drug discovery: Understanding drug response. Chapter 6. Elsevier. EE.UU. 105-123.
- Kier, L.B., Hall, L.H. 1990. An electrotopological-state index for atoms in molecules. *Pharmacol. Res.* 7(8):801-807.
- Kreis, W., Muller-Uri, F. 2013. Cardenolide aglycone formation in *Digitalis*. Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms. New concepts and experimental approaches. Chapter 29. Springer, EE.UU. 425-428.
- Krishna, A.B., Manikyam, H.K., Sharma, V.K., Sharma, N. 2015. Plant cardenolides in therapeutics. *Int. J. Indig. Med. Plants.* 48(2): 1871-1896.
- Krstic, D., Krinulovic, K., Spasojevic-Tisma, V., Joksic, G., Momic, T., Vasic, V. 2004. Effects of digoxin and gitoxina on the enzymatic activity and kinetic parameters of Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19(5): 409-415.
- Laursen, M., Yatime L., Nissen, P., Fedesova, N.U. 2013. Crystal structure of the high-affinity Na⁺K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation site. *PNAS.* 110(27):10958-10963.
- Laursen, M., Gregensen, J.L., Yatime, L., Nissen, P., Fedesova, N.U. 2015. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na, K,-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *PNAS.* 112(6): 1755-1760.
- Laza-Loaces, D., Rodríguez-Luis, I., Sardiña-Cabrera, G. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cubana. Plant. Med.* 8(3): 1-12.
- Li, Z., Langhans, S.A. 2015. Transcriptional regulators of Na, K-ATPase subunits. *Front. Cell Dev. Biol.* 3(66):1-17.
- Lindberg, S. 1982. Sucrose and ouabain effects on the kinetic properties of a membrane-bound (Na⁺, K⁺, Mg²⁺) ATPase in sugar beer roots. *Physiol. Plant.* 54: 455-460.

- Liu, R., Sun, H., So, S.S. 2001. Development of quantitative structure-property relationship models for early ADME evaluation in drug discovery 2. Blood-Brain Barrier penetration. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 41(6): 1623-1632.
- Loeb, L., Harris, C.C. 2008. Advances of chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res.* 68(17): 6863-6872.
- Lokendra, O., Rachana, S., Mukta-Rani, B. 2013. Modern drug design with advancement in QSAR: a review. *Int. J. Res. BioSciencies.* 2(1):1-12.
- Lozano-Aponte, J. 2012. ¿Qué sabe Ud. acerca de...QSAR? *Rev Mex Cienc Farm.* 4(2):82-84.
- Mahalakshmi, P.S., Jahnavi, Y. 2020. A review on QSAR studies. *Int. J. Adv. Pharm. Biotech.* 6(2): 19-22.
- Melero, C.P., Medarde, M., San Feliciano, A. 2000. A short review on cardiotonic steroids and their aminoguanidine analogues. *Molecules.* 5: 51-81.
- Meng, X.Y., Zhang, H.X., Mezei, M., Cui, M. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 7(2): 146-157.
- Mijatovic, T., Dufasne, F., Kiss, R. 2012. Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. *Pharm. Pat. Analyst.* 1(1): 91-106.
- Mohamed, N.H., Liu, M., Abdel-Mageed, W.M., Alwahibi, L.H., Dai, H., Ismail, M.A., Badr, G., Quinn, R.J., Liu, X., Zhang, L., Shoreit, A.A.M. 2015. Cytotoxic cardenolides from the latex of *Calotropis procera*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25: 4615-4620.
- Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., Torres-Domínguez, J.A. 2017. Cancer trends in Mexico: essential data for the creation and follow-up of public policies. *J. Global Oncol.* 3(6): 740-748.

- Morsy, N. 2017. Cardiac glycosides in medicinal plants. Aromatic and medicinal plants – back to nature. Chapter 2. *Intechopen*. 29-45.
- Mugpasao, A.N., Omolloh, G., Johnson, J., Gascon, J., Peczuh, M.W., Fenteany, G. 2015. Cardiac glycosides activities link Na⁺/K⁺-ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. *Chem. Biol.* 10: 561-569.
- Muratov, E.N., Bajorath, J., Sheridan, R.P., Tetko, I.V., Filimonov, D., Poroikov, R.P., Oprea, T.I., Baskin, I.I., Varnek, A., Roitberg, A., Isayev, O., Curtalolo, S., Fourches, D., Cohen, Y., Aspuru-Guzik, A., Winkler, D.A., Agrafiotis, D., Cherkasov, A., Tropsha, A. 2020. QSAR without borders. *Chem. Soc. Rev.* 49: 3525-3564.
- Nelson, L., McGrady, A.V. 1981. Effects of ouabain on spermatozoan function: a review. *Arch. Androl.* 7(2): 169-176.
- Newman, R.A., Yang, P., Pawlus, A.D., Block, K.I, 2008. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol. Interv.* 8(1): 36-49.
- Nolte, E., Sobel, A., Wach, S., Hertlein, H., Ebert, N., Muller-Uri, F., Slany, R., Wullich, B, Kreis, W. 2015. The new semisynthetic cardenolide analog 3β-[2-(1-amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin (AMANTADIG) efficiently suppresses cell growth in human leukemia and urological tumor cell lines. *Anticancer Res.* 35(10): 5271-5275.
- Oliveira, P.A., Colaco, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, E., De la Cruz, L.F., Lopes, C. 2007. Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79(4): 593-616.
- Orlov, S.N., Klimanova, E.A., Tverskoi, A.M., Vladychenskaya, E.A., Smolyaninova, L.V., Lopina, O.D. 2017. Na⁺, K⁺-dependent and –independent signaling triggered by cardiotonic steroids: facts and artifacts. *Molecules.* 22(635): 1-27.
- Pagadala, N.S., Syed, K., Tuszynski, J. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophys. Rev.* 9: 91-102.

- Pan, M.H., Chiou, Y.S., Wang, Y.S., Ho, C.T., Lin, J.K. 2011. Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. *Food Funct.* 2: 101-110.
- Pan, Z., Li, Y., Liu, J., Ning, D., Li, D. 2012. A cytotoxic cardenolide and saponin from rhizomes of *Tupistra chinensis*. *Fitoterapia.* 83(8): 1489-1493.
- Pavlovic, D. 2020. Endogenous cardiogenic steroids and cardiovascular disease, where to next? *Cell Calcium.* 86: 1-7.
- Pessoa, M.T.C., Barbosa, L.A., Villar, J.A. 2018. Synthesis of cardiac steroids and their role on heart failure and cancer. *Stud. Nat. Prod. Chem.* Vol. 57. Chapter 3. Elsevier. 79-113.
- Petschenka, G., Fei, C.S., Araya, J.J., Schroder, S., Timmerman, B.N., Agrawal, A.A. 2018. Relative selectivity of plant cardenolides for Na⁺/K⁺-ATPases from monarch butterfly and non-resistant insects. *Front. Plant Sci.* 9: 1-13.
- Piacente, S., Masullo, M., De Neve, N., Dewelle, J., Hamed, A., Kiss, R., Mijatovic, T. 2009. Cardenolides from *Pergularia tomentosa* display cytotoxic activity resulting from their potent inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Nat. Prod.* 72: 1087-1091.
- Pierre, S.V., Xie, Z. 2006. The Na, K-ATPase receptor complex. *Cell Biochem. Biophys.* 46: 303-316.
- Piñeros, M., Abriata, M.G., Bray, F. 2017. Cancer registration for cancer control in Latin America: a status and progress report. *Rev Panam Salud Pública.* 41:1-8.
- Polishchuk, P. 2017. Interpretation of Quantitative Structure-Activity Relationship models: past, present, and future. *J. Chem. Inf. Model.* 57(11): 2618-2639.
- Poulsen, H., Morth, P., Egebjerg, J., Nissen, P. 2010. Phosphorylation of the Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺, K⁺-ATPase. *FEBS Let.* 584: 2589-2595.

- Prada-García, D., Huerta-Yépez, S., Moreno-Vargas, L.M. 2016. Application of computational methods for anticancer drug Discovery, design, and optimization. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 73(6):411-423.
- Prassas, I., Diamandis, E.P. 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat. Rev.* 7: 926-935.
- Prieto-Martínez, F.D., Arciniega, M., Medina-Franco, J.L. 2018. Molecular docking: Current advances and challenges. *Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol.* 21(supl. 1): 68-87.
- Qing, X., Lee, X.Y., Raeymaeker, J., Tame, J.R.H., Zhang, K.Y.J., De Maeyer, M., Voet, A.R.D. 2014. Pharmacophore modeling: advances, limitations, and current utility in drug discovery. *J. Recept. Ligand Channel Res.* 7: 81-92.
- Qiu, L.Y., Koenderick, J.B., Swarts, H.G.P., Willems, P., De Pont, J.J. 2003. Phe⁷⁸³, Thr⁷⁹⁷ and Asp⁸⁰⁴ in transmembrane hairpin M5-M6 of Na⁺,K⁺-ATPase play a key role in ouabain binding. *J. Biol. Chem.* 278(47): 47240-47244.
- Qiu, L.Y., Krieger, E., Schaftenaar, G., Swarts, H.G.P., Willems, P., De Pont, J.J., Koenderick, J.B. 2005. Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na, K, -ATPase in gastric H, K-ATPase by substitution of only seven aminoacids. *J. Biol. Chem.* 280(37): 23349-32355.
- Rajasekaran, S.A., Barwe, S.P., Rajasekaran, A.K. 2005. Multiple functions of Na, K-ATPase in epithelial cells. *Semin. Nephrol.* 25: 328-334.
- Ramsay, R.R., Tipton, K.F. 2017. Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules.* 22(1192): 1-46.
- Ramsay, R.R., Popovic-Nikolic, M.R., Nikolic, K., Uliassi, E., Bolognesi, M.L. 2018. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin. Trans. Med.* 7(3): 1-14.

- Rascón-Valenzuela, L., Velázquez, C., Garibay-Escobar, A., Medina-Juárez, L.A., Vilegas, W., Robles-Zepeda, R.E. 2015. Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J. Ethnopharmacol.* 171: 280-286.
- Rascón-Valenzuela, L.A., Velázquez, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Medina-Juárez, L.A., Gámez-Meza, N., Robles-Zepeda, R.E. 2016. Apoptotic activities of cardenolides glycosides from *Asclepias subulata*. *J. Ethnopharmacol.* 193: 303-311.
- Reinhard, E., Kreis, W., Barthlen, U., Helmbold, U. 1989. Semicontinuous cultivation of *Digitalis lanata* cells: production of β -methyldigoxin in a 300-L airlift bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 34(4): 502-508.
- Reinhard, L., Tidow, H., Clausen, M.J., Nissen, P. 2013. Na^+ , K^+ -ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na^+ , K^+ -ATPase. *Cell. Mol. Life. Sci.* 70: 205-222.
- Ren, Y., Ribas, H.T., Heath, K., Wu, S., Ren, J., Shriwas, P., Chen, X., Johnson, M.E., Cheng, X., Burdette, J.E., Kinghorn, A.D. 2019. Na^+/K^+ -ATPase-targeted cytotoxicity of (+)-digoxin and several semisynthetic derivatives. *J. Nat. Prod.* 83(3): 638-648.
- Reynoso-Noverón, N., Torres-Domínguez, J.A. 2017. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Rev. Latinoam. Med. Conducta.* 8(1): 9-15.
- Roy, M.C., Chang, F., Huang, H., Chiang, M.Y., Wu, Y. 2005. Cytotoxic principles from Formosan milkweed, *Asclepias curassavica*. *J. Nat. Prod.* 68: 1494-1499.
- Roy, K., Kar, S., Narayan-Das, R. 2015. Understanding the basics of QSAR applications in pharmaceutical sciences and risk assessment. Ed. Academic Press. California, EE.UU. ISBN: 978-0-12-801505-6.
- Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R., Lensink, M.F. 2016. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* 9: 1-11.

- Sawlewicz, L., Linde, H.H.A., Meyer, K. 1970. 3-O-phosphoryl-digitoxigenin. *Helv. Chim. Acta.* 53(161): 1382-1385.
- Schlaepfer, L., Mendoza-Espinoza, J.A. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 41(4): 18-27.
- Schneider, N.F.Z., Cerella, C., Lee, J.Y., Mazumder, A., Kim, K.R., de Carvalho, A., Munkert, J., Padua, R.M., Kim, K.W., Christov, C., Dicato, M., Kim, H.J., Han, B.W., Braga, F.C., Simoes, C.M.O., Diederich, M. 2018. Cardiac glycoside glucoevatromonoside induces cancer type-specific cell death. *Front. Pharmacol.* 9(3): 1-17.
- Scheiner-Bobis, G. 2002. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269: 2424-2433.
- Schoner, W. 2002. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur. J. Biochem.* 269: 2440-2448.
- Schulz, W.A. 2007. Molecular biology of human cancer. Springer. Dordrecht, Países Bajos. ISBN 978-1-4020-3186-1.
- Silva, E., Soares-Da-Silva, P. 2012. New insights into the regulation of Na⁺, K⁺ -ATPase by ouabain. Chapter 2. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* Volume 294. Elsevier. Portugal.
- Shiratori, O. 1967. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: in vitro and in vivo studies. *Gan.* 58(6): 521-528.
- Skou, J.C. 1957. The influence of some cations on an adenoside triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* 23: 394-401.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J Clin.* 71: 209-249.

- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Che, Z., Chen, X. 2019. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *Int. j. Food Sci.* 55(1): 33-45.
- Taussky, H.H., Shorr, E., Kurzmann, G. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202: 675-685.
- Therien, A.G., Blostein, R. 2000. Mechanism of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279: C541-C566.
- Tian, D.M., Cheng, H.Y., Jiang, M.M., Shen, W.Z., Tang, J.S., Yao, X.S. 2016. Cardiac glycosides from the seeds of *Thevetia peruviana*. *J. Nat. Prod.* 79(1): 38-50.
- Todeschini, R., Consonni, V., Mauri, A., Pavan, M. 2003. Detecting "bad" regression models: multicriteria fitness functions in regression analysis. *Anal. Chem. Acta.* 515:199-208.
- Tripathi, A., Misra, K. 2017. Molecular docking: A structure-based drug desing approach. *JSM Chem.* 5(2): 1-5.
- Van-Quaquebeke, E., Simon, G., Andre, A., Dewelle, J., El Yazidi, M., Bruyneel, F., Tuti, J., Nacoulma, O., Guissou, P., Decaestecker, C., Braekman, J.C., Kiss, R., Darro, F. 2005. Identification of a novel cardenolide (2''-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivates displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. *J. Med. Chem.* 48: 849-856.
- Veerasamy, R., Rajak, H., Jain, A., Sivadasan, S., Varghese, C.P., Agrawal, R. K. 2011. Validation of QSAR models – strategies and importance. *Int. J. Drug Desing Discov.* 2(3): 511-519.
- Vincent, T.L., Gatenby, R.A. 2008. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 32: 729-737.
- Wang, H.Y., O'Doherty, G.A. 2012. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. *Expert Opin. Ther. Patents.* 22(6): 587-605.

- Weiland, J., Ritzau, M., Megges, R., Schon, R., Watson, T.R., Repke, K.R.H. 1995. Synthesis of acetates of gomphogenin and gomphoside and evaluation of structure-activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* 30(10): 763-767.
- Winnicka, K., Bielawski, K., Bielawska, A., Miltyk, W. 2007. Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* 30(10): 1216-1224.
- Xue, R., Han, N., Ye, C., Wang, L., Yang, J., Wang, Y., Yin, J. 2014. The cytotoxic activities of cardiac glycosides from *Streptocaulon juvenas* and the structure-activity relationships. *Fitoterapia.* 98: 228-233.
- Yang, C.W., Chang, H.Y., Hsu, H.Y., Lee, Y.Z., Chang, H.S., Chen, I.S., Lee, S.J. 2017. Identification of anti-viral activity of the cardenolides, Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors, against porcine transmissible gastroenteritis virus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 332: 129-137.
- Yatime, L., Laursen, M., Morth, J.P., Esmann, M., Nissen, P., Fedesova, N.U. 2011. Structural insights into the high affinity binding cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Struct. Biol.* 174: 296-306.
- Zanchett-Schneider, N.F., Cerella, C., Oliveira-Simoes, C.M., Diederich, M. 2017. Anticancer and immunogenic properties of cardiac glycosides. *Molecules.* 22(1932): 1-16.
- Zhang, X.H., Zhu, H.L., Yu, Q., Xuan, L.J. 2007. Cytotoxic cardenolides from *Streptocaulon griffithi*. *Chem. Biodivers.* 4: 998-1002.
- Cao, Y.L., Zhang, M.H., Lu, Y.F., Li, C.Y., Tang, J.S., Jiang, M.M. 2018. Cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*. *Fitoterapia.* 127: 293-300.
- Zhang, L., Zhang, Z., Guo, H., Wang, Y. 2008. Na⁺, K⁺ -ATPase-mediated signal transduction and Na⁺, K⁺ -ATPase regulation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22: 615-621.

- Zhang, L., Staehr, C., Zeng, F., Bouzinova, E.V., Matchkov, V.V. 2019. The Na, K-ATPase in vascular smooth muscle cells. *Current Topics in Membranes*. Vol. 83. Chapter 6. ISBN. 1063-5823. 151-175.
- Zeino, M., Brenk, R., Gruber, L., Zehl, M., Urban, M., Kopp, B., Efferth, T. 2015. Cytotoxicity of cardiotonic steroids in sensitive and multidrug-resistant leukemia cells and the link with the Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 150: 97-111.
- Zust, T., Mirzaei, M., Jander, G. 2018. *Erysimum cheiranthosides*, an ecological research system with potential as a genetic and genomic model for studying cardiac glycosides biosynthesis. *Phytochem Rev.* 17: 1239-1251.

ANEXOS

Anexo I. Compuestos cardenólidos *tipo digital* y sus geninas usados en el análisis de relación estructura-actividad.

	Compuesto	Citotoxicidad A549 (IC ₅₀)	Autor
A1	Ouabaína	0.0053 µM	Calderón-Montaña et al., 2014
A2	Glucoevatromonósido	0.0193 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A3	Convalotoxina	0.0328 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A4	Digitoxigenina monodigitoxósido	0.0335 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A5	Periplocimarina	0.047 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A6	Digitoxigenina bidigitoxósido	0.0585 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A7	Oleandrigenina 3-(α-L-ramnopiranosido)	0.06 µM	Pan et al., 2012 (<i>Trupista chinensis</i>)
A8	Glicodigifucósido	0.0631 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A9	Periplogenina 3-O-glucósido*	0.065 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A10	3β – [2-(1-amantadin) – 1- on – etilamina] digitoxigenina	0.088 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A11	Cimarina	0.123 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A12	Desacetil lanatósido C	0.133 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A13	Digoxina	0.133 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A14	Digoxigenina bidigitoxósido	0.153 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A15	β-metildigitoxina	0.185 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A16	β - metildigoxina	0.207 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A17	Oleandrigenina	0.219 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A18	β - Acetildigitoxina	0.22 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A19	(3β, 5β)-card-20(22)-enolido, 14-hidroxi-3-[(4-morfolinil acetil) amino]	0.236 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A20	Digoxigenina tetradigitoxósido	0.241 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)

Anexo I. Compuestos cardenólidos *tipo digital* y sus geninas usados en el análisis de relación estructura-actividad. (Continuación)

	Compuesto	Citotoxicidad A549 (IC₅₀)	Autor
A21	Lanatóside C	0.264 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A22	3-(fosfato-O-dimetil)- digitoxigenina	0.276 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A23	16-O-acetil-hidroxiperiplogenina-3- O-β-D-digitopiranosido	0.34 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A24	Digitoxina	0.368	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A25	Glucoevogenina	0.49 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A26	16-O-Acetilhidroxiperiplogenina	0.539 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A27	12β-Hidroxicoroglaucigenina	0.55 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
A28	3-epi-12β-Hidroxicoroglaucigenina	0.604 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
A29	K- Strophantosido	0.607 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A30	Glicogitorósido	0.609 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Digitalis lanata</i>)
A31	Uzargenina (Digitoxigenina)	0.64 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
A32	Digitoxigenina gentobiósido	0.66 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A33	3-(fosfito-O-dimetil)-digitoxigenina	0.795 µM	Schneider et al., 2018 (<i>Semisintético</i>)
A34	Desglucozarina*	0.9 µM	Rascón-Vlza et al., 2015 (<i>Asclepias subulata</i>)
A35	12β-Hidroxicarpogenina	1.01 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
A36	Afrogenina	1.69 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
A37	5β-Hidroxigitoxigenina	1.84 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A38	Corotoxigenina 3-O- glucopiranosido*	2.64 µM	Rascón-Valenzuela et al., 2015 (<i>Asclepias subulata</i>)
A39	Digitoxigenina soforósido	5.6 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A40	Periplogenina	14.4 µM	Xue et al., 2014 (<i>Streptocaulon juvenas</i>)
A41	1β, 3β, 14β-trihydroxy-5β-card-16, 20 (22)-dienolido	26.04 µM	Xue et al., 2014 (<i>S. juvenas</i>)
A42	Evonogenina	27.2 µM	Xue et al., 2014 (<i>S. juvenas</i>)

Anexo II. Compuestos cardenólidos *tipo doble enlace* usados en el análisis de relación estructura-actividad.

	Compuesto	Citotoxicidad A549 (IC₅₀)	Autor
B1	Voruscharina	0.005 µM	Quaquebeke et al, 2005 (<i>Calotropis procera</i>)
B2	UNBS 1450	0.008 µM	Quaquebeke et al, 2005 (<i>Calotropis procera</i>)
B3	Calotropina	0.013 µM	Rascón-Valenzuela et al., 2015 (<i>Asclepias subulata</i>)
B4	Asclepina (Calotropina 3'-acetato)	0.017 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B5	Uscharidina	0.0189 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B6	16α-Acetoxiasclepina	0.0316 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B7	Calactina	0.036 µM	Mohamed et al., 2005 (<i>Calotropis procera</i>)
B8	Calotoxina	0.058 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
B9	3'-metoxi-15β-hidroxicallactina	0.065 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
B10	Uscharina	0.104 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
B11	15β-Hidroxicallactina	0.127 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B12	15β-Hidroxiuscharina	0.157 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
B13	15β-Hidroxicallotropina	0.182 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B14	16α-Acetoxicallotropina	0.186 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B15	16α-Hidroxiiasclepina	0.24 µM	Roy et al., 2005 (<i>Asclepias curassavica</i>)
B16	Afrósido	0.347 µM	Mohamed et al., 2015 (<i>Calotropis procera</i>)
B17	12,16-Dihidroxicallotropina	2.48 µM	Rascón-Valenzuela et al., 2015 (<i>Asclepias subulata</i>)

Anexo III. Cálculo de los descriptores moleculares para las moléculas *tipo doble enlace*.

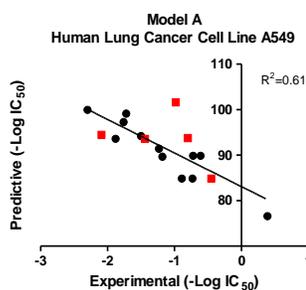
Compound	-Log (1/IC ₅₀)	ALogP ²	LAIndex	Mi	Mv	ETA_Eta_B	ETA_α
B1	-2.3	1.9717	4.828035	7.610785	0.598961	0.84023	19.39997
B2	-2.09	4.4095	3.227321	7.617181	0.600324	0.94639	19.7333
B3	-1.88	4.5296	3.064667	7.62359	0.593202	0.87662	17.49997
B4	-1.76	3.0597	3.586365	7.621271	0.596703	0.98278	18.8333
B5	-1.72	2.4292	3.186449	7.609927	0.601683	0.87662	17.49997
B6	-1.5	4.5642	2.088452	7.62523	0.601099	1.17826	20.49996
B7	-1.44	4.5296	3.064667	7.62359	0.593202	0.87662	17.49997
B8	-1.23	5.5272	1.319067	7.630311	0.594741	0.9491	17.8333
B9	-1.18	6.1806	2.406219	7.631986	0.591785	0.9179	18.3333
B10	-0.98	1.5450	4.515436	7.597809	0.606962	0.84023	19.39997
B11	-0.89	8.3787	0.930023	7.630311	0.594741	0.95591	17.8333
B12	-0.8	4.7110	2.651568	7.617181	0.600324	0.91951	19.7333
B13	-0.73	8.3787	0.930023	7.630311	0.594741	0.95591	17.8333
B14	-0.72	6.3277	1.572997	7.627619	0.598109	1.0721	19.16663
B15	-0.61	6.3277	1.553163	7.627619	0.598109	1.0721	19.16663
B16	-0.45	8.3787	0.930023	7.630311	0.594741	0.95591	17.8333
B17	0.39	12.024	-1.20898	7.636864	0.596242	1.04523	18.16663

Compound	JGT	MLFER_S	DELS	DELS ²	nHBAc c	SHCsatu
B1	0.6509	3.455	72.42638	71.49716	9	1.219699
B2	0.6736	3.653	79.67828	78.69572	10	1.802957
B3	0.6762	3.402	73.86288	73.86288	9	1.227507
B4	0.6690	3.526	80.2648	80.2648	10	1.879249
B5	0.6762	3.577	75.31276	75.31276	9	1.95236
B6	0.6733	3.918	96.63386	96.63386	12	2.763089
B7	0.6762	3.402	73.86288	73.86288	9	1.227507
B8	0.6791	3.603	82.02129	82.02129	10	1.237869
B9	0.6760	3.548	81.22442	81.22442	10	1.317785
B10	0.6509	3.698	73.35353	72.46395	9	1.703779
B11	0.6885	3.67	84.31099	84.31099	10	1.317785
B12	0.6635	3.723	83.01786	82.08288	10	1.309977
B13	0.6885	3.67	84.31099	84.31099	10	1.317785
B14	0.6794	3.794	90.09339	90.09339	11	2.096299
B15	0.6806	3.809	90.3967	90.3967	11	2.034804
B16	0.6885	3.67	84.31099	84.31099	10	1.317785
B17	0.6964	3.968	95.26818	95.26818	11	1.468896

Anexo IV. Cálculos de la validación interna de modelos QSAR para las moléculas *tipo doble enlace*.

Modelo A.

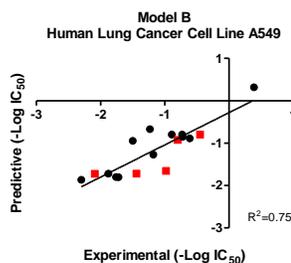
$$-\text{Log}(IC_{50}) = -2.2993 A\text{Log}P_2 + 85.353 Mv - 53.357$$
$$n = 17 \quad RSS = 1.778 \quad R = 0.87 \quad R^2 = 0.75 \quad R_{adj} = 0.72$$
$$RMSE = 0.356 \quad F = 22.75$$



Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo A de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.

Modelo B.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = -40.8592 JGT - 0.6693 LAInd + 27.96314$$
$$n = 17 \quad RSS = 1.769 \quad R = 0.87 \quad R^2 = 0.76 \quad R_{adj} = 0.72$$
$$RMSE = 0.355 \quad F = 22.17$$



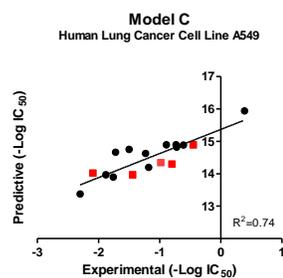
Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo B de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos

Modelo C.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = 3.98306 \text{MLFER}_S - 0.42373 \text{ETA}_\alpha + 7.83359$$

$$n = 17 \quad \text{RSS} = 1.895 \quad R = 0.86 \quad R^2 = 0.74 \quad \text{Radj} = 0.70$$

$$\text{RMSE} = 0.36 \quad F = 20.2$$



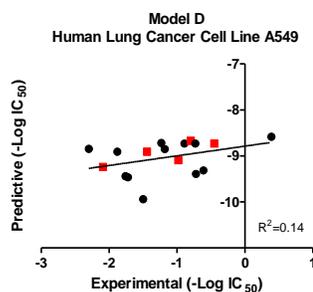
Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo C de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.

Modelo D.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = 4.34186 \text{MLFER}_S - 1.00955 \text{SHCsatu} - 15.41199$$

$$n = 17 \quad \text{RSS} = 1.803 \quad R = 0.86 \quad R^2 = 0.75 \quad \text{Radj} = 0.72$$

$$\text{RMSE} = 0.356 \quad F = 21.6$$



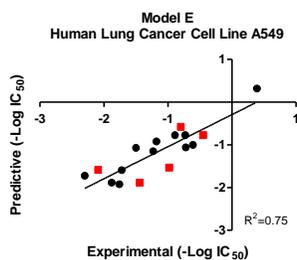
Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo D de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.

Modelo E.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = -12.49956 \text{ETA}_{\text{Eta}_B} + 0.20146 \text{DELS} - 5.80838$$

$$n = 17 \quad \text{RSS} = 1.838 \quad R = 0.86 \quad R^2 = 0.75 \quad \text{Radj} = 0.71$$

$$\text{RMSE} = 0.36 \quad F = 21.08$$



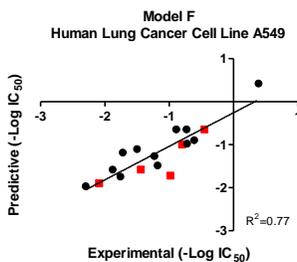
Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo E de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.

Modelo F.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = 0.27069 \text{DELS} - 1.89543 \text{nHBAcc} - 4.51388$$

$$n = 17 \quad \text{RSS} = 1.626 \quad R = 0.88 \quad R^2 = 0.77 \quad \text{Radj} = 0.74$$

$$\text{RMSE} = 0.34 \quad F = 24.7$$



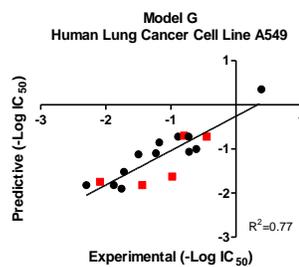
Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo F de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.

Modelo G.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = -13.1563 \text{ETA}_{\text{Eta}_B} + 0.2049 \text{DELS2} - 5.41881$$

$$n = 17 \quad \text{RSS} = 1.623 \quad R = 0.88 \quad R^2 = 0.77 \quad \text{Radj} = 0.74$$

$$\text{RMSE} = 0.34 \quad F = 24.8$$



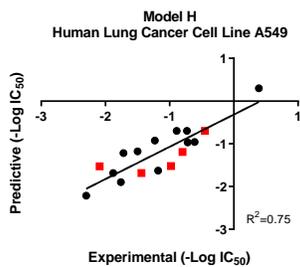
Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo G de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.

Modelo H.

$$-\text{Log}(IC_{50}) = -0.58551 \text{LAI}nd - 39.24085 \text{Mi} + 299.26609$$

$$n = 17 \quad \text{RSS} = 1.81 \quad R = 0.86 \quad R^2 = 0.75 \quad \text{Radj} = 0.71$$

$$\text{RMSE} = 0.359 \quad F = 21.5$$



Valores experimentales vs predictivos del set de prueba interno del modelo G de QSAR por análisis de regresión. Las moléculas utilizadas como set de prueba están marcadas como cuadros rojos.