

Evaluación citotóxica y antioxidante de nuevos híbridos quinolina-chalcona sobre la línea celular tumoral HeLa y las líneas celulares no tumorales Vero y HaCaT

Nicolle Katherine Pineda Rojas

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirector

Bladimiro Rincón Orozco

Doctor en Ciencias Naturales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A mis padres, esto es solo una pequeñísima parte de todo lo que se merecen

A mi abuelo, quien me quería ver triunfando y cumpliendo mis sueños

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, la Facultad de Ciencias y Escuela de Química por darme la oportunidad de haberme formado académicamente.

A los profesores William Hidalgo, mi director, Bladimiro Rincón, mi codirector y Arnold Romero por guiarme a lo largo de todo de este proyecto de investigación, por el conocimiento que me han transmitido, el apoyo, la paciencia que han tenido desde el comienzo, y la confianza que han depositado en mí.

Al Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA) por el apoyo académico y económico, además de la disposición de los herramientas y equipos necesarios para llevar a cabo el proyecto de investigación. A Brigitte Peña y Leidy Sierra por haberme enseñado a cultivar células y todo lo relacionado con su cuidado, por todos sus tips y su paciencia. Y a todos mis compañeros del laboratorio por acogerme y ofrecer su orientación.

Al Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM), a Wilmar Capacho, por haberme dado la oportunidad de trabajar con los compuestos que sintetizó. Gracias por responder mis preguntas hasta el cansancio y no desesperar ante mi desesperación.

A mis padres infinitas gracias, por todo su amor, sacrificio y compañía. A mis hermanos, Pipe y Kevin por hacer mis días más fáciles y bonitos. A Kevin especialmente su inmenso sacrificio de cederme el cargador del pc y el mouse, sus preciados recursos, con toda la amabilidad del mundo.

A mis tíos y mi abuela, gracias a mi tío Jaime por brindarme su apoyo de tantas maneras desde el inicio de mi carrera hasta la culminación de ella. A mi tía Sandra por su compañía incomparable.

A las niñas, Silvia Alarcón, Yenny Ardila, Linda Barrera, Luisa Carvajal y Shary Vargas; y a los amigos que me ha regalado la carrera, especialmente a María Paula Turizo, Camilo Pinto y Alejandro Gómez. No me puedo sentir más afortunada por haber encontrado mi camino con ustedes,

y por haber compartido tantas experiencias únicas y memorables. Gracias por haber creído en mí cuando ni yo misma lo hacía, por alegrarme con sus palabras de aliento, por los bellos momentos, las risas y por ser el verbo *to be* en mi vida.

Tabla de contenido

Introducción.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Marco teórico.....	18
3.1 Estado del arte	18
3.1.1 Rol de algunos antioxidantes exógenos en neoplasias cervicouterinas	18
3.1.2 Actividades biológicas de los híbridos quinolina-chalcona.....	21
3.1.3 Híbridos de quinolina-chalcona como potenciales agentes cancerígenos	22
3.2 El estrés oxidativo	27
3.3 Cáncer de cuello uterino	28
3.3.1 Generalidades.....	28
3.3.2 Virus del papiloma humano.....	28
3.3.3 Relación entre el estrés oxidativo y el cáncer de cuello uterino	29
3.4 Antioxidantes.....	30
3.5 Híbridos quinolina-chalcona.....	31
3.5.1 Generalidades.....	31
3.5.2 Híbridos y precursores sintetizados por el CODEIM	33
3.6 Cultivo Celular	34
3.6.1 Generalidades.....	34
3.6.2 Líneas celulares.....	34
3.6.3 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular	37
3.6.4 Ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales.....	38
3.7 Acoplamiento molecular.....	38
3.8 Perfil ADMET	40
4. Metodología.....	40
4.1 Ensayos de solubilidad	40
4.2 Ensayos de esterilidad	41
4.3 Plaqueo de células	41
4.4 Sembrado de los compuestos.....	43
4.5 Screening de viabilidad celular de MTT a 10 μ M y curva de IC50.....	46
4.6 Ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales.....	47
4.7 Tratamiento de resultados y cálculo de las IC50.....	50
4.8 Acoplamiento molecular.....	50

PROPIEDADES HÍBRIDOS QUINOLINA-CHALCONA	6
4.8.1. Selección de proteínas.....	50
4.8.2. Preparación de las proteínas.....	50
4.8.2. Preparación de los ligandos	51
4.8.3. Acoplamiento molecular	51
4.8.4. Visualización de resultados.....	52
4.9 Predicción del perfil ADMET de los compuestos	52
5. Resultados y discusión.....	52
5.1 Ensayos de solubilidad	52
5.2 Ensayos de esterilidad	55
5.3 Plaqueo de células	58
5.4.1 Screening a 10 μ M.....	59
5.4.2 Curvas de IC50	63
5.5 Ensayo de detección de ROS totales	72
5.6 Acoplamiento molecular.....	85
5.7 Predicción del perfil ADMET	98
6. Conclusiones.....	102
7. Recomendaciones	104

Lista de Tablas

Tabla 1.....	42
Tabla 2.....	58
Tabla 3.....	62
Tabla 4.....	64
Tabla 5.....	66
Tabla 6.....	68
Tabla 7.....	86
Tabla 8.....	90
Tabla 9.....	91
Tabla 10.....	93
Tabla 11.....	96
Tabla 12.....	98

Lista de Figuras

Figura	18
Figura 2.....	19
Figura 3.....	20
Figura 4.....	21
Figura 5.....	23
Figura 6.....	25
Figura 7.....	26
Figura 8.....	27
Figura 9.....	30
Figura 10.....	31
Figura 11.....	32
Figura 12.....	33
Figura 13.....	33
Figura 14.....	35
Figura 15.....	36
Figura 16.....	37
Figura 17.....	38
Figura 18.....	39
Figura 19.....	48
Figura 20.....	50
Figura 21.....	51
Figura 22.....	53
Figura 23.....	54
Figura 24.....	55
Figura 25.....	59
Figura 26.....	63
Figura 27.....	67
Figura 28.....	69
Figura 29.....	70
Figura 30.....	72
Figura 31.....	73
Figura 32.....	75
Figura 33.....	79
Figura 34.....	82
Figura 35.....	85
Figura 36.....	88
Figura 37.....	92

Lista de Apéndices

Apéndice A. Nombres IUPAC de cada compuesto ensayado.....	117
Apéndice B. Ensayos de solubilidad a 10.000 μ M en DMSO.....	118
Apéndice C. Plantillas empleadas en los ensayos in vitro.....	119
Apéndice D. Gráficas de ROS basales para cada línea celular.....	123
Apéndice E. Interacciones entre los compuestos y las enzimas PRDX5, NOX2, AChE y HCK.....	123

Resumen

Título: Evaluación citotóxica y antioxidante de nuevos híbridos quinolina-chalcona sobre la línea celular tumoral HeLa y las líneas celulares no tumorales HaCaT y Vero*

Autor: Nicolle Katherine Pineda Rojas**

Palabras Clave: Híbridos quinolina-chalcona, cáncer de cuello uterino, especies reactivas de oxígeno, cultivo celular, acoplamiento molecular, perfil ADMET.

Descripción: El cáncer de cuello uterino es uno de los cánceres femeninos con mayor incidencia a nivel mundial y en especial en Colombia. El estrés oxidativo, causado por un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al interior de las células, es un factor agravante que promueve la tumorigénesis, promoción, progresión del cáncer y metástasis. Los híbridos conformados por los núcleos químicos de quinolina y chalcona resaltan en la rama de la química medicinal por sus características biológicas, especialmente anticancerígenas y antioxidantes, razón por la cual en este trabajo de investigación se seleccionaron 12 compuestos híbridos quinolina-chalcona y seis precursores sintetizados por el Grupo de Investigación en Compuestos de Interés Medicinal (CODEIM) para evaluar su actividad antiproliferativa y antioxidante.

La actividad citotóxica y antioxidante *in vitro* frente las células HeLa, HaCaT y Vero se llevó a cabo empleando el ensayo de MTT y la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (para detectar ROS), respectivamente. Además, se realizaron estudios *in silico* que incluyeron análisis de docking molecular y predicción del perfil ADMET.

Como resultado, se obtuvo que todos los compuestos exhibieron una baja o moderada citotoxicidad frente a las líneas celulares evaluadas, afectando principalmente las células tumorales HeLa. Se observó una alta capacidad antioxidante por parte de los compuestos 2a, 2b, 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1, los cuales a concentraciones de 10 μ M disminuyeron los porcentajes de ROS en las células HeLa a valores alrededor del 19, 15, 20, 22, 3, 45 y 23%, respectivamente. También se hizo notable la reducción de ROS en las células Vero por la acción de los compuestos 2a y 3b hasta valores del 51 y 47%, respectivamente, a comparación de las células sin tratamiento. Se destaca que el compuesto 3b4 disminuyó las ROS a los valores cercanos obtenidos con el antioxidante, ácido ascórbico (antioxidante utilizado como referencia), los cuales fueron aproximadamente de un 2%. También se observó en las células tumorales que, para la familia de los compuestos con el átomo de nitrógeno en la posición *orto* de la piridina, la hibridación de los precursores, es decir, los compuestos producto de la unión del núcleo de chalcona al precursor de quinolina, provocó una pérdida en su actividad antioxidante. Caso contrario sucedió con los compuestos cuyo átomo de nitrógeno se encontraba en la posición 3 y 4 de la piridina, ya que al pasar del precursor de tetrahydroquinolina al precursor de quinolina, y de este último a los compuestos híbridos, la actividad antioxidante se vio incrementada. El análisis de los ensayos anteriormente descritos permitió conocer que no existe una relación directa entre la actividad citotóxica y la actividad antioxidante expuesta por cada una de las moléculas ensayadas. Además, los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular y de detección de ROS permitieron conocer la posible capacidad de estos compuestos para ser incluidos como coadyuvantes en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Los resultados del acoplamiento molecular sugieren que la disminución de ROS se debe a la inhibición de la enzima oxidasa NADPH 2 (NOX2) por los compuestos 2a, 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1. Estos compuestos mostraron valores de energía de enlace menores que el compuesto de referencia DEX y también exhibieron interacciones esenciales entre el ligando y la proteína. Además, los compuestos híbridos 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1 demostraron características similares en sus interacciones con las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y quinasa de células hematopoyéticas (HCK). Teóricamente, estos resultados podrían implicar propiedades neuroprotectoras, así como posibles efectos antiproliferativos y antiinflamatorios sobre las células hematopoyéticas.

Por último, la predicción del perfil ADMET de todos los compuestos permitió conocer su posible capacidad para presentarse como fármaco y administrarse por vía oral.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor en Ciencias Naturales

Abstract

Title: Cytotoxic and antioxidant evaluation of new quinoline-chalcone hybrids on the HeLa tumour cell line and the non-tumour cell lines HaCaT y Vero*

Author: Nicolle Katherine Pineda Rojas**

Key Words: Quinoline-chalcone hybrids, cervical cancer, reactive oxygen species, cell culture, molecular docking, ADMET profiling

Description: Cervical cancer is one of the most prevalent cancers female cancer globally, with a particularly high incidence in Colombia. Oxidative stress, caused by an imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS) within cells, is a significant contributing factor to the development, progression, and metastasis of cancer. The hybrids formed by the chemical nuclei of quinoline and chalcone stand out in the field of medicinal chemistry for their biological characteristics, especially anticarcinogenic and antioxidant, which is why in this research work 12 quinoline-chalcone hybrid compounds and six precursors synthesised by the Research Group on Compounds of Medicinal Interest (CODEIM) were selected to evaluate their antiproliferative and antioxidant activity. In vitro cytotoxic and antioxidant activity against HeLa, HaCaT and Vero cells was carried out using the MTT assay and the fluorescent probe CM-H₂DCFDA (to detect ROS), respectively. In addition, in silico studies including molecular docking analysis and ADMET profile prediction were performed.

As a result, all compounds exhibited low to moderate cytotoxicity against the tested cell lines, mainly affecting HeLa tumour cells. High antioxidant capacity was observed for compounds 2a, 2b, 3b1, 3b3, 3b4 and 4b1, which at 10 μ M concentrations decreased the ROS percentages in HeLa cells to values around 19, 15, 20, 22, 3, 45 and 23%, respectively. Also notable was the reduction of ROS in Vero cells by the action of compounds 2a and 3b to values of 51 and 47%, respectively, compared to untreated cells. It is noteworthy that compound 3b4 decreased ROS to values close to those obtained by the antioxidant control (ascorbic acid), which were approximately 2%. It was also observed in tumour cells that, for the family of compounds with the nitrogen atom in the ortho position of the pyridine, the hybridisation of the precursors caused a loss in their antioxidant activity. The opposite was true for the compounds with the nitrogen atom in the 3 and 4 position of the pyridine, as the antioxidant activity increased when switching from the tetrahydroquinoline precursor to the quinoline precursor, and from the latter to the hybrid compounds. The analysis of the assays described above showed that there is no direct relationship between the cytotoxic activity and the antioxidant activity exhibited by each of the molecules tested. In addition, the results obtained in the cell viability and ROS detection assays revealed the potential capacity of these compounds to be included as adjuvants in the treatment of cervical cancer.

The results of molecular suggest that the decrease in ROS is due to inhibition of the enzyme NADPH oxidase 2 (NOX2) by compounds 2a, 3b1, 3b3, 3b4 and 4b1. These compounds showed lower binding energy values than the reference compound DEX and also exhibited essential ligand-protein interactions. In addition, the hybrid compounds 3b1, 3b3, 3b4 and 4b1 demonstrated similar characteristics in their interactions with acetylcholinesterase (AChE) and haematopoietic cell kinase (HCK) enzymes. Theoretically, these findings could imply neuroprotective properties, as well as possible anti-proliferative and anti-inflammatory effects on haematopoietic cells.

Finally, prediction of the ADMET profile of all the compounds allowed to determine their potential ability to be presented as a drug and administered orally.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D. in Chemistry. Codirector: Bladimiro Rincón Orozco. Ph.D. in Natural Sciences.

Abreviaturas y acrónimos

AA	Ácido ascórbico
AChE	Acetilcolinesterasa
ADMET	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato –“Adenosine diphosphate”
ATP	Adenosín trifosfato –“Adenosine triphosphate”
CAS	Sitio aniónico o catalítico –“Catalytic or anionic site”
CM-H ₂ DCFDA	5-(y-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato éster de acetilo
CODEIM	Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco – “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
h	Horas
HCK	Quinasa de células hematopoyéticas –“Hematopoietic cell kinase”
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer – “International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima –“Half maximal inhibitory concentration”
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
μL	Microlitros
μM	Micromolar

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato – “Nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate”
NOX2	Oxidasa NADPH 2 –“NADPH oxidase 2”
PAS	Sitio aniónico periférico –“Peripheral anionic site”
PBS	Buffer fosfato salino – “Phosphate-buffered saline”
PDB	Protein Data Bank
PRDX 5	Peroxirredoxina 5
RFU	Unidades relativas de fluorescencia –“Relative Fluorescence Units”
ROS	Especies reactivas de oxígeno – “Reactive oxygen species”
RNS	Especies reactivas de nitrógeno – “Reactive nitrogen species”
RMSD	Desviación cuadrática media – “Root-mean-square deviation”
THQ	Tetrahydroquinolina
VPH	Virus del papiloma humano
WHO	World Health Organization

Introducción

El cáncer de cuello uterino es uno de los tipos de cáncer que más afecta a las mujeres, siendo así que en el año 2020 se registraron 604,000 nuevos casos aproximadamente y la cifra de muertes causada por esta enfermedad sobrepasó el valor de 342,000 en todo el mundo (Cohen et al., 2019; World Health Organization: WHO, 2023). Además, es reportado que es el tipo de cáncer más diagnosticado en 23 países y el tipo de cáncer por el que más se producen muertes en 36 países, los cuales se ubican en gran parte en Melanesia, Asia suroriental, África subsahariana y Suramérica (Sung et al., 2021).

El cáncer de cuello uterino en Colombia presentó un número de 2300 muertes para el año 2019 (World Health Organization: WHO, 2023). Respecto al año 2020, y basándose en la información tomada del Registro de Cáncer del Área Metropolitana de Bucaramanga, Registro de Cáncer de Cali, Registro de Cáncer de Manizales y el Registro de Cáncer de Pasto, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) registró que las cifras alcanzaron los 4742 nuevos casos, convirtiéndose en el tercer cáncer con mayor incidencia para las mujeres en el país, después del cáncer colorrectal en segundo lugar y el cáncer de mama encabezando la lista (International Agency for Research on Cancer, 2021).

Actualmente, existen varios métodos empleados para tratar el cáncer de cuello uterino, entre los cuales se encuentran la radioterapia, la quimiorradioterapia, la cirugía y la terapia sistémica (*National Comprehensive Cancer Network, 2022*). El uso del cisplatino es considerado el procedimiento estándar en la implementación de la quimioterapia como terapia sistemática; sin embargo, los considerables porcentajes de recaídas y de riesgo de fracaso terapéutico, además del desarrollo de resistencia hacia el fármaco, está impulsando la búsqueda de las alternativas que ofrezcan mayor seguridad y éxito, tanto durante, como después del tratamiento (Gupta et al., 2018; Bhattacharjee et al., 2022).

Por otro lado, el principal responsable de causar el cáncer cervicouterino, es el virus del papiloma humano (VPH). Este virus cuenta con más de 25 tipos, y son los VPH 16 y VPH 18 dos de los tipos considerados como de alto riesgo para el desarrollo de neoplasias, pues provocan aproximadamente la mitad de las lesiones precancerosas malignas (World Health Organization: WHO, 2023; Muñoz et al., 2003).

La infección por el virus del VPH se encuentra estrechamente relacionada con el estrés oxidativo (Georgescu et al., 2018; Preci et al., 2020). Este fenómeno es la consecuencia de un estado de desequilibrio, debido al exceso de metabolitos muy reactivos junto con la generación de radicales libres, con relación a la capacidad de eliminación de estos mismos mediante antioxidantes (Ďuračková, 2010). De esta manera, las oncoproteínas provenientes del VPH tienen la capacidad de reducir los niveles de antioxidantes, induciendo así estrés oxidativo y posteriormente permitiendo que la infección crónica con el virus pueda generar mutaciones en las células de cuello uterino, una vez la capacidad de reparación del ADN se haya visto comprometida. También se ha declarado que el mismo estrés oxidativo propicia las condiciones para que el cáncer de cuello uterino continúe avanzando (Preci et al., 2020). Ahora bien, el estrés oxidativo no solo está relacionado con la estimulación del crecimiento descontrolado de las células, sino que también se ha reportado que las células cardíacas pueden sufrir daños precursores de enfermedades cardiovasculares, además de provocar la muerte de neuronas desencadenando enfermedades neurodegenerativas (Díez, 2000; Graeber & Moran, 2002).

Frente a la situación planteada, la comunidad científica ha unido esfuerzos en pro del desarrollo de nuevas moléculas que permitan inhibir la sobreproducción de ROS en las primeras manifestaciones neoplásicas de cuello uterino, pues en este periodo la disminución del estrés oxidativo es necesaria para evitar la tumorigénesis (Zinovkin et al., 2023).

Dentro de estas posibles alternativas, los compuestos híbridos quinolina-chalcona son compuestos que han sido estudiados por sus posibles actividades antiparasitarias, antibacterianas, antifúngicas y especialmente citotóxicas y antioxidantes, arrojando resultados prometedores (Abbas et al., 2019; Yepes et al., 2020, Dorababu et al., 2020; Mohamed & Abuo-Rahma, 2020).

De esta manera, 12 nuevos compuestos pertenecientes al grupo de híbridos quinolina-chalcona y seis precursores sintetizados por el grupo de investigación en compuestos orgánicos de interés medicinal (CODEIM), fueron considerados en el estudio para evaluar y analizar su actividad citotóxica y antioxidante.

De acuerdo con toda la información planteada en el presente apartado, este proyecto de investigación se dio respuesta a los siguientes interrogantes: ¿Presentarán estos compuestos actividad citotóxica de manera selectiva en las células tumorales?, ¿presentarán estos compuestos actividad antioxidante en las tres líneas celulares?, ¿existirá una relación entre la actividad antioxidante y la actividad citotóxica?

1. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la actividad antiproliferativa y antioxidante de compuestos híbridos de quinolina-chalconas y sus precursores sobre la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa, la línea celular no tumoral HaCaT y la línea celular no tumoral Vero.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) de los compuestos tipo quinolina-chalcona y sus precursores sobre las líneas celulares de estudio.
2. Evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos tipo quinolina-chalcona y sus precursores sobre las líneas celulares de estudio.
3. Establecer la relación estructura-actividad de los compuestos de estudio frente a su actividad citotóxica y antioxidante.
4. Realizar cálculos *in silico* de las interacciones compuesto-proteínas relacionadas con el estado redox de las células ensayadas

3. Marco teórico

3.1 Estado del arte

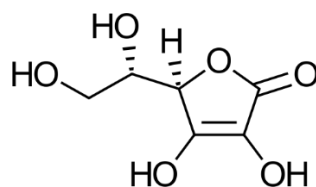
3.1.1 Rol de algunos antioxidantes exógenos en neoplasias cervicouterinas

Un estudio realizado con el fin de ahondar en los efectos de la combinación terapéutica de vitamina C y de cisplatino en células SiHa y células HEK, mostró como resultado una citotoxicidad selectiva hacia las células SiHa. Como conclusión, presentaron la vitamina C como un “suplemento valioso” en el tratamiento del cáncer (Leekha et al., 2016).

En la revisión efectuada por Markowska et al. (2022), se reportaron investigaciones sobre la relación entre la vitamina C y el cáncer de cuello uterino. Para la actividad *in vitro*, la viabilidad de las células HeLa se vio alterada negativamente debido a la acción del ácido ascórbico, además de mejorar la actividad del cisplatino y de la doxorubicina a concentraciones farmacológicas (Sindhvani et al., 2018; Wu et al., 2020) Además, en el artículo de Roberts et al. (2015), se habla de que el ácido ascórbico tiene propiedades prooxidantes sobre las células HeLa a partir de una concentración de 5 mM y que desencadenó procesos apoptóticos a concentraciones entre 7 y 10 mM vía intravenosa. Sin embargo, cuando se avanzó a los ensayos clínicos, los resultados daban cuenta en su mayoría de las fases I y II, a pesar de que se habían obtenido resultados favorables a través de administración vía intravenosa en la fase preclínica, y que no se podía decidir si la incorporación de la vitamina C en los tratamientos sería exitosa hasta que culminaran los ensayos clínicos (Markowska et al., 2022).

Figura 1

Estructura del ácido ascórbico o vitamina C

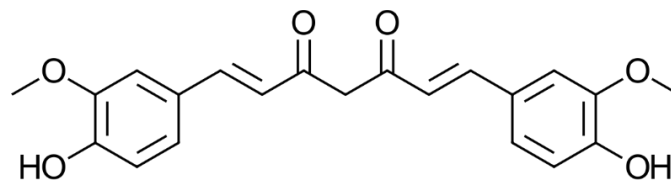


Calaf et al. (2018) realizaron una revisión de la acción de algunos antioxidantes naturales sobre el cáncer de cuello uterino. Entre éstos, surge la curcumina, capaz de regular al alza las proteínas supresoras tumorales p53 y pRb, haciendo decrecer la expresión de la oncoproteína E6 para el caso de la primera proteína supresora, y E7 para el caso de la segunda.

También se demostró que la citotoxicidad se inclinaba selectivamente hacia las líneas celulares SiHa y HeLa contra las células negativas para VPH (Divya & Pillai, 2006). Otro artículo de esta misma revisión concluyó que el papel de la curcumina en la muerte de las células HeLa se debía a que la cromatina pasaba por un proceso de condensación y se inducía, además, daño al ADN (Shang et al., 2016). Ahora bien, Lewińska et al. (2014) documentaron que la curcumina carecía de genotoxicidad hacia las células HeLa, pero sí promovía la apoptosis hacia estas células.

Figura 2

Estructura de la curcumina

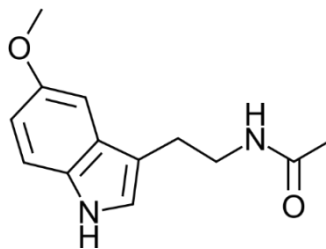


La melatonina también es considerada un antioxidante e inductor de apoptosis (Carlberg, 2000). Una revisión llevada a cabo en 2019 concluyó que esta sustancia además de tener las características mencionadas anteriormente puede mejorar en gran medida la acción de agentes quimioterapéuticos hacia las neoplasias de cuello uterino pero que se necesitaban llevar a cabo más estudios para evaluar su potencial como agente adyuvante (Shafabakhsh et al., 2019). Este

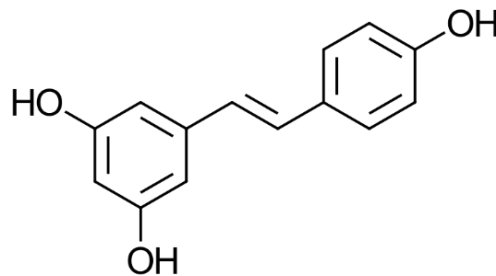
agente quimioterapéutico resultó ser el cisplatino, y la actividad citotóxica en las células HeLa se produjo gracias a la estimulación del receptor MT3 y la inhibición de las vías de mitofagia y la proteína JNK/Parkin (Pariente et al., 2017; Chen et al., 2017). Además, en un estudio *in vivo*, demostró que la melatonina impedía la carcinogénesis cervical en ratones (Anisimov et al., 2000).

Figura 3

Estructura de la melatonina



Otro antioxidante que ha tenido varios estudios se trata del resveratrol. Se ha confirmado que este compuesto polifenólico puede inducir la apoptosis, disminuir la proliferación celular e interrumpir el ciclo celular (Nadile et al., 2022; Zoberi et al., 2002). Se concluyó, además, que la acción terapéutica del resveratrol se debía a la inhibición de la endopeptidasa MMP-9 y a la inhibición de las quinasas JNK y PKC- delta (Woo et al., 2003). En el estudio llevado a cabo por Kramer y colaboradores, se descubrió que el resveratrol a una concentración de 50 μ M podía inhibir la fase S del ciclo celular en células HeLa pasadas 24 horas, pero a las 32-48 horas del tratamiento, se revertía este proceso (Kramer & Węsierska-Gądek, 2009). Si embargo, aún falta que se hagan suficientes ensayos clínicos que determinen el comportamiento del resveratrol como un efectivo agente anticancerígeno (Di Domenico et al., 2012).

Figura 4*Estructura del resveratrol***3.1.2 Actividades biológicas de los híbridos quinolina-chalcona**

Se ha reportado que este tipo de compuestos demostraron tener acción leishmanicida y tripanocida. Las seis moléculas sintetizadas en el artículo de Coa et al. (2017) presentaron una actividad más potente que el antimoniato de meglumina, fármaco empleado en el tratamiento contra la Leishmaniasis, sobre los tipos de parásitos pertenecientes a *L.(V) panamensis*, especie altamente prevalente de *Leishmania* en Colombia. Así mismo, en este estudio, tres híbridos quinolina-chalcona mostraron actividad en contra de *T.cruzi*.

Otro estudio en el que se sintetizaron, entre otros compuestos, híbridos de furanchalcona-quinolina indicó, igualmente, la actividad en contra de *T.cruzi* y *L.(V) panamensis* (García et al., 2017).

Estos trabajos se evaluaron en el artículo de Yepes et al. (2020), en el que se llevaron a cabo procedimientos de docking molecular, dinámica molecular y la similitud farmacológica. Se encontró que los compuestos presentaban óptimas interacciones con la enzima diana cruzipaina de *T.cruzi*, estabilidad durante las simulaciones de dinámica molecular, así como energías de unión, características fisicoquímicas y perfil ADME similares a los fármacos usados. De esta manera, estos híbridos quinolina-chalcona disponen de posible actividad tripanocida

Existen otras propiedades que han sido encontrados en estos híbridos. En la revisión publicada por Dorababu et al. (2020) se habla de actividades contra bacterias, hongos y plasmodium. Las moléculas descritas por Chikhalia et al. (2002) y colaboradores, compuestas por grupos fenilos y pirimidinil exhibieron actividad en contra de microorganismos, tales como: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, y *S. typhi*. Otros estudios han demostrado que esta clase de híbridos pueden actuar en contra de bacterias tanto grampositivas, como gramnegativas, además de presentar actividad antituberculosa y antifúngica (Rao et al., 2017; Prasath et al., 2015; Prasath et al., 2013).

La actividad antipalúdica de híbridos quinolina-chalcona se evidenció en estructuras que incluían el fragmento 7-cloro-4-aminoquinolina y 7-cloro-4- piperazinilquinolina (Sashidhara et al., 2012; Güantai et al., 2011; (Ferrer et al., 2009). Incluso, se evidenció que aquellos que se mencionaron primero, también presentaron actividad citotóxica frente a células tumorales de próstata LNCaP (Ferrer et al., 2009).

El fragmento 7-cloro-4-aminoquinolina en los híbridos quinolina-chalcona, de igual manera, ha ejercido efectos inhibidores de erosiones, lesiones que desarrollan la enfermedad gastrointestinal de úlcera péptica. En este mismo estudio se evaluó el efecto citotóxico de estos compuestos sobre células de estómago aisladas de ratas pertenecientes a la cepa *Sprague-Dawley*. Los resultados no mostraron daños hacia estas células (Sashidhara et al., 2015).

3.1.3 Híbridos de quinolina-chalcona como potenciales agentes cancerígenos

A continuación, se presenta una serie de estudios clasificados según algunos modos de acción de los híbridos y sobre variadas líneas celulares (Mohamed & Abuo-Rahma, 2020):

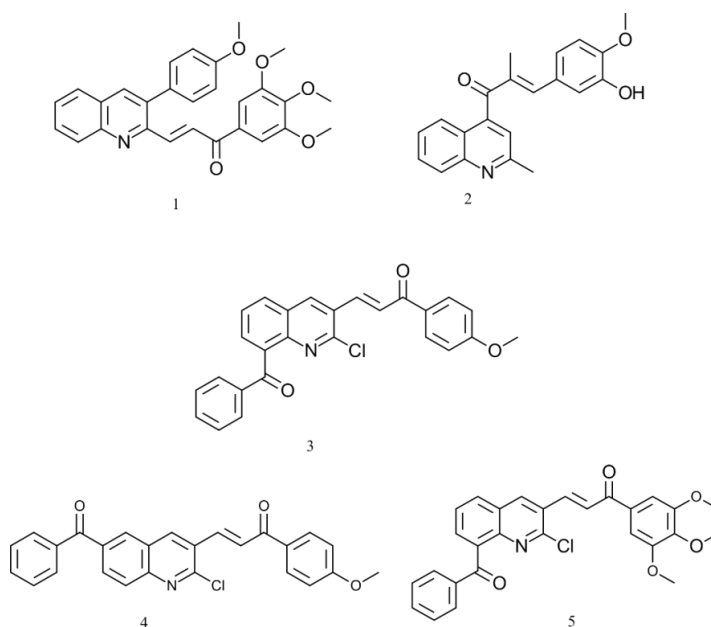
Tseng et al. (2015) sintetizaron un grupo de derivados de 3- fenilquinolinilchalconas y destacaron como compuesto *líder* a la estructura 1 (**Figura 5**), exhibiendo una actividad citotóxica favorable con valores de IC₅₀ de 1.05, 0.75, y 0.78 μ M contra las líneas de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR-3, respectivamente. Para la línea celular no tumoral H184B5F5/M10, la

actividad citotóxica no obtuvo valores relevantes. También se descubrió que estos híbridos actuaban como inhibidores de la polimerización de tubulina e inducir la detención del ciclo celular en la fase G2/M.

En otro estudio realizado sobre híbridos que contenían el fragmento 2- metilquinolina, sobresalió el compuesto 2 (**Figura 5**) que presentaba notable actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales como HepG2, KB, HCT-8 y la línea celular sana L-02. La selectividad del compuesto hacia la línea HepG2 frente a L-02 fue del 65.8, además de presentar un buen perfil de seguridad. Los ensayos mostraron que el compuesto podía inhibir la formación de tubulina, detener la fase G2/M del ciclo celular, impulsar la apoptosis, provocar procesos de despolarización de la mitocondria en células K562, generar estrés oxidativo y ejercer actividad antiangiogénica (Li et al., 2018).

Figura 5

Híbridos de quinolina-chalcona como inhibidores de polimerización



Otro estudio mostró más híbridos quinolina-chalcona que también tienen la capacidad de inhibir la polimerización de la tubulina y que inhiben el ciclo celular en la fase G2/M, y consisten en los compuestos 3, 4 y 5 (**Figura 5**), cuyas estructuras presentan grupos benzoilos. La actividad

citotóxica se evaluó en dos líneas celulares de cáncer de ovario; una de carcinoma resistente al cisplatino (A2780/RCIS) y su progenitora (A2780), y dos líneas celulares de cáncer de mama; una de adenocarcinoma resistente a la mitoxantrona (MCF-7/MX) y su progenitora (MCF-7) y la línea celular HUVEC. Los resultados expusieron una alta actividad antiproliferativa.

Varios estudios han investigado sobre el papel de las quinasas en el desarrollo del cáncer. Rizvi et al. (2012) sintetizaron una serie de moléculas consistentes en chalconas de quinoliltienilo y fueron sometidas a ensayos in vitro para evaluar su actividad inhibitoria de VEGFR-2 y ensayos de proliferación celular para medir los efectos antiangiogénicos sobre células HUVEC (células primarias provenientes de la vena de cordón umbilical humano). Los resultados destacaron el compuesto 6 (**Figura 6**), al mostrar una IC₅₀ de 73.41 nM contra VEGFR-2, además de presentar una IC₅₀ de 21,78 nM contra las células HUVEC. Los estudios de acoplamiento molecular revelaron de este tipo de híbridos se unía favorablemente con el sitio de unión del ATP de VEGFR-2 (Mirzaei et al., 2020).

Otras dos proteínas dianas que cobran relevancia al impedir la proliferación tumoral son la quinasa B (α , β y γ) y la quinasa I κ B (α y β) (Mohamed & Abuo-Rahma, 2020).

El compuesto 7 (**Figura 6**) sobresalió por lograr la mayor inhibición de estas quinasas entre los demás híbridos del estudio, además de exhibir también favorable actividad antiproliferativa contra células de melanoma UACC-903 tanto en modelos in vitro, como in vivo (Barile et al., 2013).

Los compuestos 8-15 (**Figura 6**) tuvieron una notoria actividad inhibitoria hacia la enzima tirosina quinasa EGFR (Mohamed & Abuo-Rahma, 2020; George et al., 2019; Abdelbaset et al., 2019; Ibrahim et al., 2015; Aly et al., 2017). Los compuestos 8 y 9 presentaron actividad citotóxica contra las líneas celulares cancerígenas MCF-7, HeLa y DLD1, mientras que hacia la línea celular sana WI-38 no mostraron actividad citotóxica significativa. Además, el compuesto 8 reveló una actividad inhibitoria (IC₅₀=37,07nM) hacia EGFR comparable con el Gefitinib (IC₅₀=29,16nM), un inhibidor comercial.

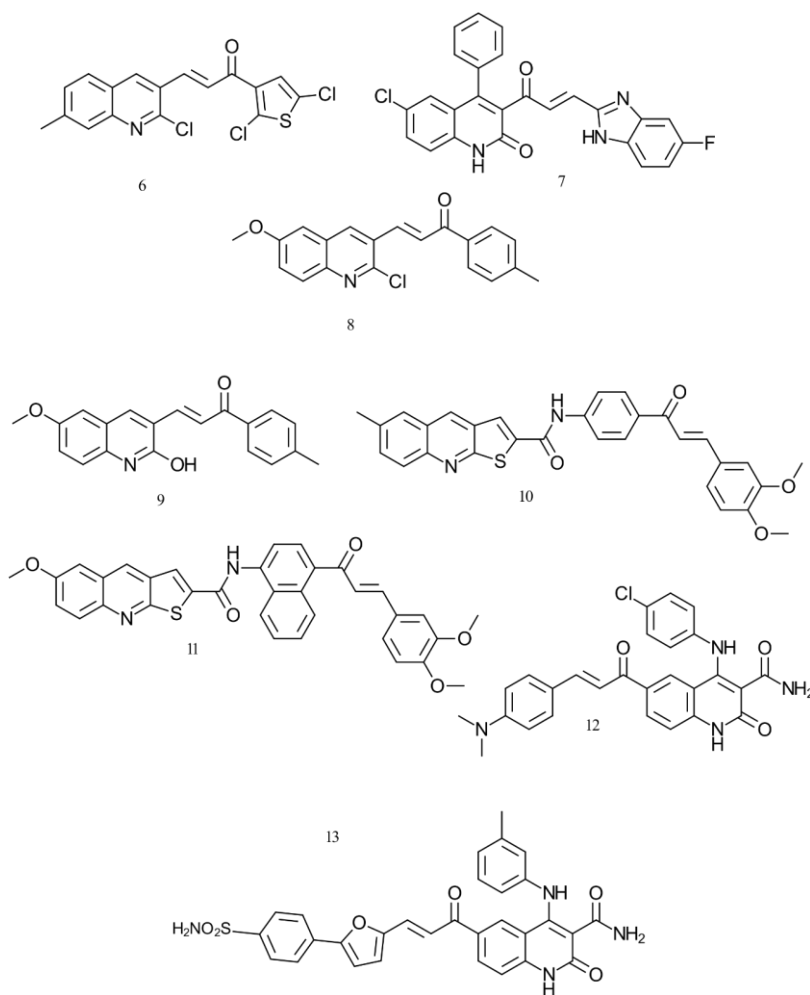
Las tienoquinolinas 10 y 11 (**Figura 6**) tuvieron una destacable actividad antiproliferativa

frente a las líneas celulares cancerígenas PaCa-2, Panc-1, HT-29 y HT 460 y A375. En esta última línea celular, las tienoquiloninas tuvieron una actividad inhibitoria hacia EGFR mejor que el fármaco Erlotinib. Además, el compuesto 11 puede estimular la apoptosis pre G1 y en la detención de ciclo celular en la fase G2/M.

Por último, destacaron los compuestos 12 y 13 (**Figura 6**) debido a su favorable actividad citotóxica frente a la línea tumoral MCF-7 con una $IC_{50} = 3.46 \mu M$ y $IC_{50} = 3.35$, respectivamente, además de una actividad inhibitoria de EGRF de $IC_{50} = 5.283 \mu M$ y $IC_{50} = 2.61 \mu M$, respectivamente.

Figura 6

Híbridos de quinolina-chalcona como inhibidores de quinasas

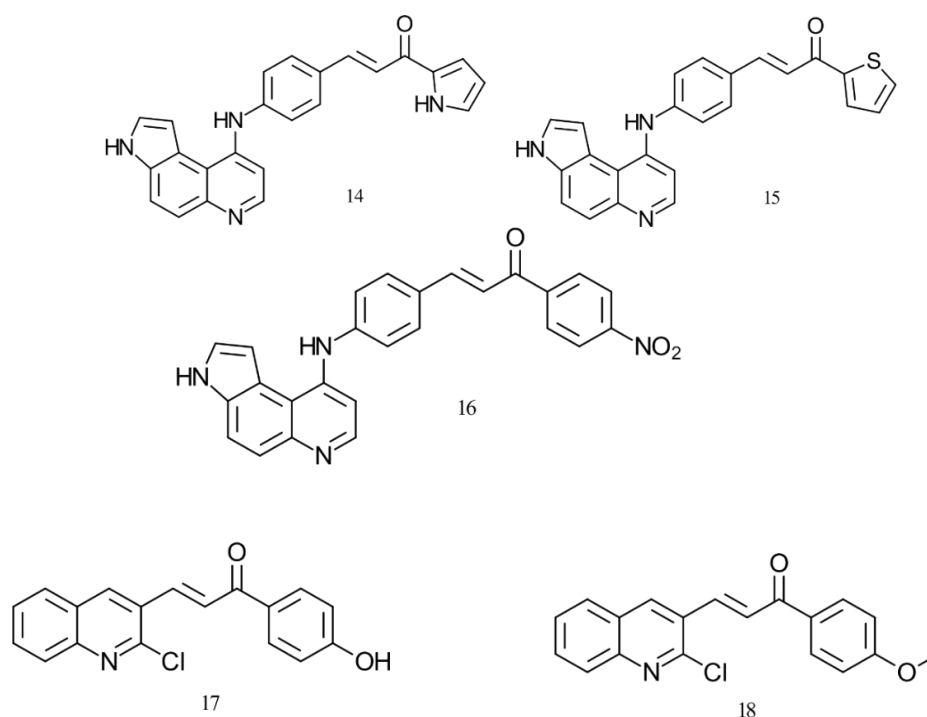


A continuación se presentan híbridos de quinolina-chalcona (**Figura 7**) con la capacidad de intercalarse entre el ADN, afectando así la enzima topoisomerasa II, y la capacidad de fotoescindir el plásmido de *E.coli* pUC19 (Via et al., 2009; (Bindu et al., 2014).

Los compuestos 14 y 15 de pirroloquinolinas sobresalieron también por ofrecer una actividad citotóxica sobresaliente hacia la línea celular de melanoma JR8 con $IC_{50} = 3.3, 2.1$ y $1.2 \mu M$ respectivamente.

Figura 7

Híbridos de quinolina-chalcona que pueden afectar el ADN



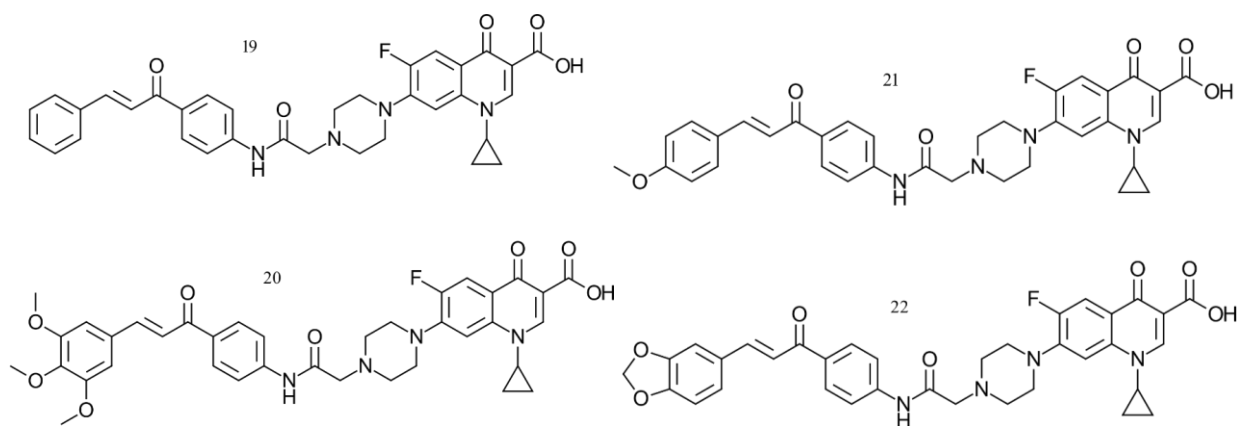
Otro mecanismo en el cual se emplean híbridos de quinolina-chalcona es para la inhibición de las enzimas topoisomerasas de tipo I y de tipo II. Se hizo énfasis en los compuestos 19, 20, 21 y 22 (**Figura 8**) sintetizados Abdel-Aziz et al. (2013).

La molécula 19 mostró actividad citotóxica en contra de las nueve líneas celulares. Encambio, el compuesto 20 se comportó de manera selectiva afectando a la línea celular de leucemia.

Aunque estos compuestos mostraron una buena actividad inhibitoria hacia las topoisomerasas I y II a 100 μ M, los compuestos 21 y 22 exhibieron una notable actividad inhibitoria hacia la topoisomerasa de tipo I a una concentración de 20 μ M, a comparación del fármaco camptotecina, y hacia la topoisomerasa de tipo II a concentraciones de 100 y 20 μ M, a comparación del fármaco etopósido.

Figura 8

Híbridos de quinolina-chalcona como inhibidores de topoisomerasas



3.2 El estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición que compromete el estado redox de la célula, resultado de un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), junto con las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y su eliminación mediante los sistemas antioxidantes. Entre estas especies se encuentran el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido nítrico (HNO_3), el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el radical dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), el radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), y el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Ďuračková, 2010).

Es necesario mantener cierta cantidad de ROS/RNS en el organismo para garantizar el correcto funcionamiento de procesos bioquímicos, como lo son la hidroxilación, la carboxilación, la peroxidación o la modulación de vías para la transducción de señales (Jomová et al., 2023); sin embargo, el exceso de estas mismas puede desencadenar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias y cáncer; ya que los carbohidratos, los lípidos,

las proteínas y los ácidos nucleicos son las moléculas que se ven afectadas (Ďuračková, 2010; Díez, 2000; Graeber & Moran, 2002, Georgescu et al., 2018).

Las fuentes de estos radicales libres y metabolitos pueden ser endógenas y exógenas. Entre las primeras se encuentran las mitocondrias y las NADPH oxidasas, y para las exógenas, la contaminación, el tabaco, la radiación ionizante, la radiación ultravioleta, al igual que algunos fármacos y alimentos (Jomová et al., 2023).

3.3 Cáncer de cuello uterino

3.3.1 Generalidades

El cáncer de cuello uterino hace referencia al crecimiento descontrolado de las células del cuello uterino, la parte inferior angosta del útero que lo conecta con la vagina.

Este tipo de cáncer se puede manifestar principalmente en forma de carcinoma de células escamosas debido a que las células cancerosas comienzan a crecer en el ectocérvix, pero también pueden aparecer en el endocérvix, para así llamarse adenocarcinoma. En algunas ocasiones se puede dar el caso de carcinoma mixto o adenoescamoso, el cual posee los rasgos de ambas neoplasias (Instituto Nacional del Cáncer, s. f.).

Las lesiones que pueden promover el cáncer de cuello uterino, conocidas como neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN por sus siglas en inglés), presentan tres estados o fases nombradas como CIN 1, siendo la lesión leve; CIN 2, como lesión moderada; y CIN 3, lesión grave (**Figura 9**) (Georgescu et al., 2018).

3.3.2 Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus que carece de envoltura y posee una doble cadena de ADN. Su genoma se puede dividir en los genes tempranos (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y genes tardíos (L1 y L2) (Georgescu et al., 2018).

La infección por el virus del papiloma humano es la causante más común de este tipo de neoplasia cervical, presentándose con un porcentaje de más del 95% en la cantidad de casos. Los tipos más

agresivos de este virus, 16 y 18, son los responsables de alrededor de la mitad de las lesiones precancerosas de cáncer cervical, además de que pueden hacer que las lesiones progresen hasta convertirse en carcinoma cervical intrusivo (World Health Organization: WHO, 2023; Muñoz et al., 2003; Ojha et al., 2022).

El ADN del virus una vez ha infectado la célula, se puede ubicar de tres maneras: incorporado al ADN celular (integrado), suelto en el núcleo celular (episomal) y existiendo de las dos maneras (mixta) (López, & Aristizábal., 2006).

3.3.3 Relación entre el estrés oxidativo y el cáncer de cuello uterino

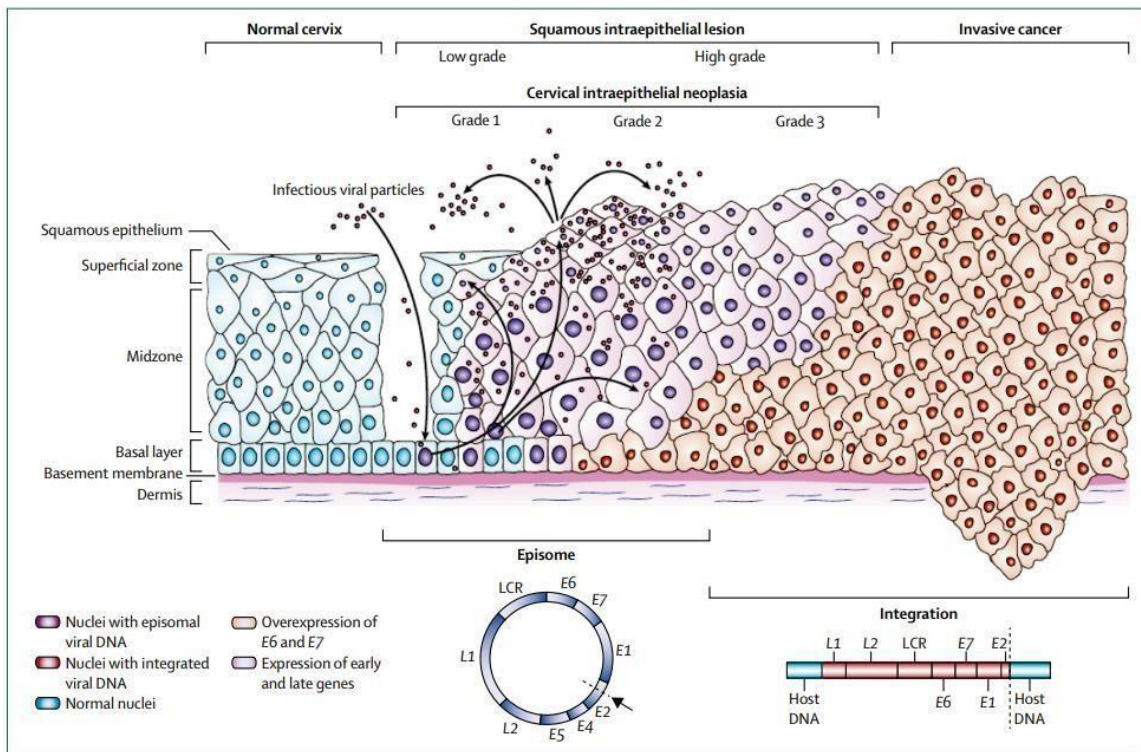
Cuando el VPH infecta las células que se encuentran en la capa basal del cuello uterino, los glóbulos blancos se ven impulsados a provocar reacciones inflamatorias como mecanismo de defensa. Esto puede hacer que los leucocitos granulares y los macrófagos produzcan una alta cantidad de ROS, que causan pérdidas de purinas, alteraciones en las bases de purina y pirimidina y pueden desencadenar la rotura del mismo ADN. De esta manera, es posible la integración los genes del VPH en el ADN de la célula y el inicio de la carcinogénesis (**Figura 9**) (Calaf et al., 2018; Georgescu et al., 2018, Ojha et al., 2022). Ahora, la condición mencionada anteriormente no es la única responsable de la generación de ROS. La infección del virus que continúa manifestándose y el metabolismo de las células afectadas y transformadas también facilitan el estrés oxidativo (Silva et al., 2018).

Las oncoproteínas E6 y E7 de este virus son responsables de alterar la función de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB, e incluso de causar irregularidades en proteínas relacionadas con la resistencia a la apoptosis, la proliferación de células epiteliales y la respuesta inmunitaria (**Figura 9**). La acumulación de este tipo de modificación da paso y mantiene la proliferación de las células de cuello uterino (Silva et al., 2018).

Además de que los oncogenes E6 y E7 tienen un papel fundamental en la inhibición de las proteínas supresoras de tumores, también se relacionan con la inflamación crónica del cuello uterino junto con el oncogén E5, pues regulan al alza la enzima ciclooxigenasa COX-2, la cual produce prostaglandinas que pueden promover la proliferación celular, la detención de la apoptosis y la angiogénesis (Georgescu et al., 2018)

Figura 9

Proceso de infección del VPH y desarrollo de carcinoma cervical



Fuente: Tomado de “Human papillomavirus and cervical cancer” (p. 170), por E.J. Crosbie y et al., 2013, *The Lancet*, 382 (9895)

3.4 Antioxidantes

Un antioxidante es aquella sustancia que tiene la capacidad de evitar que otra especie existente en el medio se oxide, llevando a cabo este proceso ella misma, ya que pueden reaccionar con los

radicales libres (Londoño, 2012). Los sistemas antioxidantes de defensa que presenta el organismo se clasifican en enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasas (GST), pacientes con cáncer cervicouterino presentan, catalasas (CAT) y el sistema tiorredoxina (Trx-R); así como antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), las vitaminas y los carotenos. Sin embargo, los pacientes con cáncer cervicouterino exhiben pocas cantidades de algunas de estas sustancias como GSH, GPx, GST, SOD, la vitamina E y la vitamina C. Las hipótesis acerca de la causa de este fenómeno proponen que las células tumorales captan las especies antioxidantes de la circulación de los pacientes, también el consumo en exceso de los antioxidantes por estas mismas células que están siendo afectadas por los altos niveles de ROS, y en algunos casos, la malnutrición (Vaiyapuri et al., 2002).

Ahora bien, las células cancerosas tienen una gran capacidad para contrarrestar el efecto del estrés oxidativo, produciendo en gran cantidad antioxidantes como SOD y CAT, a la vez que la actividad apoptótica se ve inhibida (Georgescu et al., 2018).

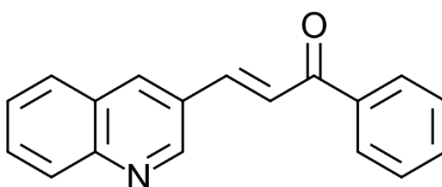
3.5 Híbridos quinolina-chalcona

3.5.1 Generalidades

Los compuestos híbridos conformados por moléculas de quinolina y chalcona (**Figura 10**) se caracterizan por presentar una variedad de propiedades biológicas y sobresalen en el proceso de descubrimiento de fármacos, especialmente de carácter anticancerígeno (Dorababu et al., 2020; Mohamed & Abuo-Rahma, 2020).

Figura 10

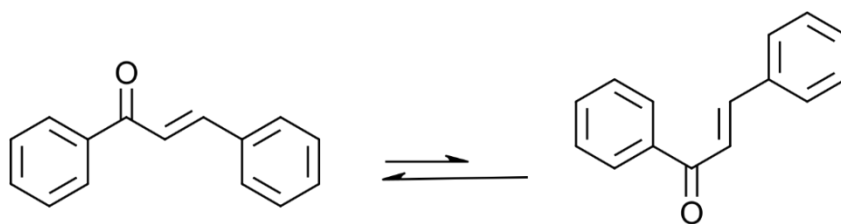
Estructura más simple de un híbrido de quinolina-chalcona



Por un lado, se le llama chalcona a la estructura que exhibe un fragmento 1,3-diaril-2-propen-1-ona y un carbonilo alfa, beta-insaturado. Esta molécula existe principalmente en su forma *trans* debido a su estabilidad termodinámica (**Figura 11**). Las chalconas pueden presentar, entre otras características farmacológicas, actividad antioxidante, antitumoral e inhibidora de tubulina gracias a la capacidad de comportarse como un aceptor de Michael y unirse con variadas moléculas nucleófilas (Mohamed & Abuo-Rahma, 2020; Zhuang et al., 2017)).

Figura 11

Estructura de una chalcona

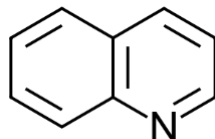


Ahora, las quinolinas son compuestos heterocíclicos nitrogenados (**Figura 12**) que de igual manera tiene una variedad de actividades biológicas y que se pueden destinar al desarrollo de fármacos anticancerígenos. Esto debido a que pueden detener el ciclo celular, la angiogénesis, promover la apoptosis, actuar como inhibidoras de tirosina quinasa y de la polimerización de la tubulina (Mohamed & Abuo-Rahma, 2020).

El átomo de nitrógeno es de gran utilidad en este campo para poder interaccionar con las enzimas dianas (tales como los microtúbulos, los receptores hormonales, la anhidrasa carbónica, la poli-ADP-ribosa polimerasa1 (PARP-1), la Bcl-2, la Hsp90, la NF-kB, la timidilato sintasa y receptores de membrana de quinasa) al formar enlaces de puentes de hidrógeno (Mohamed & Abuo-Rahma, 2020; Lauria et al., 2021).

Figura 12

Estructura de una quinolina



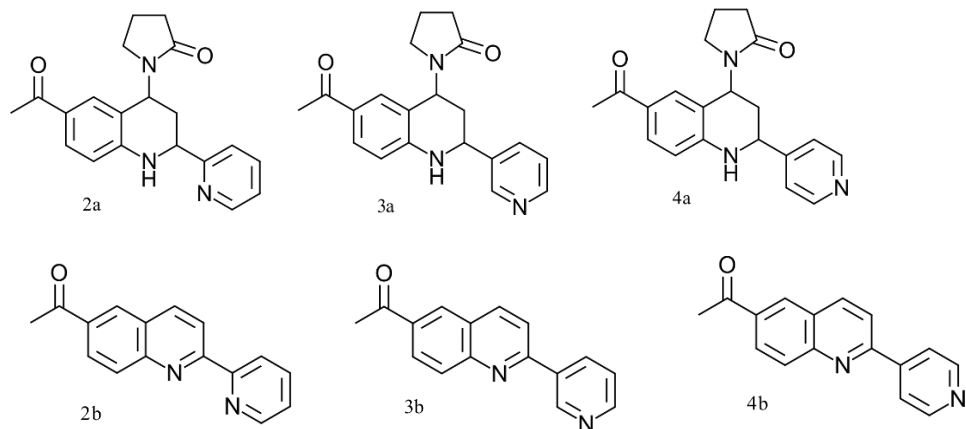
3.5.2 Híbridos y precursores sintetizados por el CODEIM

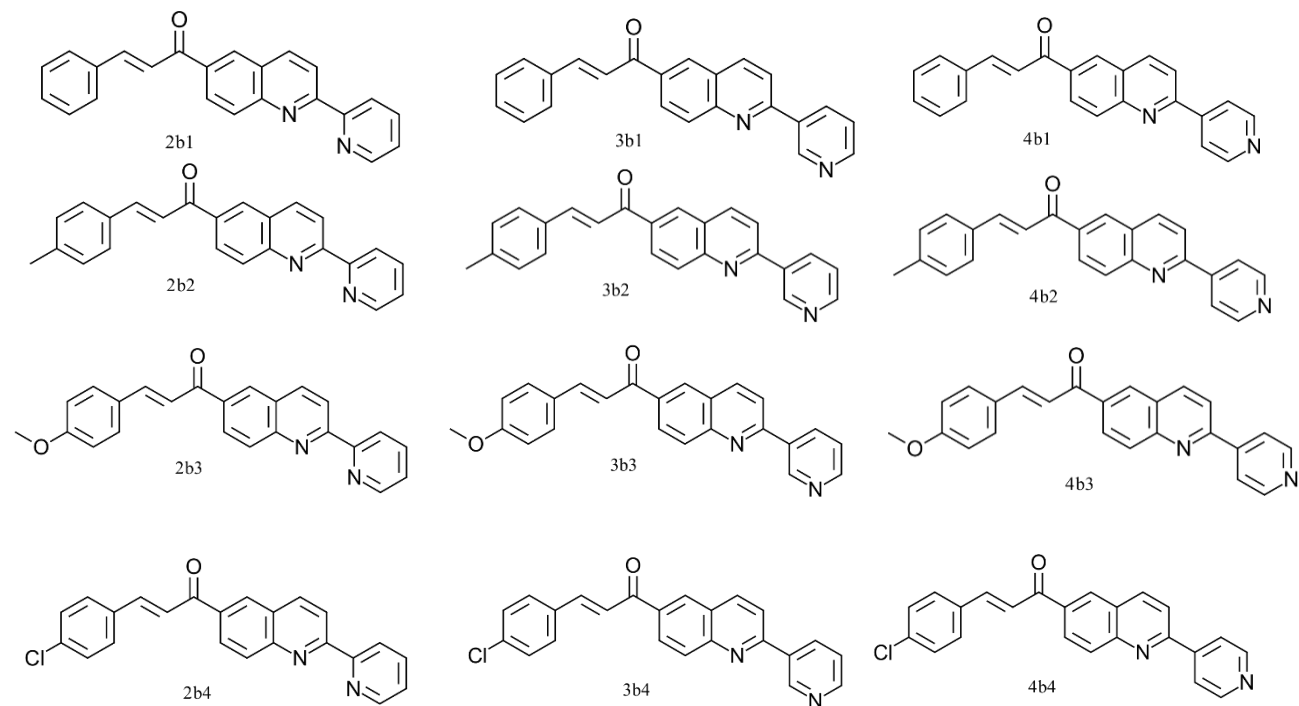
Los compuestos empleados en los ensayos consistieron en tres precursores y 12 híbridos sintetizados por el Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) que se muestran a continuación.

Figura 13

Híbridos y precursores sintetizados por el CODEIM

Los compuestos ensayados se componen de tres familias (2, 3 y 4) correspondientes a la posición del átomo de nitrógeno en el anillo de piridina y, que a su vez, cada familia tiene un precursor de tetrahydroquinolina (2a, 3a, 4a), un precursor de quinolina (2b, 3b y 4b) y tres híbridos quinolina-chalcona. Éstas últimas moléculas se componen de sustituyentes en la posición *para* del anillo A de la chalcona (el anillo más cercano al enlace alfa, beta-insaturado). La información acerca de los nombres IUPAC de cada compuesto se encuentra en el **Apéndice A**.





3.6 Cultivo Celular

3.6.1 Generalidades

Las técnicas y procedimientos que se emplean para procurar el crecimiento o cultivo de células tanto eucariotas como procariontas en entornos fisiológicos hacen referencia al cultivo celular. Usualmente, el cultivo celular está implicado de manera clínica en la simulación de ambientes o sistemas biológicos, para estudiar enfermedades, así como interacciones de sustancias con las células (Segeritz & Vallier, 2017).

3.6.2 Líneas celulares

Las líneas celulares reflejan un linaje de células con características únicas y provenientes de un tejido específico. Todas las células pertenecientes a una misma línea celular comparten el mismo ancestro, por lo tanto, su fenotipo se mantiene estable durante una determinada cantidad de pases. Además, de la ventaja descrita anteriormente, trabajar con estas células en estudios *in*

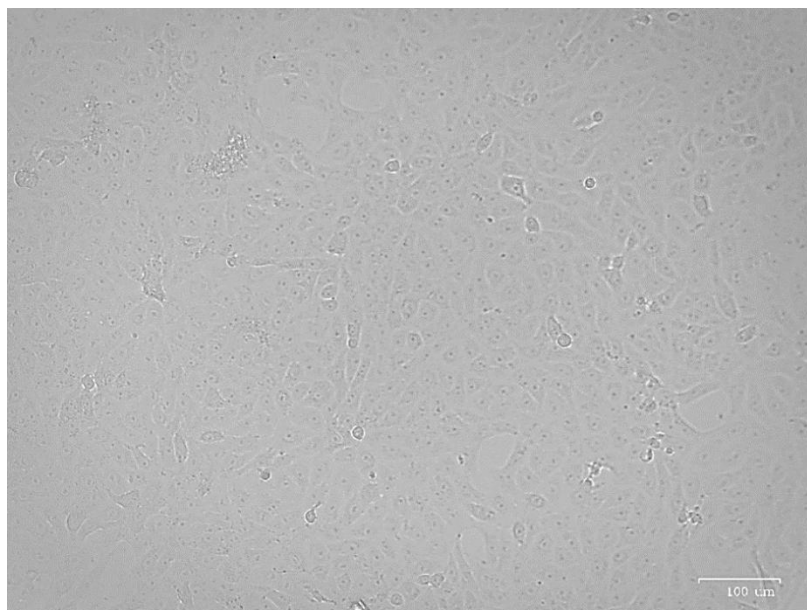
in vitro no es complicado y tampoco se invierte una gran cantidad de tiempo en realizar los pases (Z. Li, 2011).

3.6.2.1 Línea celular Vero

Las células Vero pertenecen al tejido normal de riñón de mono verde africano y fue originada en 1962. Normalmente, estas células se usan en pruebas de micoplasmas, de medios, de eficacia, detección de verotoxina y estudio de la malaria. Son células adherentes que se deben incubar a 37°C y bajo una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂ (Vero - CCL-81 / ATCC, s. f.) (**Figura 14**)

Figura 14

Foto de células Vero tomadas bajo el microscopio



Fuente: Autor

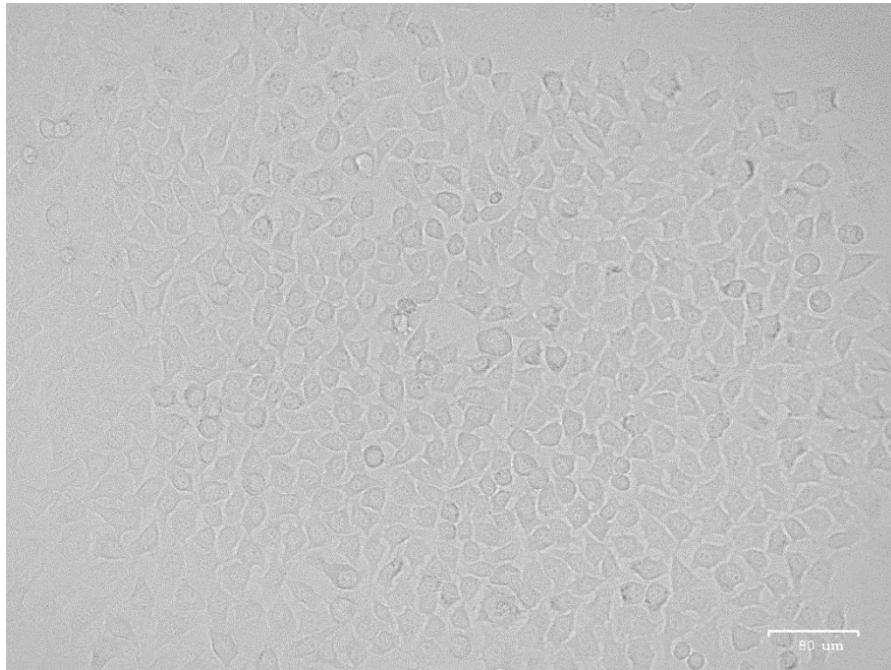
3.6.2.2 Línea celular HeLa

Aisladas en 1951, las células inmortales HeLa fueron las primeras células provenientes de un humano que se cultivaron con éxito. Pertenecían a una paciente de 31 años con adenocarcinoma cervical y están infectadas por el virus 18 de VPH.

Estas células adherentes tienen la característica de que la proteína p53 tiene bajos niveles de expresión, pero niveles normales para pRB. Sus condiciones de cultivo consisten en incubación a 37°C y en un ambiente al 95% de aire y CO₂ al 5% (*HELA - CCL-2 / ATCC*, s. f.) (**Figura 15**)

Figura 15

Foto de células HeLa tomada bajo el microscopio



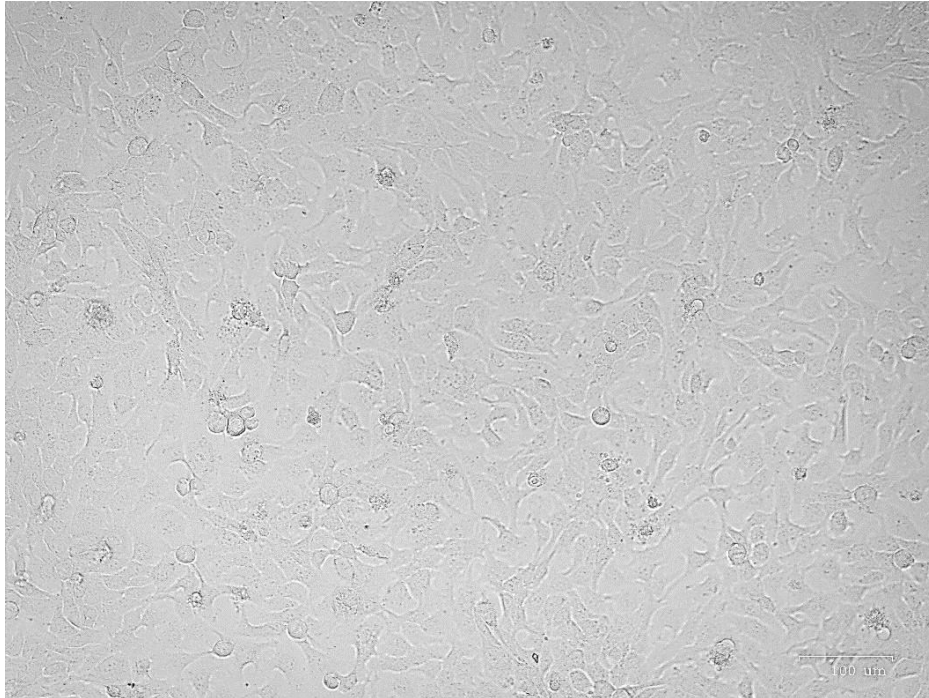
Fuente: Autor

3.6.2.3 Línea celular HaCaT

Estas células pertenecen a una línea celular primaria transformada de queratinocitos epidérmicos humano adulto, por lo que se designan como “inmortales” y son no tumorales (Boukamp et al., 1988). Su incubación se realiza a 37°C y CO₂ al 5% (**Figura 16**).

Figura 16

Foto de células HaCaT tomada bajo el microscopio



Fuente: Autor

3.6.3 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular

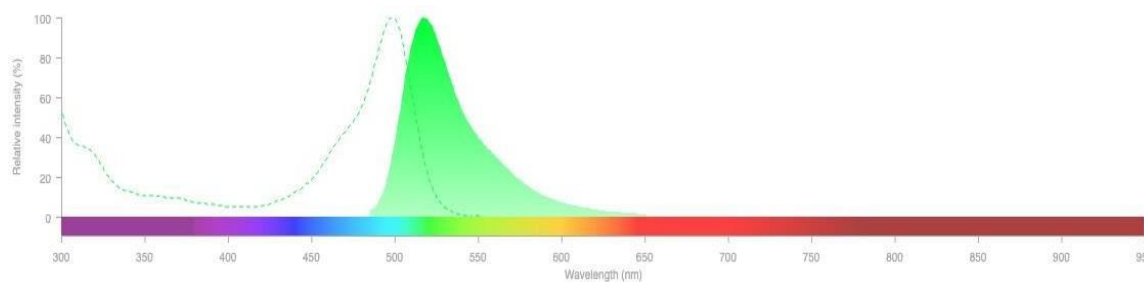
El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es una sal de tetrazolio de color amarillo usada frecuentemente para realizar ensayos colorimétricos de viabilidad y proliferación celular, ya que es un método sin complicaciones para desarrollar, es económico, sensible y la toxicidad se mide rápidamente. Las células viables son capaces de reducir el MTT mediante la enzima mitocondrial deshidrogenasa a formazán. Este producto se manifiesta en forma de cristales de color púrpura, que posteriormente se solubilizan en DMSO, y la absorbancia de éstos se lee a 570 nm (McCauley et al., 2013; Präbst et al., 2017).

3.6.4 Ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales

El 5-(y-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato éster de acetilo (CM-H₂DCFDA) es ampliamente utilizado como una sonda indicadora no específica de ROS en ensayos *in vitro* debido a su permeabilidad, ya que le impide fugarse de la membrana celular. Una vez la sonda ha ingresado a la célula, enzimas esterases se encargan de eliminar los grupos de éster de diacetato (DA), convirtiendo el compuesto en CM-H₂DCF. Las ROS presentes en la célula oxidan dicha molécula en CM-DCF, que tiene la propiedad de ser altamente fluorescente (Su rango de absorción se encuentra en ~492–495 nm y el de emisión en 517–527 nm. Ver **Figura 17**). Esta fluorescencia puede ser medida de manera fiable mediante citometría de flujo, un lector de microplacas o un microscopio de fluorescencia (Forkink et al., 2010; (CM- H₂DCFDA (*General Oxidative Stress Indicator*), s. f.)

Figura 17

Espectro de fluorescencia del CM-DCF



Fuente: (CM-H₂DCFDA (*General Oxidative Stress Indicator*), s. f.)

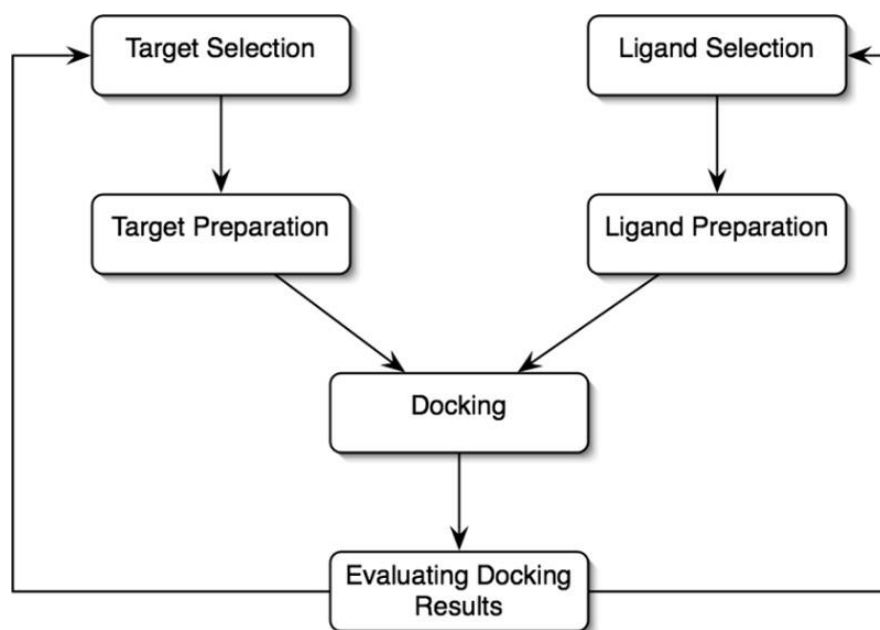
3.7 Acoplamiento molecular

El docking o acoplamiento molecular es designado como un método de diseño de fármacos basado en estructuras computacionales (SBDD). Su función es la de predecir el mejor modo de unión y la conformación ideal de una molécula (ligando) a una macromolécula (proteína). Para esto, durante este proceso se calculan valores como la afinidad de unión y la eficiencia del ligando (Stanzione et al., 2021).

Para asegurar la calidad del acoplamiento, es necesario preparar tanto el ligando, como la proteína **Figura 18**. A la proteína se le deben agregar los átomos de hidrógeno, las cargas y las cadenas laterales que hacen falta, y se le debe remover el solvente según la necesidad al tener en cuenta los puentes de hidrógeno que puede formar. Por otro lado, la optimización del ligando consiste en agregar los hidrógenos correspondientes a pH fisiológico y minimizar su energía (Stanzione et al., 2021).

Figura 18

Diagrama de acoplamiento molecular



Fuente: Tomado de 'Molecular docking,' por G. M. Morris & M. Lim-Wilby, 2008, en A. Kukol (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Vol. 443, Molecular Modeling of Proteins* (pp. 365-382). Springer.

Los resultados del acoplamiento deben atravesar un proceso de validación que permita confirmar que los cálculos se ejecutaron acertadamente. Por lo tanto, el parámetro RMSD se aplica para medir la posición del ligando arrojada por el docking y la posición en la que se encuentra el ligando co-cristalizado.

Para que el docking sea válido el valor de RMSD debe ser menor a 2 Å (Morris & Lim-Wilby, 2008).

3.8 Perfil ADMET

La farmacocinética se encarga de estudiar el recorrido que efectúa una molécula xenobiótica, es decir; un compuesto, una nueva entidad química o un fármaco, desde que ingresa al cuerpo hasta su eliminación (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) (Fan & De Lannoy, 2014). Hodgson (2001) describió su importancia explicando que, independientemente de que un compuesto exhiba excelentes características de actividad y especificidad, no podrá emplearse como fármaco si no entra adecuadamente a un sistema, llega a las partes a las que está asignado abordar y sin sufrir procesos de metabolización antes de ejercer su actividad biológica, y eliminarse apropiadamente. La toxicidad tiene que ver en que el compuesto no cause efectos perjudiciales sin perder su efecto farmacológico.

4. Metodología

A continuación, se presentan los pasos que se llevaron a cabo durante los ensayos de la fase *in vitro* y la fase *in silico*. Cabe aclarar que el cultivo celular, el ensayo de MTT y el ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) se desarrollaron bajo técnicas de asepsia en un laboratorio de nivel bioseguridad BSL-2+ y dentro de una cabina de flujo laminar.

4.1 Ensayos de solubilidad

Cada compuesto se disolvió en un solvente apropiado teniendo en cuenta su polaridad con el fin de evitar la aparición de precipitados o cristales, además de procurar una solución homogénea.

Como primera opción se seleccionó el disolvente DMSO y se pesó la cantidad de compuesto para que la solución alcanzara una concentración de aproximadamente 10.000 μM . El segundo solvente que se tuvo en cuenta en el ensayo fue Tween 80. Para llevar a cabo el ensayo, se depositaron 100 μL de cada compuesto en los pozos de una placa de 96 pozos y se llevaron a observación en el microscopio.

4.2 Ensayos de esterilidad

Para el ensayo de esterilidad en medio líquido, se pipetearon 100 μL de cada compuesto a ensayar para añadirlos en tubos cónicos de 15 mL junto con medio LB (Caldo Luria Bertani) estéril. Se incluyó un tubo que contenía únicamente medio como blanco. Se llevaron a incubación y se revisó si existía el crecimiento de microorganismos desde las 24 h (Vector Core, 2000).

Para el ensayo de esterilidad en medio sólido, se pipetearon 100 μL de cada compuesto en placas Petri con medio LB estéril. Las placas se dividieron en cuatro secciones, y en cada una de ellas se incubó un compuesto preparado como se describió previamente. Nuevamente se incluyó un blanco que contenía medio sin compuesto, apartando una sección de la placa para éste. Se llevaron a incubación y se revisó si existía el crecimiento de microorganismos desde las 24h (MacWilliams & Liao, 2006).

4.3 Plaqueo de células

Las células HeLa (ATCC, CCL-2), Vero (ATCC, CCL-81) y HaCaT (ATCC, PCS-200-010) se cultivaron y mantuvieron en estado viable en frascos de cultivo de 75 cm^2 con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico Pen/Strep 1X. Las tres líneas celulares fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). La incubación de células se llevó a cabo en un ambiente de 5% CO_2 y temperatura de 37 $^\circ\text{C}$.

Se revisó el estado de las células de manera frecuente a través de microscopía óptica, con un microscopio digital ZOE Fluorescent Cell Imager de Bio-Rad (California, USA).

Cada vez que fue necesario realizar un subcultivo o pase celular, se pipeteó el medio de las células y se descartó. Se hizo un lavado con PBS (Buffer fosfato salino) y se agregó tripsina 1X dejando actuar por máximo 10 minutos con el fin de desprender las células del frasco. Una vez se confirmó el desprendimiento observando los frascos en el microscopio, se pipeteó para homogenizar y se transfirió el contenido a un tubo cónico de 15 mL. Para neutralizar la tripsina, se adicionó una cantidad suficiente de DMEM -10% SFB al frasco de cultivo para arrastrar las células que quedaron depositadas en el frasco y luego todo el volumen se adicionó al tubo. El tubo (o los tubos, en caso de que se estuviera haciendo el pase a los tres tipos de células), se llevó a centrifugar a 1600 rpm por 10 min. Al tubo que se llevó a centrifugación, se le descartó el sobrenadante y se agregó medio al pellet de células resuspendiéndolas.

Primero se contaron las células con ayuda del contador CellDrop FL de DeNovix (Wilmington, USA). Se tomaron 10 μ L del tubo resuspendido para que se ejecute un procedimiento de conteo en 1 mL. Posteriormente se realizaron los respectivos cálculos sobre la cantidad de volumen que se debía depositar en cada pozo para que contuviera la cantidad de células requerida (**Tabla 1**). Se agregó también 100 μ L de medio y se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 24h. Para el ensayo de detección de ROS se ocuparon placas de platos negros.

Tabla 1

Número de células por pozo que se deben sembrar para obtener una confluencia del 80% 24h después del paqueo

Línea celular	Cantidad de células para confluencia de 80%
Vero	10.000
HaCaT	20.000
HeLa	20.000

4.4 Evaluación de los compuestos químicos

Después de asegurarse de que la confluencia de las células estuviera aproximadamente al 80%, se prepararon las respectivas soluciones basadas en los cálculos previamente desarrollados para que se llegara a las concentraciones asignadas que dependían del ensayo a realizar de la siguiente manera:

- Screening de viabilidad celular: 10 μ M
- Ensayo de detección de ROS totales: 10 y 50 μ M
- Curva de viabilidad celular para cada compuesto: 5, 10, 20, 50 y 75 μ M

Una vez preparadas las soluciones de los compuestos, se retiraron las placas de cultivo de la incubadora y se retiró el medio al 10%. Por triplicado se dispensaron 100 μ L de las soluciones preparadas con las concentraciones mencionadas; el control de crecimiento, con 100 μ L de DMEM al 2% y los controles de solvente, que consistieron en 100 μ L de solución de DMSO (**Apéndice C**).

Si el ensayo que se llevó a cabo consistió en el de detección de ROS, se asignaron seis pozos con medio y sin compuesto. Por otro lado, al realizar el ensayo de viabilidad celular de MTT, se dejaron tres pozos vacíos.

Finalmente, se llevó la placa a incubación a 37°C con 5% de CO₂.

4.5 Screening de viabilidad celular de MTT a 10 μ M y curva de IC50

Este ensayo colorimétrico se hizo según el protocolo descrito por Mosmann (1983) haciendo uso de la sal de tetrazolio amarilla bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Después de 48 horas de exposición a los compuestos, las placas se llevaron a revisión en el microscopio para observar el estado de las células y se calculó la cantidad que se debía pesar de reactivo para preparar la solución de MTT a una concentración de 1 mg/mL, en un vial de 1,5 mL y en 1 mL de PBS. Una vez se homogenizó por agitación, se pasó a un tubo cónico de 15 mL junto

con 9 mL más de PBS, protegiendo de la luz. Se retiró el medio que se encontraba en la placa y se agregaron 100 μ L de la solución de MTT a cada pozo. Se llevó a incubación a 37°C con 5% de CO₂ por 2 h.

Cuando terminó el tiempo de incubación y se observó formación de los cristales violetas de formazán, se descartó la solución de MTT asegurándose de que no quedara ningún rastro en los pozos. A continuación, se adicionó DMSO para solubilizar los cristales y sobre los pozos blanco. Se esperó 10 minutos para asegurar la solubilización.

Finalmente, se llevó a leer la absorbancia a 570 nm en el lector de microplacas CLARIOStarPlus de BMG LABTECH (Ortenberg, Alemania). Se retiró el DMSO de cada pozo y se descartaron los residuos en el envase para *residuos de citotoxicidad*. La placa se descartó en la cesta roja de residuos biológicos.

4.6 Ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales

La preparación de la sonda se hizo protegiendo de la luz y mediante alícuotas agregando 86,5 μ L de DMSO a un tubo de CM-H₂DCFDA de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA) que contuviera 50 μ g. De esta manera la solución de la sonda fue de 1 mM y posteriormente se empleó para elaborar la solución de trabajo, que consistió en 50 μ L de sonda y 9950 μ L de solución de ringer modificada (*CM- H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator)*, s. f.)

Se sacaron las placas de la incubadora y se retiró el medio al 2% de cada pozo. De los seis pozos con DMEM y sin compuesto, tres de ellos se destinaron como lectura de blanco, razón por la cual no se les adicionó la sonda. A los otros tres (control de crecimiento) y a los demás pozos de la placa sí fue agregada la solución de CM-H₂DCFDA. Las placas se llevaron a incubación durante 30 minutos a condiciones de 37°C y CO₂ al 5% protegiendo de la luz.

Después de culminar el tiempo de incubación, se descartó la sonda de los pozos y se realizó un lavado con 100 μ L la solución de lactato de ringer modificada a cada uno de los pozos.

Se retiraron los 100 μL y nuevamente se lavaron los pozos con la misma cantidad de μL de la solución de lactato de ringer modificada.

Finalmente se llevaron a leer las placas por medio de fluorescencia en el lector de microplacas CLARIOstar Plus de BMG LABTECH (Ortenberg, Alemania) a un rango de longitud de onda de emisión 517–527 nm.

4.7 Tratamiento de resultados y cálculo de las IC₅₀

Los resultados obtenidos por el software CLARIOStar Plus se guardaron en formato de Excel y, a partir de ellos, se realizaron diagramas de caja y bigotes para cada línea celular haciendo uso del programa GraphPad Prism (versión 8.0). De igual manera, en este software se calcularon las IC₅₀ para cada compuesto en el ensayo de citotoxicidad.

4.8 Acoplamiento molecular

4.8.1. Selección de proteínas

Con el fin de trazar una relación y descubrir un posible modo de acción de los híbridos sobre las células, se escogió la enzima peroxirredoxina 5 en complejo con el antioxidante ditioneitol (DTT) (PDB:3MNG) (Hall et al., 2010). Esta proteína fue elegida ya que tiene características citoprotectoras en contra del estrés oxidativo al reducir compuestos como hidroperóxidos de alquilo y peroxinitritos. La PRDX 5 se encuentra en las células de mamíferos, específicamente en la mitocondria, el núcleo, el citosol y los peroxisomas (Knoops et al., 2011).

NOX2 (PDB:2CDU) (Lountos et al., 2006), es una proteína perteneciente a la familia de enzimas oxidasas NADPH (NOX), las cuales son la fuente principal de especies reactivas de oxígeno junto con la cadena respiratoria de la mitocondria. Su mecanismo de actividad consiste en reducir el oxígeno a la especie anión superóxido (O_2^-) y a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de los electrones transportados desde NADPH (Skonieczna et al., 2017).

Para explorar los posibles efectos de las moléculas sintetizadas en otros tipos de células, los compuestos se acoplaron también a la enzima acetilcolinestara cocrystalizado con el fármaco Donepezilo, usado para tratar el Alzheimer (PDB:4EY7) (Cheung et al., 2012), y la enzima tirosina quinasa HCK en complejo con la quercetina, flavonoide con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (PDB:2HCK) (Sicheri et al., 1997). Esta última proteína estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias de células mieloides y factores de crecimiento. Además, permite la supervivencia y proliferación celular, por lo que se ve altamente expresada en varios tipos de leucemia y algunos tipos de cáncer sólido como el de mama y el de colon (Poh et al., 2015).

4.8.2. Preparación de las proteínas

Las proteínas se descargaron del Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>) y en formato PDB. La peroxirredoxina 5 con una resolución de 1.45 Å, la NOX2 con 1.80 Å, la acetilcolinestara con 2.35 Å y la HCK con 3.00 Å.

Se dispuso del software UCSF Chimera (versión 1.17.3) para el tratamiento de las enzimas (Pettersen et al., 2004). Se eliminaron las moléculas de solvente y de iones, se completaron las cadenas de residuos de aminoácidos, se agregaron hidrógenos y se ajustaron las cargas. El campo de fuerza empleado fue AMBER ff14SB (Maier et al., 2015).

4.8.2. Preparación de los ligandos

Para obtener el código SMILES, se dibujó la estructura de cada compuesto en la herramienta online SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>). Una vez completado el proceso, el código se utilizó para adjuntar el compuesto al software Avogadro (versión 1.2.0) (Hanwell et al., 2012). Allí se agregaron los hidrógenos correspondientes a un pH fisiológico (7.4) y se seleccionó el campo de fuerza MMFF94s para proceder con la minimización de la energía de los ligandos (Halgren, 1999).

4.8.3. Acoplamiento molecular

El docking y la validación por re docking se ejecutaron mediante el programa AutoDock Vina, incluido en el software AMDock (Trott & Olson, 2009; Valdés-Tresanco et al., 2020).

Para la validación del método de acoplamiento, se ingresó a AutoDock Vina, se escogieron los correspondientes ligandos y targets; los primeros, siendo los compuestos 2a, 2b, 3b, 3b1, 3b3, 3b4, 4b y 4b1, y los targets, las proteínas anteriormente mencionadas. El pH de trabajo fue de 7.4 y la configuración vina se estableció con los mismos parámetros para todos los acoplamientos realizados, con un número de 10 poses, un valor de *Exhaustiveness* de 8, CPU Performance = 4 y la aplicación de un campo de fuerza AMBER.

En cuanto a las cajas de búsqueda, el tamaño empleado para todos los acoplamientos fue de X:30, Y:30, Z:30 Å. Sin embargo, las coordenadas para el centro de cada proteína fueron diferentes; pues para PRDX5 constaron de X:7.30, Y:41.80 y Z:34.80; en el caso de NOX2, X:19.80, Y:-6.30 y Z:-0.80; para AChE consistieron en X:-14.00, Y:-44.00 y Z:27.00; mientras que X:31.30, Y: 45.50 y Z:98.80 para HCK.

El cálculo del valor de RMSD fue estimado en el sitio web (<https://zhanggroup.org/DockRMSD/>) (Bell & Zhang, 2019).

El docking de cada compuesto seleccionado con cada proteína se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos anteriormente en la validación.

4.8.4. Visualización de resultados

La visualización de las poses de los compuestos arrojados por el acoplamiento molecular y su superposición se obtuvieron del software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC) y el programa empleado para la visibilización de las interacciones proteína-ligando se trató de BIOVIA Discovery Studio Visualizer (BIOVIA Discovery Studio Visualizer. Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA. Release 20.1.0).

4.9 Predicción del perfil ADMET de los compuestos

El cálculo de las propiedades ADMET se hizo mediante la herramienta online SwissADME (Daina et al., 2017).

5. Resultados y discusión

5.1 Ensayos de solubilidad

Es necesario garantizar la completa homogeneización de los compuestos en un solvente, para que sus posteriores soluciones tengan exactamente la concentración que se desea obtener y se minimice la variabilidad de los resultados. Así, los 12 híbridos quinolina-chalcona y sus seis precursores inicialmente se trataron de disolver en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración alrededor de $10.000 \mu\text{M}$. A continuación, se presenta la comparación entre un compuesto que generó cristales (2b2), el pozo vacío y el pozo que solo contenía DMSO las evidencias del ensayo a dicha concentración (**Figura 19**). Dirigirse al **Anexo B** para observar la foto de cada compuesto ensayado.

Figura 19

Solubilidad de los compuestos a $10.000 \mu\text{M}$ en DMSO



Nota. Las fotos fueron tomadas con el microscopio ZOE Fluorescent Cell Imager de Bio-Rad. Las imágenes presentan un aumento de $100 \mu\text{m}$

Como se puede observar, la mayoría de los compuestos no tuvieron problema en disolverse a la concentración anteriormente mencionada en el solvente DMSO. Sin embargo, los compuestos 2b2, 2b4, 4b2 y 4b4 formaron cristales. En sus estructuras, 2b2 y 4b2 poseen un sustituyente metilo en el anillo A de la chalcona, es decir, aquel que se encuentra más cerca al enlace alfa,beta-insaturado, y las estructuras 2b4 y 4b4 presentan un sustituyente cloro en ese mismo anillo. Por otro lado, 2b2 y 2b4 son compuestos que tienen su anillo de piridina con el átomo de nitrógeno en una posición *orto*, mientras que el nitrógeno de la piridina de 4b2 y 4b4 se encuentra en una posición *para*. De igual manera, es válido indicar que ningún compuesto cuyo nitrógeno de la piridina se ubican en una posición *meta* (3b1, 3b2, 3b3 y 3b4) se cristalizó independientemente del sustituyente del anillo A de la chalcona, señalando que esta ubicación, junto con *orto* y *para*, pero exclusivamente con un metoxilo o un hidrógeno unido al anillo A del híbrido garantizan una completa solubilidad a aproximadamente 10.000 μM en dimetilsulfóxido.

Se decidió cambiar el DMSO por Tween 80 en los compuestos que generaron cristales, no obstante, la viscosidad del solvente impidió que éste bajara completamente de la punta de la micropipeta al Eppendorf que contenía el compuesto. Debido a esto, se consideró la opción de preparar la solución del compuesto a una concentración de 5.000 μM en DMSO. Para esto, se tuvo en cuenta que los ensayos de las curvas de IC_{50} no se podían llevar a cabo con estas moléculas a concentraciones mayores de 50 μM , ya que sobrepasaba el límite de 1% de DMSO en las células. Esta condición se establece a causa de que cantidades mayores al 1% de este solvente en contacto con las células tiene efectos tóxicos que conllevarían posiblemente a falsos positivos de los resultados de viabilidad celular (Dludla et al., 2018; Sangweni et al., 2021; Yuan et al., 2014).

Los compuestos que se solubilizaron a 10.000 μM podrían participar en los ensayos hasta máximo una concentración de 100 μM .

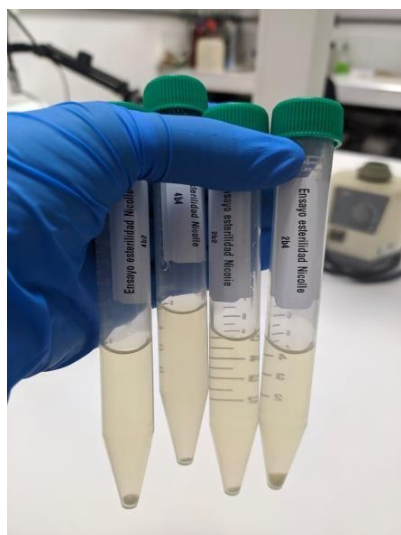
Una vez se volvió a ensayar la solubilidad a la nueva concentración, todos los compuestos que anteriormente cristalizaron se pudieron homogeneizar en DMSO, a excepción del compuesto 2b4, por lo que se tuvo que excluir para los ensayos de viabilidad y actividad antioxidante.

5.2 Ensayos de esterilidad de las soluciones a evaluar

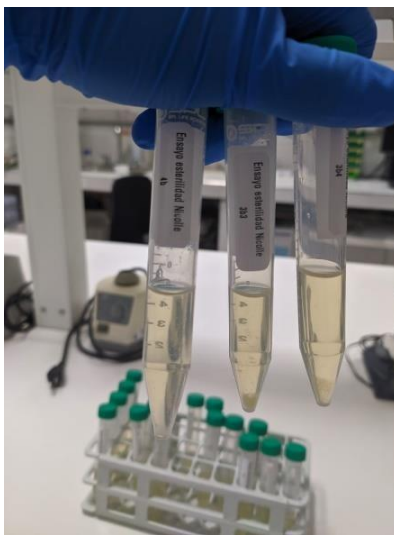
Es igual de relevante asegurar que todos los compuestos con los que se realizarán los ensayos se encuentren libres de cualquier microorganismo que, de igual manera, pueda alterar los resultados de viabilidad de las células. Primero se revisó si hongos o bacterias habían crecido en tubos cónicos llevados a incubación, pero como se puede notar en la **Figura 20**, no se podía tener la certeza de si el precipitado que se formaba en los tubos correspondía al desarrollo de microorganismos o únicamente a la inmiscibilidad de los compuestos en el medio.

Figura 20

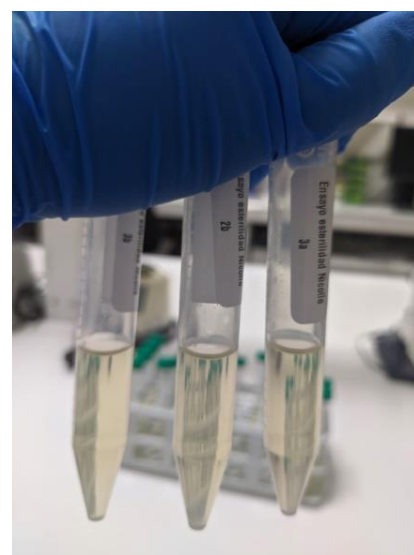
Ensayos de esterilidad en medio LB líquido



(a)



(b)



(c)



(d)



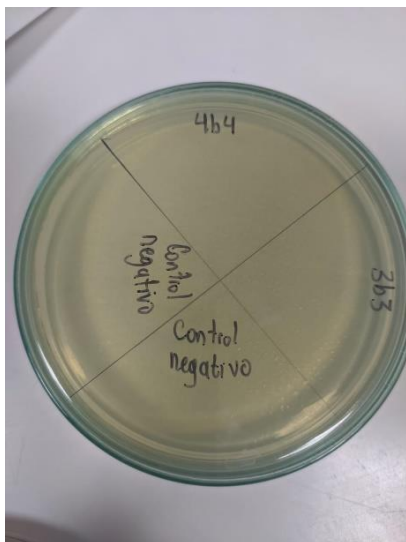
(e)

Nota. Los resultados que se muestran son de a) de izquierda a derecha: 4b2, 4b4, 2b2 y 2b4; b) 4b, 3b3 y 3b4; c) 3b, 2b y 3a; d) 3b1 y 2b1; e) 2a, 4a y blanco.

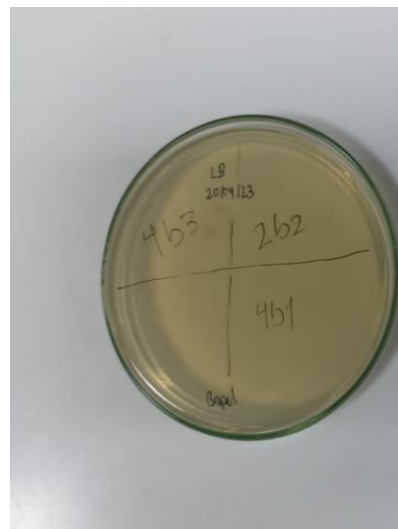
En consecuencia, se llevó a cabo otro ensayo en el que nuevamente 100 μ L de cada compuesto se inocularon en medio LB, pero en esta ocasión, el medio se encontraba sólido y sobre placas Petri. Las placas se revisaron a partir de las 24 horas.

Figura 21

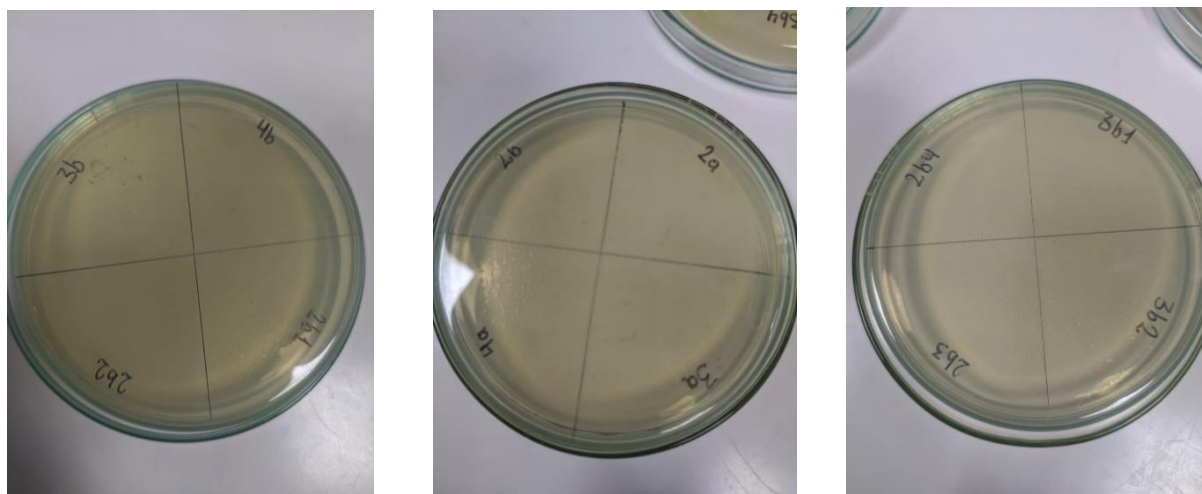
Ensayos de esterilidad en medio LB sólido



(a)



(b)



Nota. Cada caja Petri se dividió en 4 secciones correspondientes a 4 compuestos. Los resultados se presentan a) En dirección de las manecillas del reloj a) 4b4, 3b3, y controles negativos (sin compuesto); b) 4b3, 2b2, 4b1; c) 2a, 3a, 4a, 2b; d) 4b, 2b1, 2b2, 3b y e) 3b1, 3b2, 2b3, 2b4.

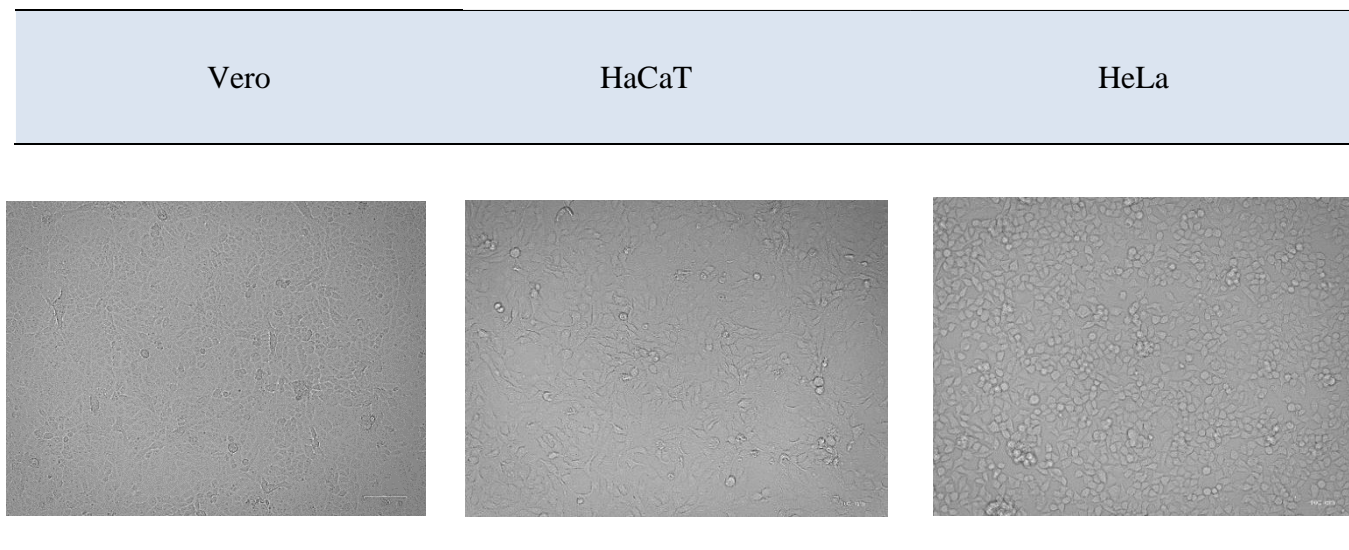
La **Figura 21** muestra que ningún compuesto generó el crecimiento de microorganismos de ningún tipo pasadas 48 horas. Es necesario resaltar que se realizaron ensayos de esterilidad al compuesto 2b4 porque tanto estos ensayos, como lo de solubilidad, se llevaron a cabo de manera simultánea. Sin embargo, cómo se describió anteriormente, los ensayos de MTT y de la sonda fluorescente no se aplicaron a esta molécula.

5.3 Plaqueo de células

La **Tabla 2** exhibe el aspecto de las tres líneas celulares 24 horas de su plaqueo a una confluencia igual o mayor al 80%

Tabla 2

Células 24 h después de su plaqueo



5.4.1 Screening a 10 μM

El procedimiento de cribado inicial de los compuestos se debía ejecutar a una concentración pequeña a fin de conocer aquellas moléculas que disminuyeran la viabilidad de las células a menos del 80% y así identificar compuestos aptos para el ensayo de antioxidación, así como también compuestos con potencial toxicidad selectiva. Dicho esto, la concentración elegida fue de 10 μM .

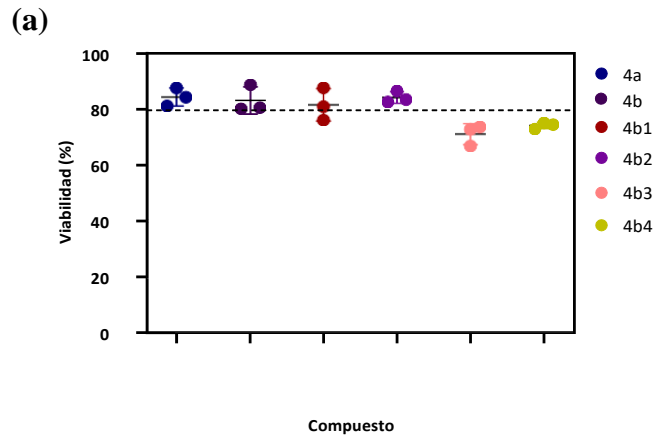
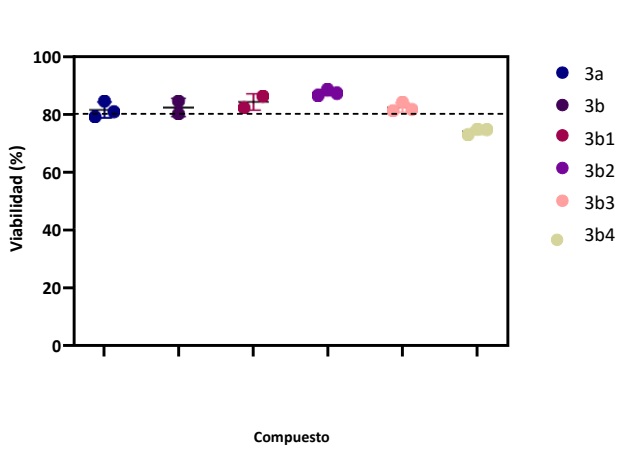
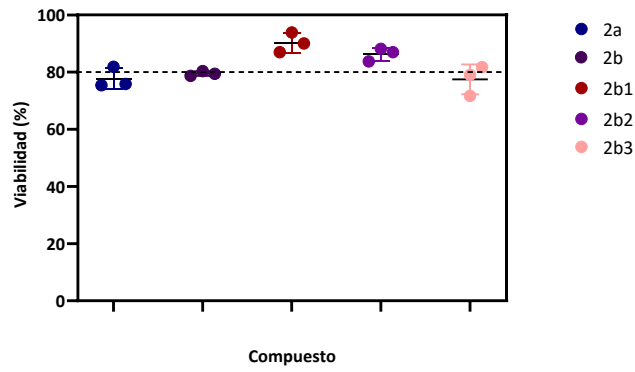
Tan pronto como pasaron 48 horas de haber sembrado los híbridos, se procedió a medir la citotoxicidad hacia las células mediante el ensayo de MTT y la lectura de absorbancia a 570 nm. Para calcular el porcentaje de viabilidad, se hizo uso de la siguiente ecuación:

$$\%viabilidad = \frac{\text{absorbancia de células tratadas} - \text{absorbancia del blanco}}{\text{absorbancia de células control} - \text{absorbancia del blanco}} * 100$$

Los resultados del ensayo son presentados en la **Figura 22**, la **Figura 23** y la **Figura 24**.

Figura 22

Resultados de viabilidad celular a una concentración de 10 μM sobre células HeLa



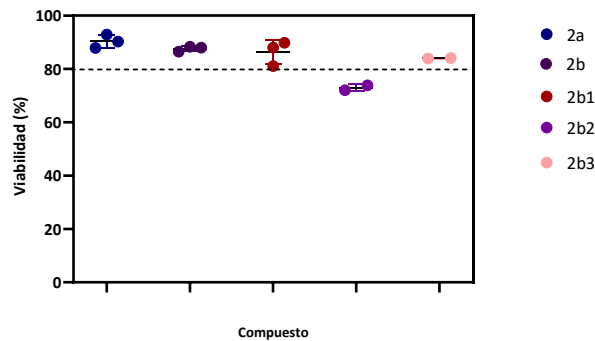
(b)

(c)

Nota. Resultados de los compuestos (a) 2a, 2b, 2b1, 2b2 y 2b3, (b) 3a, 3b, 3b1, 3b2, 3b3 y 3b4 y (c) 4a, 4b1, 4b2, 4b3 y 4b4.

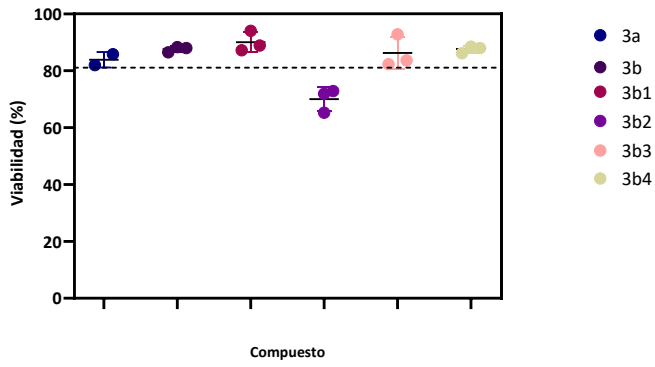
Figura 23

Resultados de viabilidad celular a una concentración de 10 μM sobre células Vero

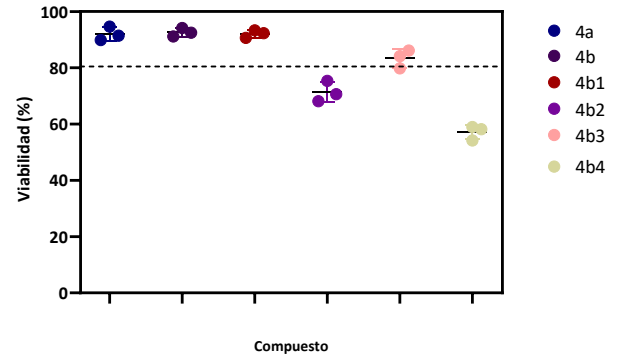


(a)

PROPIEDADES HÍBRIDOS QUINOLINA-CHALCONA
55



(a)

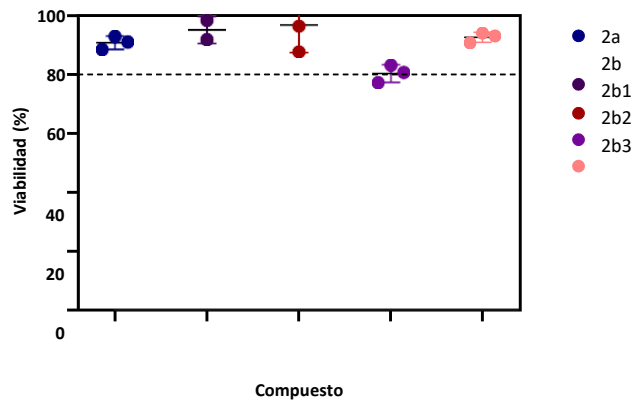


(b)

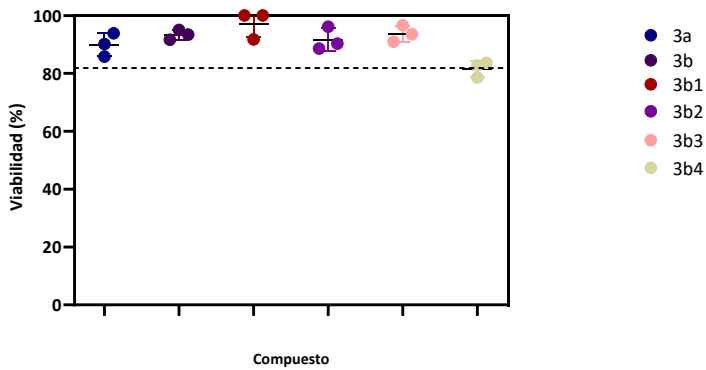
Nota. Resultados de los compuestos (a) 2a, 2b, 2b1, 2b2 y 2b3, (b) 3a, 3b, 3b1, 3b2, 3b3 y 3b4 y (c) 4a, 4b1, 4b2, 4b3 y 4b4.

Figura 24

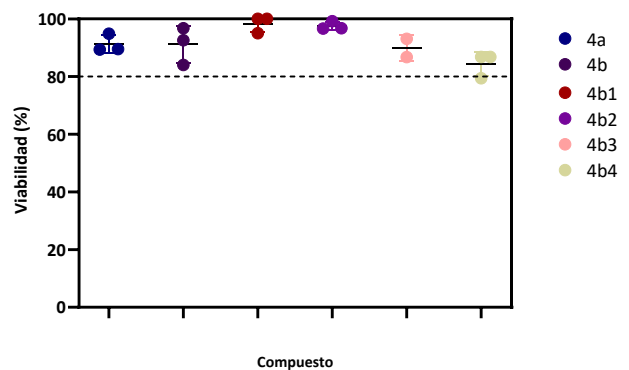
Resultados de viabilidad celular a una concentración de 10 μ M sobre células HaCaT



(a)



(b)



(c)

Nota. Resultados de los compuestos (a) 2a, 2b, 2b1, 2b2 y 2b3, (b) 3a, 3b, 3b1, 3b2, 3b3 y 3b4 y (c) 4a, 4b1, 4b2, 4b3 y 4b4.

A partir de las Figuras 22-24 se pueden identificar dos grupos de moléculas: compuestos cuyo valor de media reduce la viabilidad de las células a un porcentaje mayor o igual al 80% en las tres líneas celulares y compuestos cuyo valor de media disminuye la viabilidad de las células a un porcentaje menor a este 80%. En la primera categoría se encuentran los híbridos 2b1, 3a, 3b, 3b1, 3b3, 4a, 4b y 4b1, resultado que los selecciona inmediatamente para estudiar su capacidad de ser agentes antioxidantes, además de estudiar su comportamiento citotóxico, especialmente en las células sanas.

Ahora bien, en el segundo grupo de compuestos, aquellos llamados más tóxicos, se encontraron dos subdivisiones: híbridos cuyo valor de media ejerció una actividad más tóxica hacia las células HeLa que hacia las células sanas, y los compuestos cuyo valor de media, por el contrario, aminoró la viabilidad de las células Vero y HaCaT en un mayor porcentaje que el de las células cancerosas. Debido a esto, los compuestos 2a, 2b, 2b3, 3b4, 4b3 fueron considerados para estudiar su potencial citotóxico, así como su capacidad antioxidante con el fin de conocer si existe una relación entre estas dos características. Por otro lado, como tener resultados en los cuales una molécula actúa perjudicando en mayor medida por lo menos a una línea celular sana que a la línea celular tumoral no es favorable, los compuestos 2b2, 3b2, 4b2 y 4b4 fueron excluidos para los demás ensayos.

Con la información anterior, se construyó la **Tabla 3** que resume los resultados que arrojó cada híbrido quinolina-chalcona y precursores en cada línea celular.

Tabla 3

Resultados finales del screening a 10 μ M para cada línea celular

Compuesto	HeLa	Vero	HaCaT	Descartado
2a	Tóxico	No tóxico	No tóxico	No
2b	Tóxico	No tóxico	No tóxico	No
2b1	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No

2b2	No tóxico	Tóxico	No tóxico	Sí
2b3	Tóxico	No tóxico	No tóxico	No
3a	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
3b	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
3b1	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
3b2	No tóxico	Tóxico	No tóxico	Sí
3b3	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
3b4	Tóxico	No tóxico	No tóxico	No
4a	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
4b	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
4b1	No tóxico	No tóxico	No tóxico	No
4b2	No tóxico	Tóxico	No tóxico	Sí
4b3	Tóxico	No tóxico	No tóxico	No
4b4	Tóxico	Tóxico	No tóxico	Sí

Un detalle que sobresale de este ensayo es que ningún compuesto se consideró altamente citotóxico hacia las células HaCaT, pues permanecieron con porcentajes de viabilidad mayores al 80% a causa de la inoculación de todos los compuestos. Igualmente es notable que todos los híbridos que poseían un metilo (un activante débil en los derivados del benceno) como sustituyente en el anillo A de la chalcona (2b2, 3b2 y 4b2) tuvieron una preferencia por causar un mayor daño a las células Vero que a las células HeLa.

5.4.2 Curvas de IC_{50}

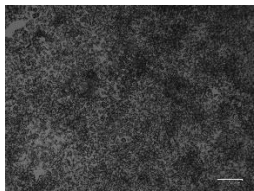
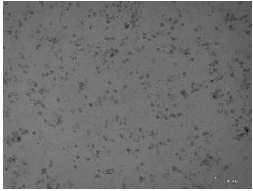
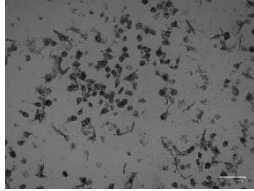
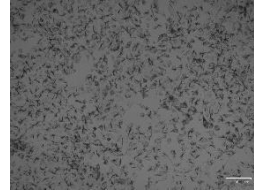
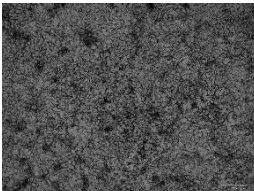
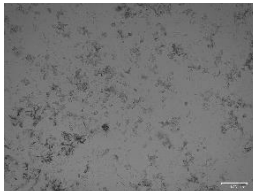
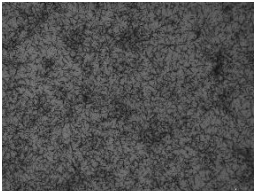
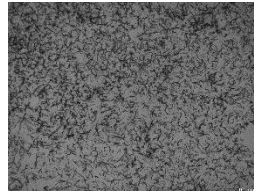

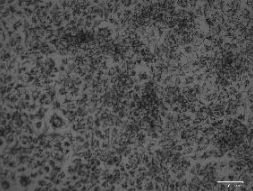
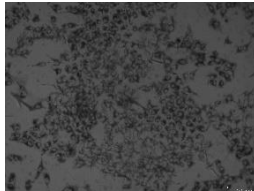
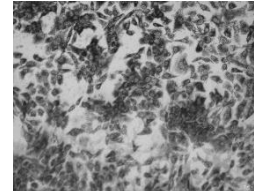
Los 13 compuestos seleccionados se probaron en cinco concentraciones: 5, 10, 20, 50 y 75 μM sobre las células HeLa, Vero y HaCaT. Esto con el fin de encontrar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) y conocer el potencial citotóxico de cada híbrido, además de su selectividad entre líneas celulares. La concentración máxima del ensayo, 75 μM , no representa ningún riesgo de toxicidad para las células con estas moléculas, pues el porcentaje de DMSO al 1% no es alcanzado hasta una concentración de 100 μM .

En primer lugar, el experimento fue realizado a los compuestos no tóxicos para ninguna de

las tres líneas celulares (2b1, 3a, 3b, 3b1, 3b3, 4a, 4b y 4b1) por triplicado. Los datos de la **Tabla 4** informan del estado de las células que han pasado por el ensayo de MTT. Esta sal puede ser reducida a cristales de formazán únicamente por células viables, por tanto, una mayor cantidad de estos cristales significa una menor cantidad de muerte celular (McCauley et al., 2013; Präbst et al., 2017).

Tabla 4

Resultados del ensayo de MTT para los compuestos 3b1, 3b3 y 4b1 a 75 μ M

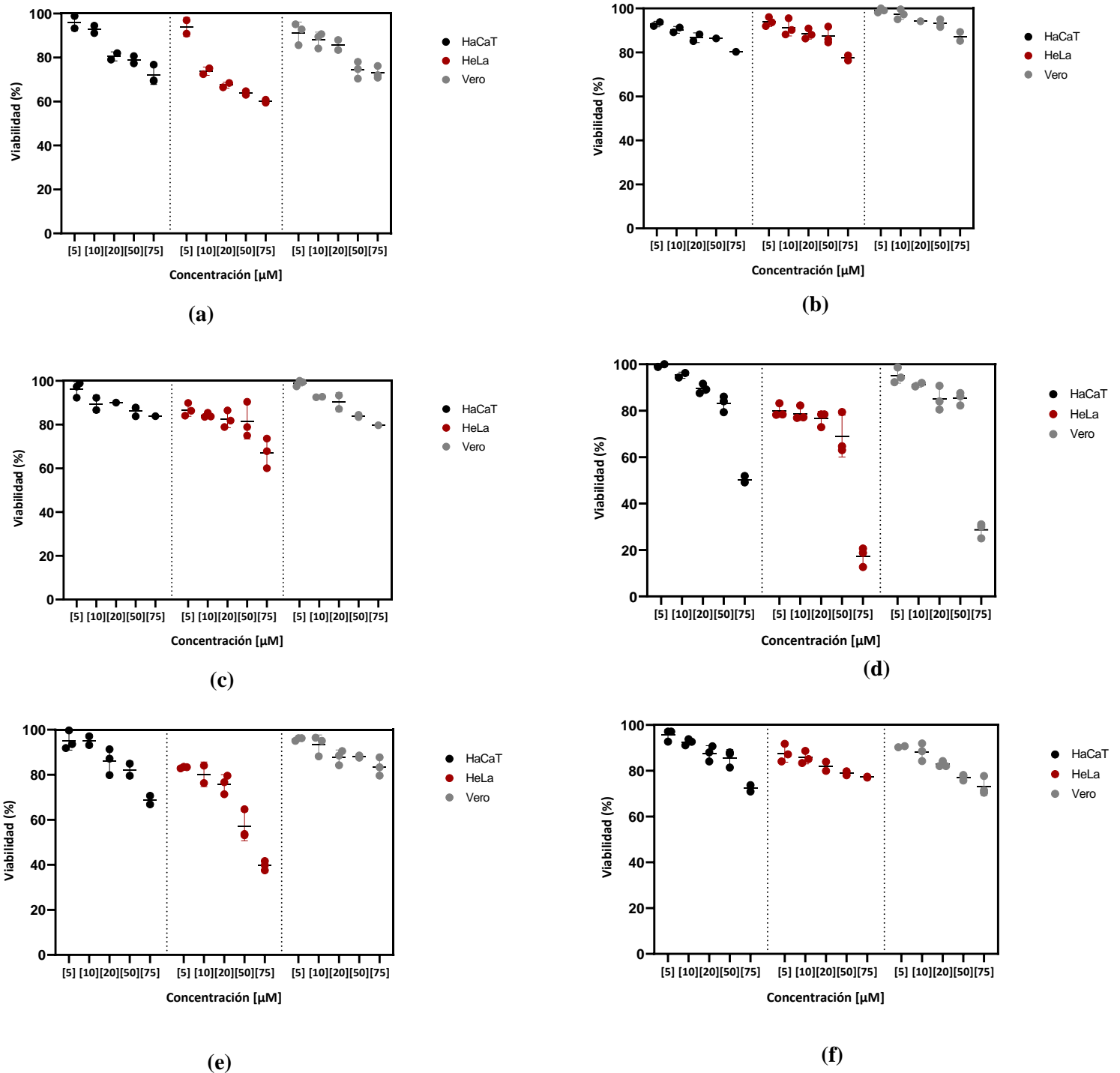
	75 μ M			
	Control	3b1	3b3	4b1
HeLa				
Vero				
HaCaT				

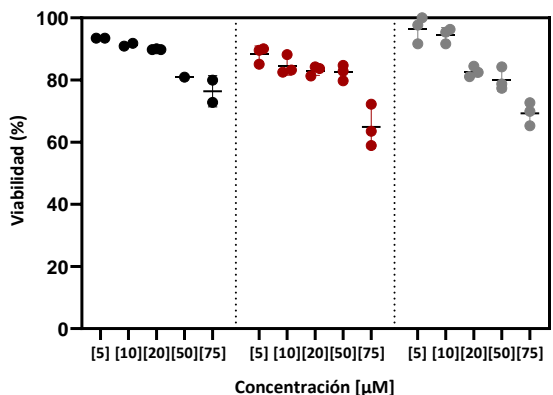
Esta tabla únicamente presenta los compuestos 3b1, 3b3 y 4b1 ya que en estas moléculas se alcanzaron niveles de viabilidad menores al 50%, especialmente en las células HeLa. Se puede apreciar la diferencia entre el pozo con células control y los pozos en los cuales se inocularon las estructuras a una concentración de 75 μ M, puesto que en estos últimos se encuentra reducido el crecimiento de cristales de formazán.

Sin embargo, para determinar acertadamente la concentración a la cual se llegó a ese porcentaje de 50%, se trazaron las curvas para todos los compuestos (**Figura 25**).

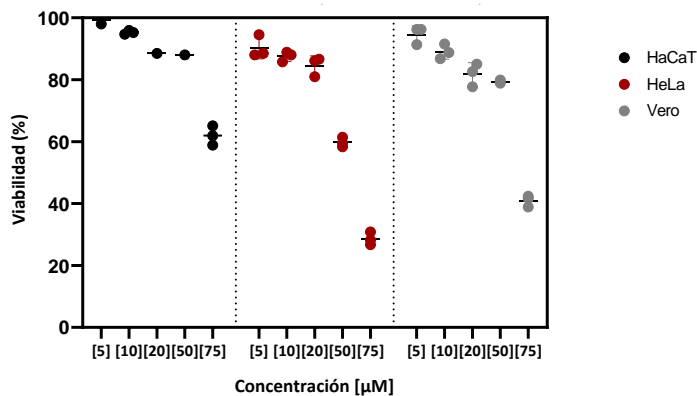
Figura 25

Curvas de IC₅₀ para los compuestos no tóxicos





(g)



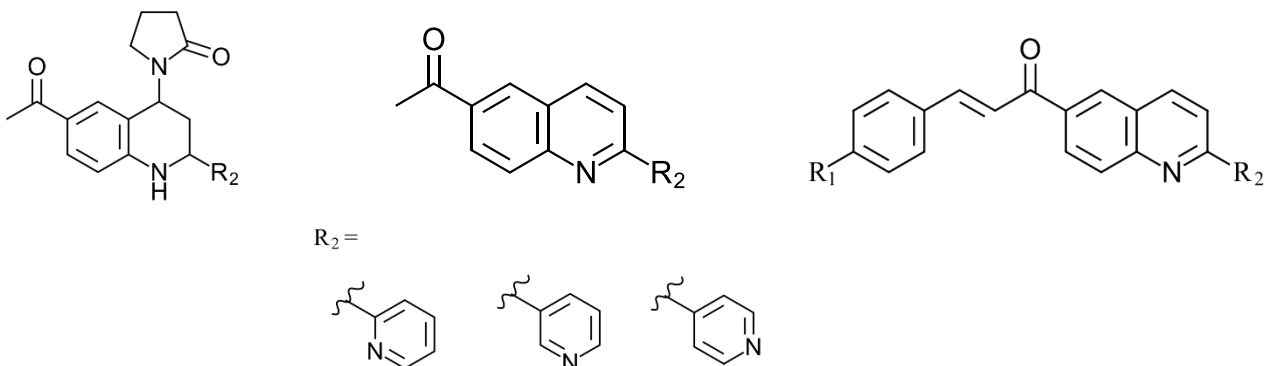
(h)

Nota. Se muestran resultados de (a) 2b1, (b) 3a, (c) 3b, (d) 3b1, (e) 3b3, (f) 4a, (g) 4b, (h) 4b1

La información de las gráficas permite conocer la tendencia que manifiestan los compuestos en relación con su concentración, dado que la viabilidad de las tres líneas celulares se ve disminuida con el incremento de la concentración de cada híbrido quinolina-chalcona. Se observa también que las células HeLa tuvieron un mayor nivel de actividad antiproliferativa a comparación de las líneas celulares sanas a concentraciones menores. La **Tabla 5** recoge estos datos y los presenta con los valores de IC_{50} para cada compuesto.

Tabla 5

Valores de IC_{50} para los compuestos no tóxicos



(3a y 4a)

(3b y 4b)

(2b1, 3b1, 3b3, 4b1)

Compuesto	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM]		
			HeLa	Vero	HaCaT
2b1	H	2-piridinil	>75	>75	>75
3a	No aplica	3-piridinil	>75	>75	>75
3b	No aplica	3-piridinil	>75	>75	>75
3b1	H	3-piridinil	60,648 ± 1,651	66,847 ± 0,648	74,524 ± 0,119
3b3	OCH ₃	3-piridinil	60,517 ± 4,621	>75	>75
4a	No aplica	4-piridinil	>75	>75	>75
4b	No aplica	4-piridinil	>75	>75	>75
4b1	H	4-piridinil	58,888 ± 0,438	69,863 ± 0,902	>75

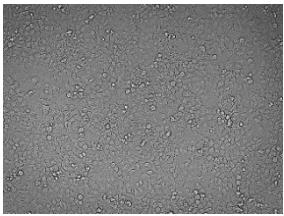
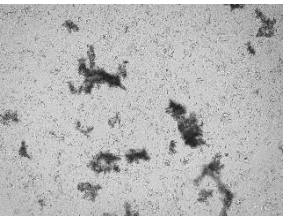

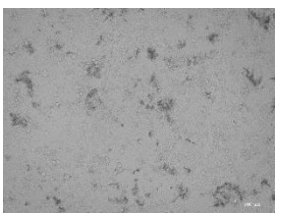
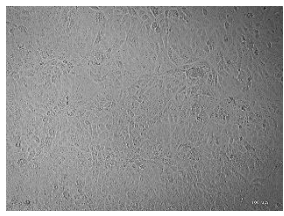
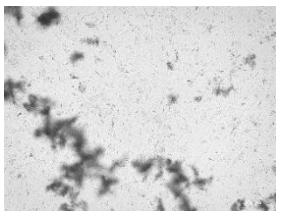
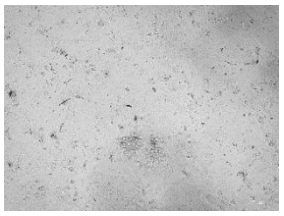
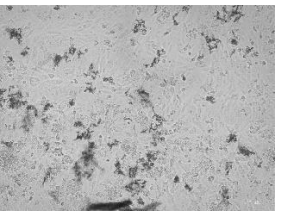
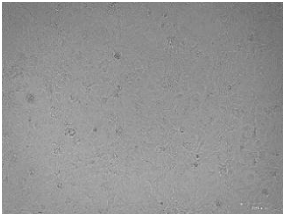


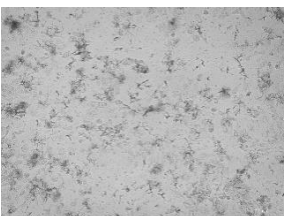
Como se expone en la **Tabla 5**, los compuestos en general no originan una alta toxicidad. Incluso el híbrido 4b1, quien presentó la menor IC₅₀ para las células HeLa y para las células sanas con 58,888 μM, sigue exponiendo una concentración alta como para que se considere significativa con referencia a las células tumorales. Por otro lado, la mayoría de las moléculas mostraron una IC₅₀ mayor a 75 μM para las células Vero y HaCaT, con excepción de 3b1 y 4b1, pero que de igual manera son concentraciones altas para ser consideradas significativas. Estos resultados pueden ser beneficiosos como compuestos antioxidantes, ya que sus efectos tóxicos a las células sanas son mínimos, sin embargo, los resultados de actividad antioxidante de estas moléculas se profundizarán más adelante.

El ensayo de citotoxicidad de MTT también fue llevado a cabo con los compuestos más tóxicos, aquellos que disminuyeron la viabilidad de los compuestos a un porcentaje menor al 80% a 10 μM, y que a su vez generaron un mayor efecto tóxico hacia las células cancerosas que hacia las células Vero y HaCaT. En este caso, el ensayo se realizó hasta una concentración

máxima de 75 μM , asegurándose de que ninguno de los híbridos quinolina-chalcona y precursor sobrepasara el 1% de DMSO en solución. Sin embargo, al haber transcurrido las 48 horas de incubación de las soluciones, se observó en el microscopio la aparición de cristales en los compuestos 2b3, 3b4 y 4b3. En la siguiente tabla se presentan imágenes de dichos cristales en el microscopio:

Tabla 6

Cristales generados en los compuestos 2b3, 3b4 y 4b3 a 75 μM

	75 μM			
	Control	2b3	3b4	4b3
HeLa				
Vero				
HaCaT				

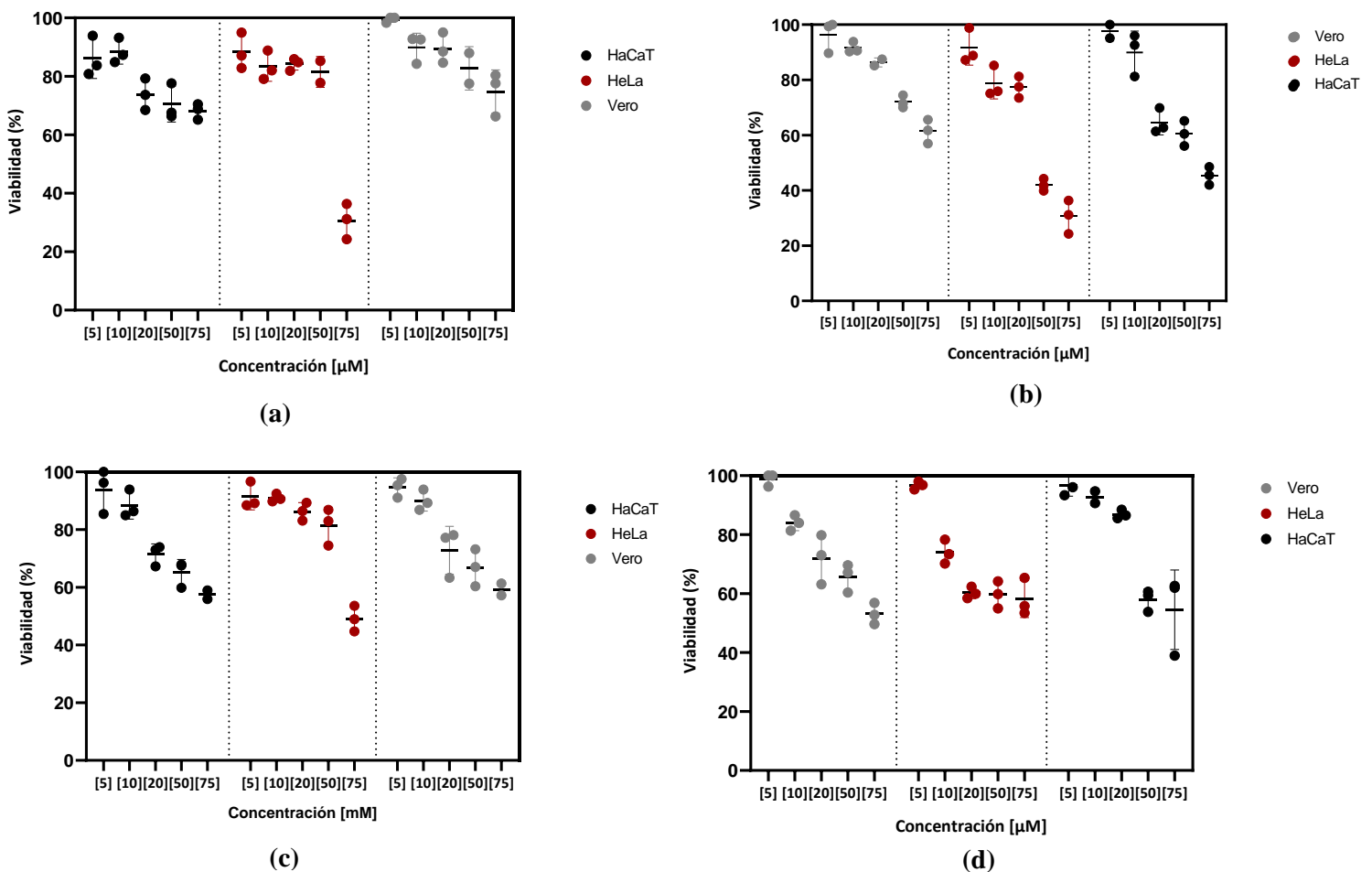
Como se puede ver en la **Tabla 6**, las células sin tratamiento se encuentran despejadas, mientras en los pozos de los compuestos 2b3, 3b4 y 4b3 a una concentración de 75 μM aparecen manchas oscuras y grisáceas, así como también las conformaciones afiladas propias de los cristales. Ahora, este fenómeno no solo ocurrió a altas concentraciones; en las células vero se encontró que, aunque en poca cantidad, a una concentración a partir de 5 μM para la molécula

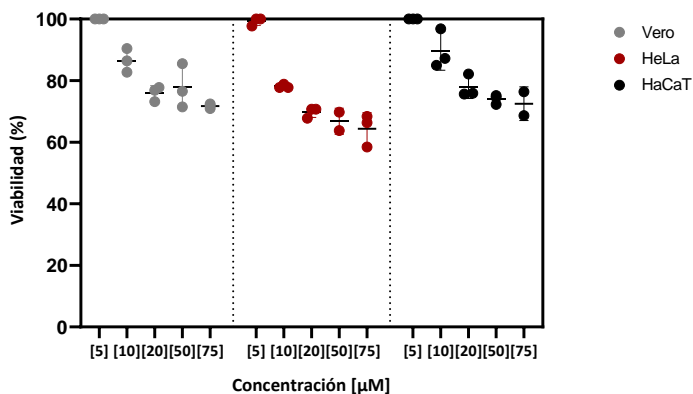
2b3 ya se veía la existencia de estos cristales. Esto tuvo lugar debido a la insolubilidad de estos tres híbridos en el medio DMEM, el cual es de naturaleza polar, y a medida que la concentración fue aumentando, la cantidad de cristales igualmente lo hizo. No obstante, cabe aclarar que, al momento de la preparación de las soluciones, estas se encontraban en un estado homogéneo para asegurar la confiabilidad de los resultados.

Ahora, a cada híbrido quinolina-chalcona y precursor declarado como tóxico, de igual manera, se le trazó su curva de IC_{50} , información que se enseña a continuación:

Figura 26

Curvas de IC_{50} para los compuestos tóxicos





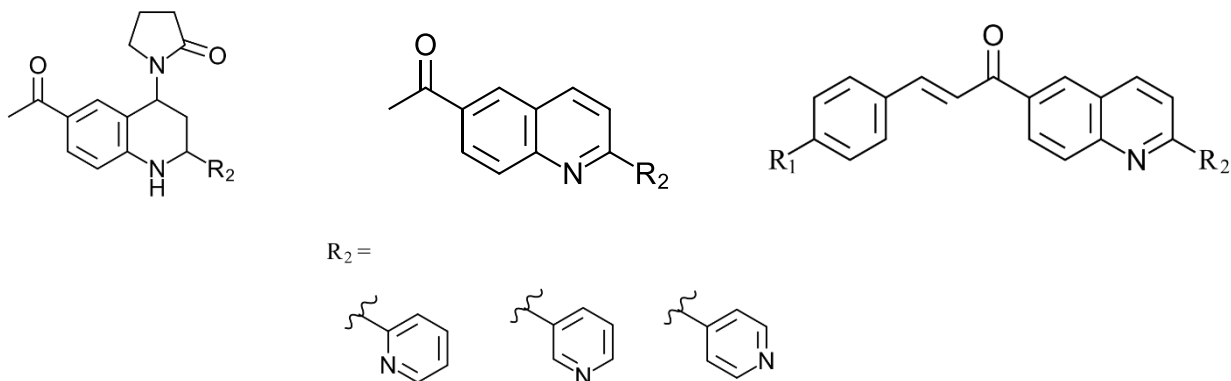
(e)

Nota. Se muestran resultados de (a) 2a, (b) 2b, (c) 2b3, (d) 3b4, (e) 4b3.

La **Figura 26** expone nuevamente el comportamiento de las estructuras mediante la viabilidad de cada línea celular en función de la concentración del compuesto. Así como sucedió con los compuestos no tóxicos, se evidenció una tendencia de aumento de la actividad antiproliferativa al incrementarse también la concentración. Nuevamente, las células HeLa mostraron una mayor susceptibilidad hacia las moléculas, así como un menor efecto en la línea celular HaCaT en todos los compuestos a excepción del 2b. Con esta información se elaboró la **Tabla 7**, con el objeto de especificar los resultados obtenidos de cada compuesto ensayado y en cada una de las líneas celulares.

Tabla 7

Valores de IC₅₀ para los compuestos tóxicos



Compuesto	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM]		
			HeLa	Vero	HaCaT
2a	No aplica	2-piridinil	65,900 ± 0,049	>75	>75
2b	No aplica	2-piridinil	41,650 ± 0,967	>75	67,107 ± 3,689
2b3	OCH ₃	2-piridinil	72,676 ± 2,395	>75	>75
3b4	Cl	3-piridinil	>75	>75	>75
4b3	OCH ₃	4-piridinil	>75	>75	>75

Según la **Tabla 7**, el híbrido quinolina-chalcona con mayor carácter antiproliferativo es 2b, con una IC₅₀ de 41,650 μM para las células HeLa. Esta concentración, siendo la más baja para todos los compuestos ensayados, es una IC₅₀ alta para ser considerada significativa. Contrario a lo que se esperaba, estas moléculas no tuvieron una fuerte acción citotóxica en contrade la línea celular cancerosa, pero tampoco mostraron este efecto hacia las células Vero y HaCaT. A pesar de esto, y teniendo en cuenta las IC₅₀ de los compuestos no tóxicos, tres de los cinco híbridos con el nitrógeno ubicado en la posición 2 del anillo de piridina (2a, 2b y 2b3) alcanzaron viabilidades menores al 50% en las células tumorales. Ahora, en estos resultados, 2a y 2b son las tetrahydroquinolinas precursoras y las quinolinas precursoras, respectivamente. Al pasar del precursor tetrahydroquinolínico 2a al precursor quinolínico 2b, la actividad citotóxica manifestó un alza, pero al convertir este mismo en los híbridos, la actividad bajó. Esto se puede evidenciar en los resultados de IC₅₀ de 2b1, quien ni siquiera alcanzó valores de viabilidad menores al 50%, y 2b3, teniendo una concentración inhibitoria media de 72,676 μM. 2b2 no se incluye (así como los demás híbridos con un metilo como sustituyente), ya que fue descartado luego del screening a 10 μM y 2b4 después de su incapacidad para poder disolverse adecuadamente.

Para las moléculas con un R₂ de 3-N sucedió casi completamente lo contrario. Ambos precursores no mostraron una actividad antiproliferativa significativa entre 5 y 75 μM, sin embargo, sus derivados 3b1 y 3b3 sí mejoraron la actividad. El híbrido con el sustituyente Cl en el anillo A de la chalcona (3b4) nuevamente perdió la acción citotóxica.

De estos resultados se puede decir que, en este caso, un sustituyente atractor de electrones como lo es el cloro, no causó un efecto perjudicial significativo en las células HeLa, a diferencia de un sustituyente electrodonador moderado como lo es el metoxilo (3b3), o del híbrido sin ningún sustituyente (3b1). En las células Vero se observó una ligera diferencia de la actividad entre 3b1 y 3b3, pues la actividad citotóxica se ve más marcada en el compuesto sin sustituyentes que en aquel que posee el OCH₃ y los demás grupos sustituyentes.

Para los compuestos con el átomo de nitrógeno del anillo de piridina ubicado en la posición *para*, se encontró que únicamente el híbrido quinolina-chalcona sin sustituyentes incrementó la muerte celular en las líneas HeLa y Vero con relación a sus precursores.

5.5 Ensayo de detección de ROS totales

Con el objeto de conocer la capacidad de los híbridos para evitar el estrés oxidativo, se recurrió a la CM-H₂DCFDA, una sonda que puede encontrar las especies reactivas de oxígeno al interior de la célula permitiendo ser oxidada y convertida en CM-DCF. Este último compuesto posee propiedades fluorescentes que permiten medirse a un rango de absorción en ~492–495 nm y de emisión de 517–527 nm. Importa señalar que debido a que es un método para valorar las ROS totales, carece de especificidad y no logra detallar qué tipo de especie se encuentra unida al fluoróforo.

Tanto las moléculas consideradas tóxicas, como las no tóxicas se tuvieron en cuenta para este ensayo, el cual se efectuó en placas totalmente negras, incluyendo su fondo, por lo que resultó imposible obtener evidencia fotográfica de cómo variaba la fluorescencia entre los compuestos, su concentración y la diferencia con los pozos control.

Para poder establecer la relación de ROS entre los tres tipos de líneas celulares, éstas se midieron con una cantidad igual de células al mismo tiempo para las células HeLa, Vero y HaCaT.

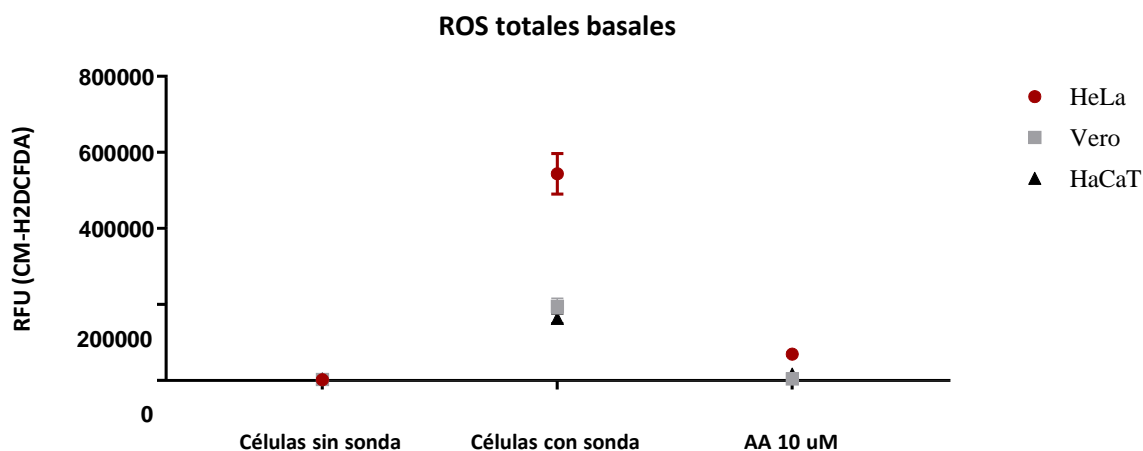
Este parámetro no se toma en consideración a la hora de detectar las ROS con los compuestos como estímulo, ya que se necesitan de 24 horas de incubación para poder medirlas y en este caso, el tiempo de incubación fue de 30 minutos antes de insertar la sonda. El número de células con el que se hizo la evaluación de las especies reactivas de oxígeno basales fue de 20.000 para cada pozo y línea celular.

Las células naturalmente disponen de sustancias (fluoróforos endógenos) que por sí mismas tienen la propiedad de absorber fotones a cierta energía y liberarlos con un valor de energía menor del que se absorbió. A este fenómeno se le llama autofluorescencia y entre las moléculas responsables de ello se encuentran los aminoácidos de carácter aromático, los lipopigmentos, las flavinas y la NADPH (Monici, 2005).

Este tipo de fluorescencia fue cuantificada en el ensayo de ROS basales, aparte de aquella causada por el fluoróforo exógeno CM-H₂DCFDA sin los compuestos como tratamiento. De igual manera, con el ánimo de conocer la acción del ácido ascórbico (AA) como sustancia antioxidante en el lapso de 30 minutos, se incluyó esta sustancia a una concentración de 10 μ M (**Figura 27**).

Figura 27

Resultados de ROS basales para las células HeLa, Vero y HaCaT



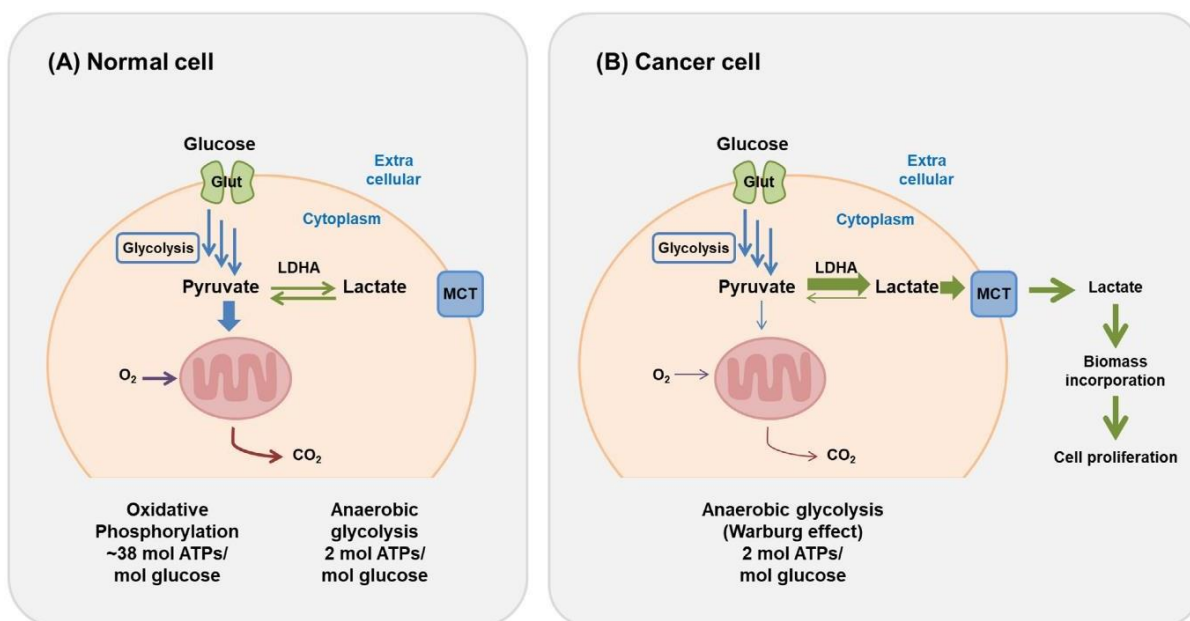
Nota. AA = Ácido ascórbico, RFU = Unidades relativas de fluorescencia.

La **Figura 27** permitió conocer que la autofluorescencia de las tres líneas celulares no alcanza valores de 40.000 RFU, pero que, al introducir la sonda, la fluorescencia de las células tumorales se dispara a valores cercanos de hasta 600.000 RFU. Estos resultados se encuentran muy por encima de las células sanas. (Para observar el comportamiento de cada línea celular por separado, dirigirse al **Apéndice D**). Con esto, se puede concluir que las células HeLa poseen una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno que las células no tumorales, y siguiendo el orden de ROS, HeLa>Vero>HaCaT. Esto tiene una explicación que radica en varios factores. El primero es el efecto Warburg, fenómeno que describe que las células cancerosas consumen altas cantidades de glucosa vía glucólisis anaeróbica independientemente de la presencia de oxígeno, pero con la diferencia la mayor parte de piruvato producido se convierte en lactato, disminuyendo el paso del primero al ciclo de Krebs y omitiendo la fosforilación oxidativa (**Figura 28**). Además, las células no tumorales generan 38 moléculas de ATP en condiciones aerobias, mientras que las células cancerosas únicamente 2, por lo que hay un requerimiento mayor de glucosa por parte de este tipo de células para asegurar su supervivencia (Kim & Baek, 2021; Warburg, 1956). Dicho, esto, la alteración en el metabolismo de las células tumorales exhibe una carencia de piruvato, el cual posee propiedades antioxidantes; así como de intermediarios del ciclo de Krebs, como el citrato, malato y oxaloacetato que también ejercen funciones protectoras en contra del estrés oxidativo, aumentando así la generación de especies reactivas de oxígeno en la célula (Sayed et al., 2013).

Otro factor desencadenante de ROS, y exclusivamente propio de las células de cáncer de cuello uterino, es la inflamación crónica causada por la infección del VPH. También es reportado que los antioxidantes endógenos de la célula, enzimáticos como no enzimáticos, se ven regulados a la baja durante la etapa de progresión del cáncer (Preci et al., 2020). Además, daños en las funciones celulares causada por la hipoxia y la expresión alterada de factores de crecimiento también proporcionan un desequilibrio redox (Georgescu et al., 2018).

Figura 28

Diferencias de la vía de glucólisis entre una célula no tumoral y una célula tumoral



Nota. Las imágenes representan que la glucólisis de una célula normal (A) en condiciones aeróbicas alcanza el final del proceso con la fosforilación oxidativa produciendo 38 moléculas de ATP, mientras que por vía anaeróbica y con la fermentación del piruvato, genera 2 moléculas de ATP. Por otro lado, una célula cancerosa (B) tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas únicamente convierte el piruvato en lactato y genera 2 moléculas de ATP. Tomado de (Kim & Baek, 2021).

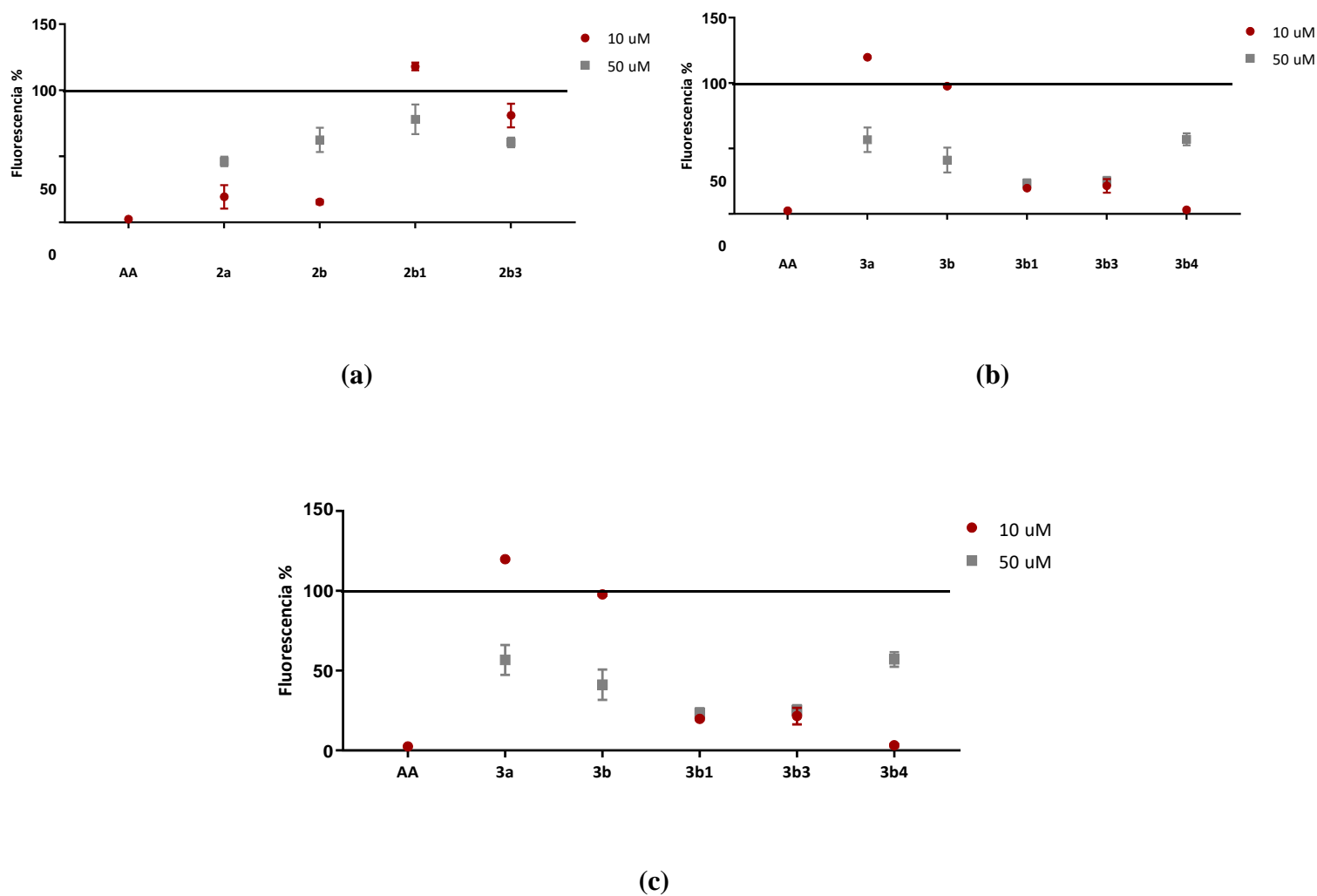
Siguiendo con el análisis, es notable también la actividad altamente antioxidante del ácido ascórbico en los tres tipos de célula a tan solo media hora de incubación; no obstante, los niveles de ROS en las células HeLa siguen expresándose en mayor cantidad que las células Vero y HaCaT con la adición de este tratamiento.

Los ensayos de detección de especies reactivas de oxígeno empleando los híbridos quinolina-chalcona para observar si manifiestan una actividad antioxidante hacia las líneas celulares no tumorales, como para las células HeLa, se llevaron a cabo mediante incubaciones de 48 horas a concentraciones de 10 y 50 μ M empleando tres pozos por compuesto (**Figura 29, Figura 30 y**

Figura 31). En estas pruebas también se incluyó al ácido ascórbico, pero únicamente a 10 μM , pues al momento de elaborar la dilución a 50 μM en medio DMEM como solvente, el color de éste, el cual inicialmente era rosado, adoptó una tonalidad amarilla propia de un ambiente ácido. Esta concentración se tuvo que descartar para evitar comprometer la integridad de las células en el ensayo.

Figura 29

Resultados ensayo de ROS a concentraciones de 10 y 50 μM en células HeLa



Nota. Se presentan resultados de (a) AA, 2a, 2b, 2b1, 2b3, (b) AA, 3a, 3b, 3b1, 3b3 y 3b4, (c) AA, 4a, 4b, 4b1 y 4b3.

La **Figura 29** expresa los resultados de los ensayos empleando las moléculas en las células cancerosas. Los datos se normalizaron estableciendo el control de cada célula sin tratamiento como 100%. Esto quiere decir que valores por encima del control indican que el híbrido aumentó las ROS en las células y, por el contrario, valores por debajo del control apuntan a que el compuesto bajó las especies reactivas de oxígeno.

El AA presentó la mayor actividad antioxidante, seguido por el compuesto 3b4 a 10 μM y 4b3 a 50 μM . Ahora, a una concentración de 10 μM , las moléculas 2b1, 3a, y 4a estimularon la generación de ROS. El híbrido 3b no tuvo un mayor efecto en las células, mientras que los demás compuestos disminuyeron las ROS en diferentes proporciones, destacando, como se había mencionado anteriormente, a 3b4 con un porcentaje de fluorescencia menor a 5. Al aumentar la concentración de los híbridos a 50 μM , las células mantuvieron mermadas sus cantidades de ROS debido a la acción de todos los compuestos, incluidos aquellos que a una concentración menor la habían incrementado y que esta la desmejoraron, como lo fueron 2a, 2b, 3b4, 4b y 4b1.

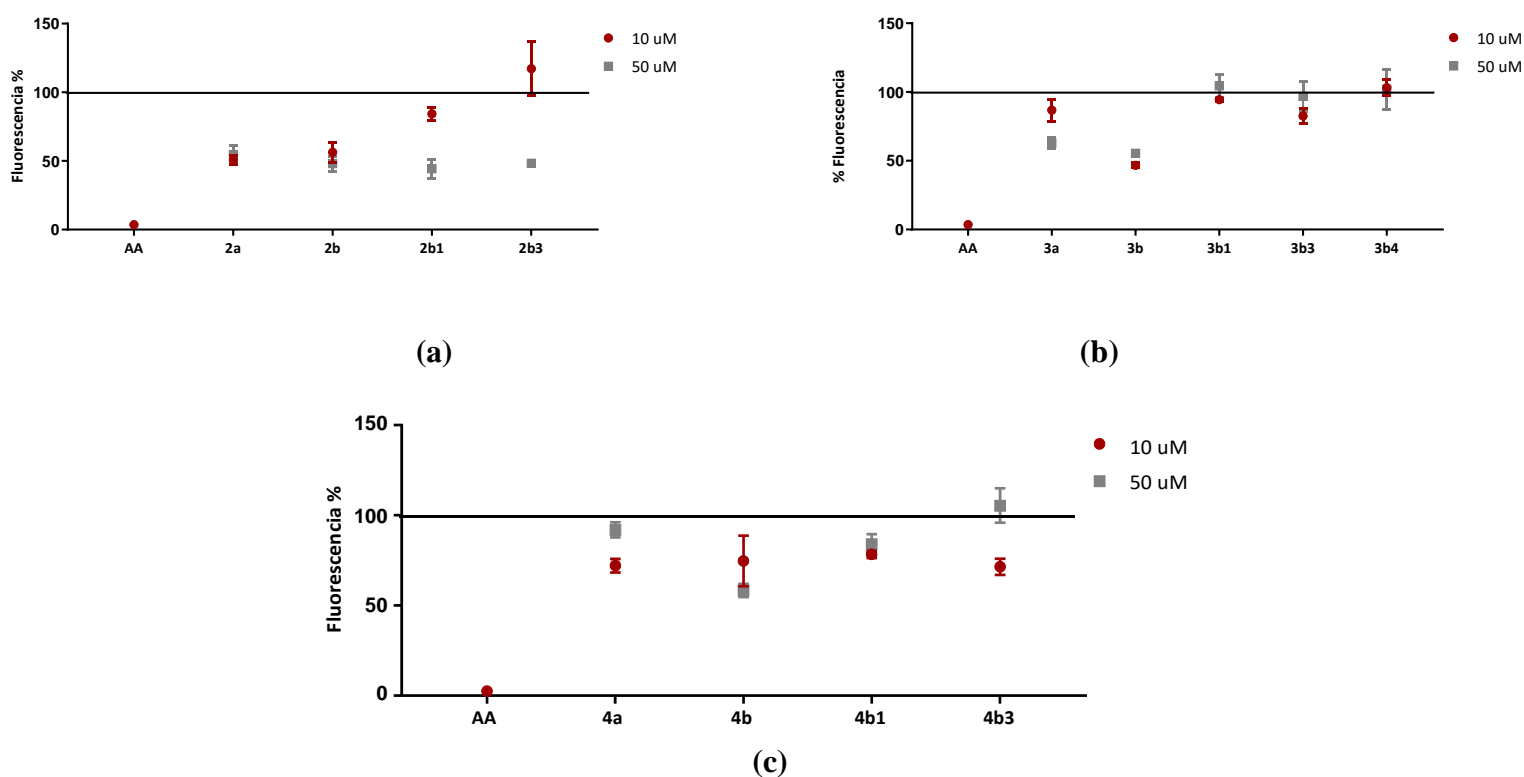
Al discutir la relación estructura-actividad (se hizo únicamente para la concentración de 10 μM para todos los compuestos en cada línea celular), empezando con los compuestos con $R_2 = 2$ -piridinil, tanto el precursor THQ, como el de quinolina exhibieron una mejor actividad antioxidante que sus derivados quinolina-chalcona con cualquier sustituyente. Incluso el híbrido que no posee sustituyente, el 2b1, fue aquel que ocasionó un alza en el valor de ROS con relación al control.

Para los compuestos con el átomo de nitrógeno en la posición *meta* de la piridina, a 10 μM la tetrahydroquinolina expresó un aumento de ROS. Sin embargo, al convertir esta molécula en una quinolina, el número de ROS se mantuvo relativamente similar a las células control. Ahora, los tres híbridos derivados de esta quinolina (3b1, 3b3 y 3b4) lograron tener un efecto antioxidante en las células, en especial este último que tiene un sustituyente desactivante cloro en el anillo A de la chalcona. Así, el orden de actividad antioxidante de esta familia de compuestos se puede definir como $R_1 = \text{Cl} > R_1 = \text{H}, \text{OCH}_3 > \text{Quinolina} > \text{THQ}$.

A 10 μM , los compuestos con $\text{R}_2 = 4\text{-piridinil}$ presentaron una tendencia semejante. El precursor 4a generó un crecimiento de especies reactivas de oxígeno, pero la quinolina precursora experimentó una baja de más del 50% de fluorescencia, convirtiéndose en un compuesto antioxidante. El híbrido derivado de estos precursores carentes de sustituyentes mostró mejores propiedades antioxidantes que sus predecesores, al igual que el híbrido que posee un metoxilo como sustituyente R_1 (4b3), pero no de una manera igual de marcada que 4b1. El orden de la actividad para esta familia de compuestos se estableció como: $\text{R}_1 = \text{H} > \text{Quinolina} > \text{R}_1 = \text{OCH}_3 > \text{THQ}$.

Figura 30

Resultados ensayo de ROS a concentraciones de 10 y 50 μM en células Vero



Nota. Se presentan resultados de (a) AA, 2a, 2b, 2b1, 2b3, (b) AA, 3a, 3b, 3b1, 3b3 y 3b4, (c) AA, 4a, 4b, 4b1 y 4b3.

Observando la **Figura 30**, nuevamente el AA presenta la menor cantidad de fluorescencia. En este caso, las células Vero se vieron menos afectadas positivamente por las moléculas a comparación de las células HeLa.

Los compuestos a 10 μM que bajaron el nivel de ROS en mayor proporción para estas células fueron 2a y 3b, con unidades de RFU de alrededor de la mitad que las del control. Este primer compuesto obtuvo buenos resultados igualmente en las células tumorales, con porcentajes que oscilan entre las 13 y 26%. Además, es muy probable que el híbrido 2b3 exhibiera una actividad prooxidante. A una concentración de 50 μM , la mayoría de compuestos se mantuvo por debajo del control; sin embargo, algunos perdieron la actividad antioxidante.

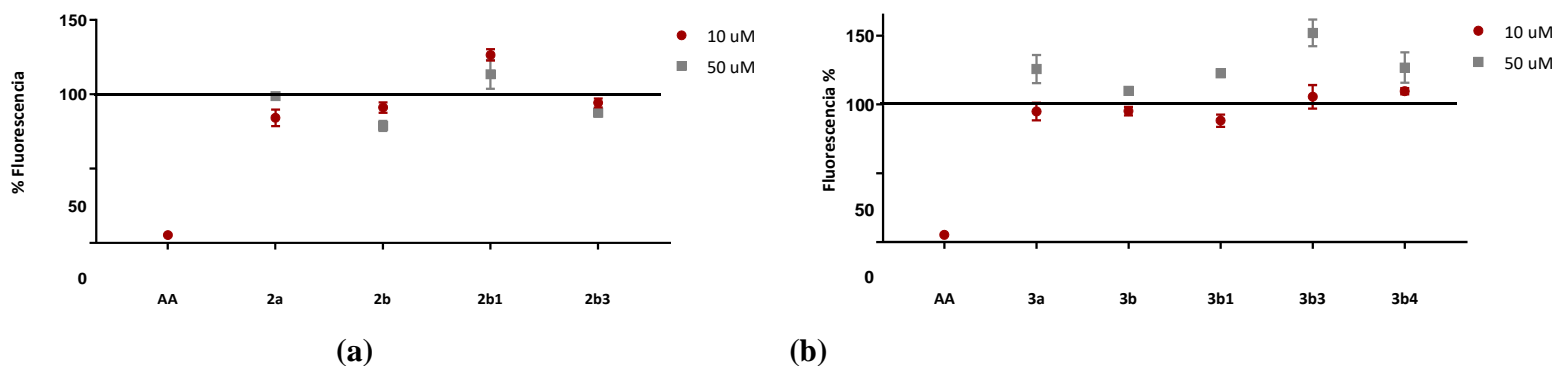
Los híbridos en los cuales la posición del átomo de nitrógeno en el anillo de piridina se designa como *orto*, presentaron un declive en la actividad antioxidante comparándose a sus precursores. Incluso, como se mencionaba anteriormente, el híbrido con un metoxilo como R_1 , generó el incremento de ROS y aquel con un $R_1 = \text{H}$ las disminuyó en una proporción baja. Debido a esto, los compuestos con mejor actividad de esta familia fueron considerados los precursores, tanto el de quinolina, como el de tetrahydroquinolina.

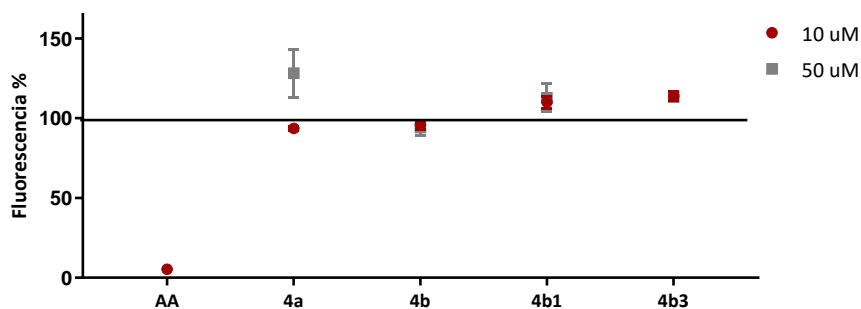
En el caso de las moléculas con $R_2 = 3\text{-piridinil}$, al pasar de la THQ a la quinolina, se produjo una mejora de la actividad antioxidante. No obstante, sus sucesores híbridos desmejoraron la acción sobre las células.

Para los híbridos quinolina-chalcona y sus predecesores con $R_2 = 4\text{-piridinil}$, el comportamiento de los dos precursores y el de cada híbrido híbridos se mostró cercano.

Figura 31

Resultados ensayo de ROS a concentraciones de 10 y 50 μM en células HaCaT





(c)

Nota. Se presentan resultados de (a) AA, 2a, 2b, 2b1, 2b3, (b) AA, 3a, 3b, 3b1, 3b3 y 3b4, (c) AA, 4a, 4b, 4b1 y 4b3.

En la **Figura 31**, además de reafirmar la actividad eliminadora de ROS por parte del AA, se puede mirar que una concentración de 10 μM los compuestos no presentaron efectos mayores en las células HaCaT, ya que en su mayoría, éstos mantuvieron los niveles de ROS a niveles similares o se encontraban en menores cantidades en una baja proporción, que aquellas que se encuentran en las células control. Existe una excepción en esta tendencia con las moléculas 2b1, 4b1, 4b3, quienes exhibieron una actividad prooxidante; el primero con valores de RFU entre 123 y 131, y de 5 y 17 unidades más que el control para los compuestos 4b1 y 4b3.

Con un aumento de la concentración a 50 μM , todos los compuestos de la familia $R_2 = 3$ -piridinil, llevaron al alza las especies reactivas de oxígeno de la célula, sobresaliendo 3b3 alcanzando valores entre 140 y 162% de fluorescencia.

Para la relación estructura-actividad de los compuestos con el átomo de nitrógeno de la piridina en la posición 2-piridinil, en primer el precursor de THQ disminuyó en una baja proporción el porcentaje de fluorescencia, y al pasar de esta molécula a la quinolina, la acción antioxidante mejoró alcanzando niveles cercanos de fluorescencia al control. Los híbridos quinolina-chalcona sucesores no lograron fortalecer la actividad; por el contrario, el híbrido que posee un metoxilo como sustituyente en el anillo

A de la chalcona (2b3) continuó ampliando el número de ROS con relación a su predecesor, y el híbrido carente de sustituyentes ejerció una acción prooxidante. El orden de los compuestos de esta familia según su actividad antioxidante se establece como: THQ > Quinolina > R₁ = OCH₃ > R₁ = H.

Para los compuestos con el nitrógeno posicionado como *meta* en el anillo de piridina, sus precursores mantuvieron valores de ROS cercanos a las células sin tratamiento. Al ser convertidos en el híbrido con R₁ = H, la cantidad de ROS se vio disminuida en una baja proporción, sin embargo, los híbridos con R₁ = OCH₃ y R₁ = Cl desmejoraron la actividad.

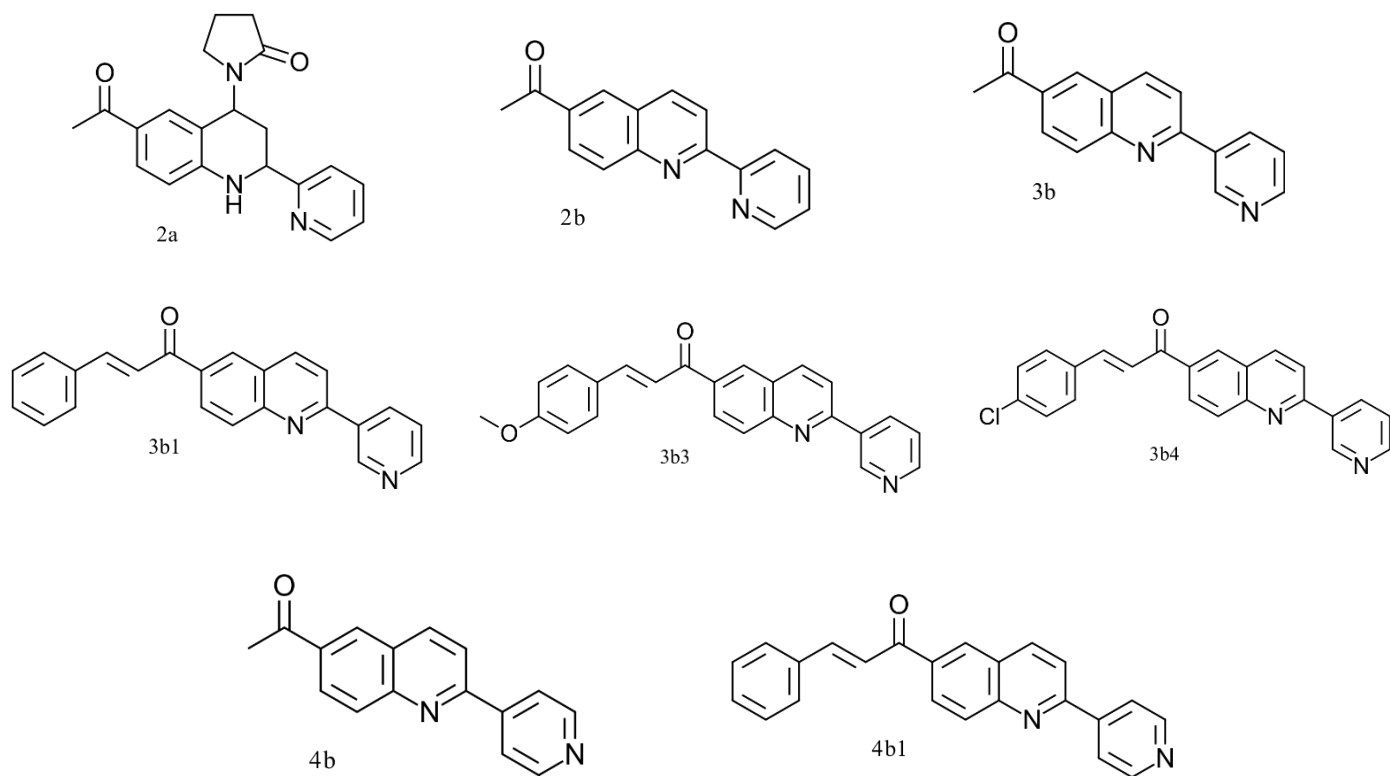
Las moléculas con un R₂ = 4-piridinil, ambos precursores presentaron niveles de especies reactivas de oxígeno similares a las células control. Éstos a su vez, obtuvieron niveles más bajos que sus híbridos con R₁ = H y con un metoxilo como sustituyente.

Una vez estudiado el efecto de todos los precursores e híbridos sobre las tres líneas celulares por sus propiedades citotóxicas, así como para la capacidad de disminuir sus cantidades de ROS, se puede afirmar que las células tumorales fueron aquellas que mostraron mayor susceptibilidad a la acción de los compuestos ensayados tanto en el ensayo de viabilidad de MTT, como en el de detección de ROS. Por otro lado, las células sanas HaCaT resultaron verse menos afectadas en ambos ensayos. Además, se observó que los compuestos pueden poseer propiedades antioxidantes a cierta concentración, pero que al aumentarla, estos mismos compuestos pueden actuar como prooxidantes.

Con la información extraída de las gráficas, se destacan los siguientes compuestos por su capacidad de actuar como agentes antioxidantes y reducir el nivel de ROS a aproximadamente la mitad de las que presentaban las células control.

Figura 32

Compuestos con actividad antioxidante notable



La **Figura 32** expone los compuestos con mejor actividad antioxidante a 10 μM indiferentemente de la línea celular sobre la que mejor ejercen su acción. La única tetrahidroquinolina seleccionada es 2a. Ésta presentó un mejor efecto sobre las células tumorales que en las células Vero al igual que las quinolinas 2b y 4b. Por el contrario, la quinolina 3b logró disminuir la especies reactivas de oxígeno de una manera más óptima en las células Vero que en las células HeLa. En el caso de los dos híbridos quinolina-chalcona sin sustituyentes unidos al anillo A de la chalcona (3b1 y 4b1), ambos exhibieron una mejor actividad antioxidante sobre las células tumorales que sobre las células Vero. Para los híbridos 3b3 y 3b4, éstos ejercieron una alta actividad antioxidante sobre las células HeLa, mientras que en las células Vero el efecto fue insignificante.

Vale sobresaltar también que 4 de los 5 compuestos de la familia $R_2=3\text{-piridinil}$ mostraron la capacidad para disminuir ROS en las células, prefiriendo la quinolina las células Vero, y los híbridos sucesores, las células tumorales.

Además, con respecto a los resultados de los ensayos de citotoxicidad de las secciones anteriores, el compuesto considerado como el más tóxico para las células ($IC_{50} = 41,650$) especialmente para las células tumorales, en los ensayos de antioxidación, y para estas mismas células, su acción a $10 \mu\text{M}$ fue notoria, bajando las RFU a valores entre 14 y 17. Sin embargo, al aumentar la concentración a $50 \mu\text{M}$, la actividad desmejoró aumentando las ROS a más de la mitad del control. Más aún, en las células Vero disminuyó las ROS a valores cercanos a 50 RFU en ambas concentraciones.

Por otra parte, el compuesto con mayor efecto antioxidante en las células HeLa fue 3b4, disminuyendo las ROS a menos del 5% de fluorescencia a $10 \mu\text{M}$, pero que perdió la actividad, subiendo el porcentaje a más del 50% al incrementar la concentración. Este híbrido presentó IC_{50} mayores a $75 \mu\text{M}$ para los tres tipos de líneas celulares en los ensayos de citotoxicidad. No obstante, otros híbridos que también exhibieron una actividad antioxidante notable en estas células, como el 2a, 2b, 3b1, 3b3 y 4b1, para el ensayo de viabilidad de MTT, obtuvieron valores de IC_{50} entre $41,650 \mu\text{M}$ y $65,900 \mu\text{M}$.

En las células Vero, la molécula que logró bajar en mayor cantidad las especies reactivas de oxígeno (entre 44 y 48,1%) a $10 \mu\text{M}$ se trató de 3b, quien a $50 \mu\text{M}$, desmejoró ligeramente su efecto antioxidante. Este precursor presentó valores de IC_{50} mayores a $75 \mu\text{M}$ en las tres líneas celulares. Pero compuestos que tuvieron una capacidad antioxidante similar a la de 3b, como lo fueron 2a y 2b, exhibieron valores de IC_{50} de $65,900$ y $41,650 \mu\text{M}$ respectivamente para las células HeLa, y valores mayores a $75 \mu\text{M}$ para las células Vero.

La quinolina 2b es un compuesto que causa interés por sus resultados anteriormente mencionados. Aunque no posee la mayor actividad antioxidante, no deja de ser altamente antioxidante a $10 \mu\text{M}$ y es el más citotóxico en las células HeLa. A pesar de esto, en esta concentración, la viabilidad de las células se encuentra en un porcentaje entre 75 y 85%, la cual es alta. Al aumentar la concentración de 2b a $50 \mu\text{M}$, la viabilidad de las células disminuye a porcentajes entre 39 y 44%. Su capacidad se ve

desmejorada, pero sigue siendo de naturaleza antioxidante. Paralelamente esta quinolina en las células Vero mantiene la misma tasa de disminución entre 10 y 50 μ M sin llegar a su IC₅₀, al igual que en las células HaCaT, pero con una disminución de ROS menor.

Otro compuesto con resultados particulares es el híbrido 2b3 en las células Vero, pues a 10 μ M las células se encuentran a viabilidades altas entre 86 y 94%, pero a esta misma concentración, el compuesto se comporta de manera prooxidante, mientras que al aumentar la concentración a 50 μ M, la tendencia de la molécula pasa a ser antioxidante, pero mermando la viabilidad a porcentajes del 60-73%.

Expuestas las razones, no es posible trazar una relación estrecha entre actividad citotóxica y actividad antioxidante entre los compuestos ensayados.

Singh et al. (2018) realizó una revisión sobre los efectos de incluir antioxidantes en la suplementación durante o después de la quimioterapia con agentes usados en el tratamiento del cáncer de cuello uterino como el cisplatino, la doxorubicina, el 5-fluoroacil, el carboplatino y el paclitaxel, entre otros. De un total de 138 artículos, el 88% demostró que estos compuestos redujeron los niveles de toxicidad inducidos por la quimioterapia, el 70% de 130 artículos reportó una mejoría en la eficiencia terapéutica con el uso de antioxidantes, y el 63% de 41 artículos obtuvo resultados prometedores sobre la inclusión de antioxidantes conjugados al prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes. Dicho esto, y según los resultados obtenidos en los ensayos, se puede decir que los compuestos con una sobresaliente actividad antioxidante (**Figura 32**) presentan la posibilidad de ser integrados como coadyuvantes en la terapia con agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer de cuello uterino. Sin embargo, esta inclusión requiere del estudio de las condiciones del ambiente tumoral (estado del tumor, cantidad de ROS presentes, niveles de autofagia) ya que estos pueden variar el resultado de disminuir las especies reactivas de oxígeno en las células, favoreciendo o inhibiendo la muerte de las células tumorales (Poillet-Perez et al., 2015).

5.6 Acoplamiento molecular

Los resultados obtenidos por los ensayos de citotoxicidad y antioxidación pueden ser aprovechados teniendo en cuenta que las estructuras de la **Figura 32** se presentaron como antioxidantes sin comprometer la viabilidad de las células sanas a una concentración de 10 μ M. Por esto, se llevó a cabo el proceso de docking molecular.

En primer lugar, se ejecutó la validación de los acoplamientos entre los ligandos de referencia cocrystalizados con su respectiva enzima. Esto para confirmar la confiabilidad de los resultados y poder establecer comparaciones con las respuestas arrojadas por el docking con los compuestos seleccionados en este trabajo (**Tabla 8** y **Figura 33**).

Tabla 8

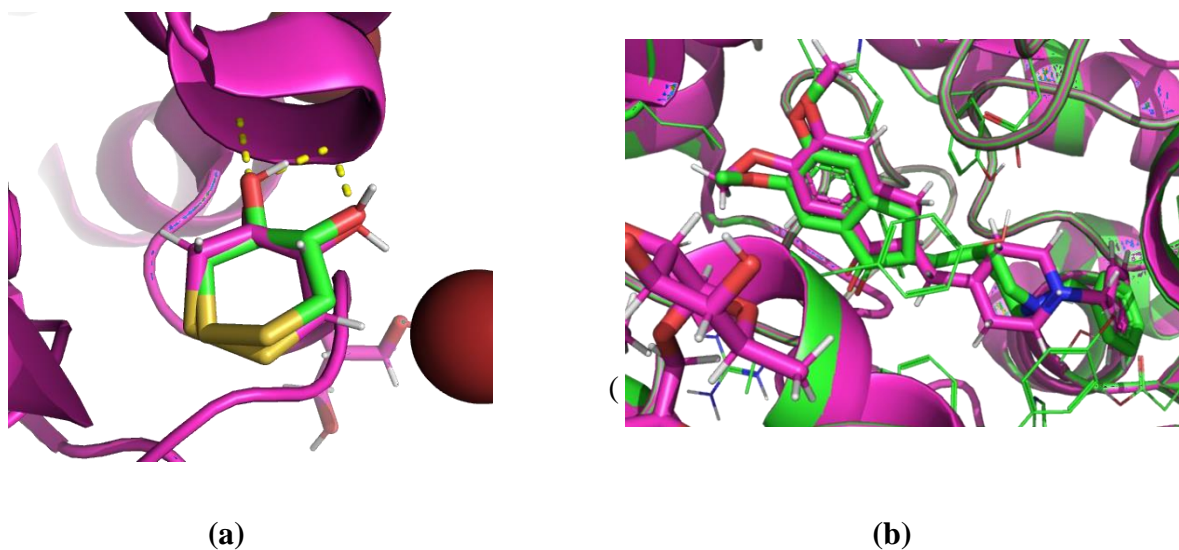
Resultados de la validación de los ligandos de referencia en complejo con sus determinadas enzimas.

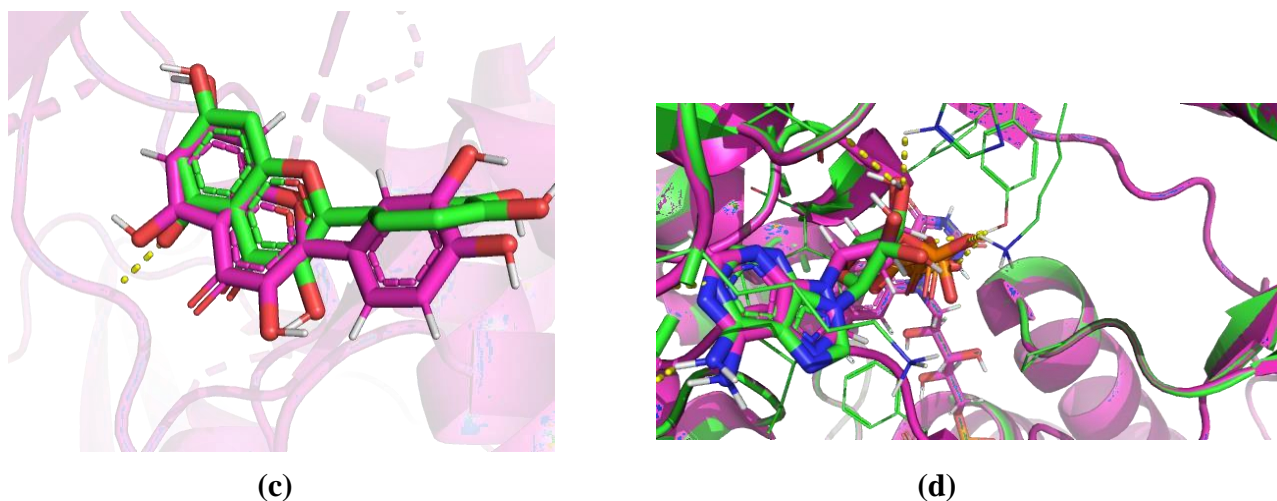
Proteína	Receptor	RMSD (\AA)	Energía de enlace (kcal/mol)
PRDX 5	DTT	0,659	-3,5
NOX2	ADP	1,209	-8,3
AChE	Donepezil	1,058	-10,4
HCK	Quercetina	1,160	-8,0

Nota. RMSD = Valor de desviación media cuadrática

Figura 33

Superposición de la pose de la cocrystalización (rosado) y la pose de la validación de los cuatro ligandos de referencia con sus determinadas enzimas (verde)





Nota. Se muestran resultados de (a) DTT 5, (b) Donepezilo, (c) Quercetina y (d) ADP.

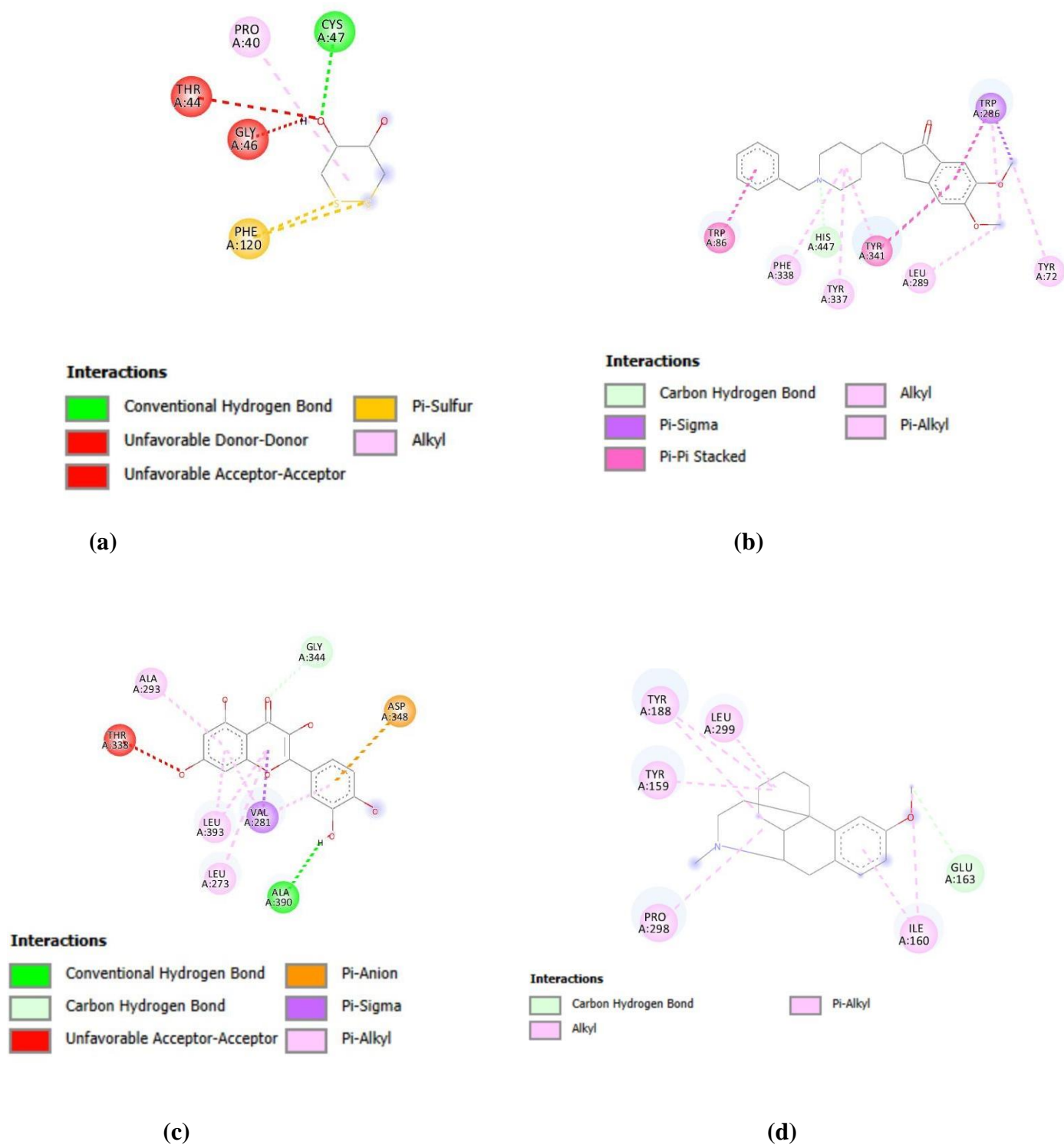
Para que una validación sea considerada confiable, los valores del parámetro RMSD deben ser menores a 2 Å y según los resultados expuestos en la **Tabla 8**, todos los valores de RSMD arrojados por el acoplamiento son válidos. Además, se puede ver como la validación que obtuvo el mejor valor de RSMD tiene una mejor superposición con la pose arrojada por la cristalización, mientras que con los ligandos Donepezil y Quercetina se muestran diferencias en la orientación de algunos enlaces. En esta tabla también se expresa los valores de *docking score*, los cuales se refieren a la energía de unión en kcal/mol entre el ligando y su enzima receptora. Estos valores serán comparados más adelante con los valores del acoplamiento de cada compuesto.

Cada acoplamiento ligando-proteína comprende un grupo de interacciones, de las cuales algunas de estas le confieren la capacidad a un ligando de ejercer una acción inhibitoria o activadora de una enzima (**Figura 34**). En el caso del DTT y la enzima PRDX 5, la interacción principal es entre uno de los hidroxilos del diol del antioxidante y el residuo Cys⁴⁷ del sitio activo de la proteína. Este enlace es aquel que permite la reducción de los peróxidos de alquilo y de hidrógeno a su vez que el residuo de cisteína se oxida a ácido sulfínico (Cys-SO₂H). Otros residuos que se encuentran en el sitio activo de la enzima consisten en Arg¹²⁷, Thr⁴⁴, Thr¹⁴⁷, Pro⁴⁰, Pro⁴⁵, Val³⁹, Gly⁴⁶ (Barelier et al., 2010; Hall et al., 2010; Knoops et al., 2011; Rhee, 2016 y Woo et al., 2005).

La estructura cristalina de NOX2 con la que se trabajó en el caso fue la que pertenece *Lactobacillus sanfranciscensis*. La estructura de NOX2 se divide en tres dominios: un dominio N-terminal de unión a la flavina adenina dinucleótido (FAD), un dominio intermedio de unión a NADPH y un dominio C-terminal de dimerización. El proceso de docking molecular se realiza centrándose en el dominio intermedio de unión a NADPH, el cual contiene una molécula de adenosín difosfato (ADP) no inhibidora, pero que se emplea para llevar a cabo la validación del procedimiento. Los aminoácidos involucrados en esta unión consisten en: Lys¹⁸⁷, Tyr¹⁸⁸, His¹⁸¹, Lys²¹³, Asp¹⁷⁹, Ile²⁴³, Cys²⁴², Ile¹⁶⁰, Phe²⁴⁵, Leu²⁹⁹ y Tyr¹⁵⁹ (Lountos et al., 2006).

Por otro lado, el sitio activo de la acetilcolinesterasa humana está abordado dos sitios llamados Sitio aniónico o catalítico (CAS) y Sitio aniónico periférico (PAS). CAS (en el que se encuentran los residuos Ser²⁰³, His⁴⁴⁷ y Glu³³⁴). Existen subdivisiones que también cobran importancia como el *subsitio aniónico* conformado por Trp⁸⁶, Tyr¹³⁶, Tyr³³⁷ y Phe³³⁸; además, también se encuentra el *bolsillo de acilo* en el que se encuentran los residuos de aminoácido Phe²⁹⁵ y Phe²⁹⁷; y por último, un *hueco oxianiónico* con Gly¹²¹, Gly¹²² y Ala²⁰⁴. Además, a 20 Å del sitio activo, como promotor del primer paso en la vía catalítica al unirse a la acetilcolina, y comomodulador del enlace de inhibidores y de la catálisis, surge el sitio aniónico periférico (PAS). En éste se encuentran los residuos Tyr⁷², Asp⁷⁴, Tyr¹²⁴, Trp²⁸⁶ y Tyr³⁴¹ (Johnson & Moore, 2006).

Por último, los inhibidores de la HCK se concentran principalmente en el *dominio quinasa*, que se divide en dos lóbulos representantes del sitio activo de la enzima. El lóbulo N-terminal es el responsable de anclar y orientar al ATP, mientras que el lóbulo C-terminal se encarga de su unión, aunque cierta parte de este proceso también se realiza en el primer lóbulo (Roskoski, 2004). Entre los residuos de aminoácido implicados en el sitio de unión del ATP de la enzima se encuentran: Lys²⁹⁵, Asp³⁴⁸, Asp⁴⁰⁴, Ala²⁹³, Leu²⁷³, Phe³⁴⁰, Thr³³⁸, Met³⁴¹, Val²⁸¹, Ala⁴⁰³, Met³¹⁴, Ile³³⁶, Leu³⁹³, Ser³⁴⁵, Gly³⁴⁴ (Roskoski, 2004; Schindler et al., 1999; Tintori et al., 2013; Wright et al., 2015).

Figura 34*Interacciones entre los ligandos de referencia y su respectiva enzima*

Nota. Se presentan resultados de (a) DTT (b) Donepezil, (c) quercetina, (d) Dextrometorfano

Una vez terminada la validación, se procedió a realizar el docking de los compuestos seleccionados con las tres enzimas presentadas. A continuación, aparecen los resultados obtenidos:

Tabla 9

Resultados del docking de los compuestos con las enzimas PRDX 5, AChE, HCK y NOX2

Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)			
	PRDX 5	AChE	HCK	NOX2
2a	-6,0	-9,8	-9,2	-8,3
2b	-5,7	-10,6	-8,4	-7,7
3b	-5,4	-10,5	-8,3	-7,5
3b1	-7,2	-12,5	-9,7	-9,1
3b3	-6,8	-12,3	-9,9	-9,1
3b4	-6,7	-12,8	-10,0	-9,3
4b	-5,5	-10,3	-8,1	-7,6
4b1	-6,1	-12,5	-8,8	-8,9
DEX	No aplica	No aplica	No aplica	-8,3
DTT	-3,5	No aplica	No aplica	No aplica
Donepezil	No aplica	-11,7	No aplica	No aplica
Quercetina	No aplica	No aplica	-8,0	No aplica

El acoplamiento molecular entre los compuestos seleccionados y la enzima peroxirredoxina 5 arrojó resultados de energía de unión menores a su ligando de referencia, el DTT, cuyo valor fue -3,5 kcal/mol. A pesar de que todos los compuestos generaron interacciones con varios residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima como puentes de hidrógeno convencionales con Thr¹⁴⁷, enlaces alquilo π con Ile¹¹⁹ e interacciones con Thr⁴⁴ y Phe¹²⁰ (Ver **Apéndice E**), la interacción con el residuo Cys⁴⁷ solo se pudo observar con la tetrahydroquinolina 2a y el híbrido 4b1, siendo en ambos casos un enlace de tipo sulfuro- π . Esta interacción no es lo suficientemente fuerte como lo es el puente de hidrógeno, por lo que no podrá intervenir en los procesos de oxidación del residuo de cisteína. Es por esto por lo que la peroxirredoxina 5 no puede ser considerada la enzima receptora de ninguno de los compuestos seleccionados.

En el caso de NOX2, adicional al acoplamiento entre los compuestos seleccionados, se evaluaron las interacciones entre la enzima y un inhibidor conocido de ella, el dextrometorfano (DEX). Únicamente se hablará de las interacciones de los compuestos con menor o igual energía de unión que el control, resultando ser 2a, 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1 **Tabla 10**. (Para ver las interacciones de todos los compuestos ir al **Apéndice E**).

Tabla 10

Interacciones de los compuestos 2a, 3b1, 3b3, 3b4 y el inhibidor DEX con aminoácidos importantes

Residuo de aminoácido	Compuesto	Tipo de interacción
His ¹⁸¹	NO	NO
Lis ²¹³	NO	NO
Asp ¹⁷⁹	NO	NO
Ile ²⁴³	NO	NO
Cys ²⁴²	NO	NO
Phe ²⁴⁵	2a	π - π en forma de T
Ile ¹⁶⁰	DEX, 2a	σ - π
Tyr ¹⁵⁹	DEX, 2a, 3b3,3b4,4b1	Alquilo- π , π - π sándwich, π - π en forma de T
Tyr ¹⁸⁸	DEX,3b1,3b3,3b4,4b1	π - π en forma de T
Leu ²⁹⁹	DEX, 2a,3b1,3b3,3b4,4b1	Alquilo- π , alquilo-alquilo
Lys ¹⁸⁷	3b1, 3b3,3b4,4b1	Alquilo- π , alquilo-alquilo

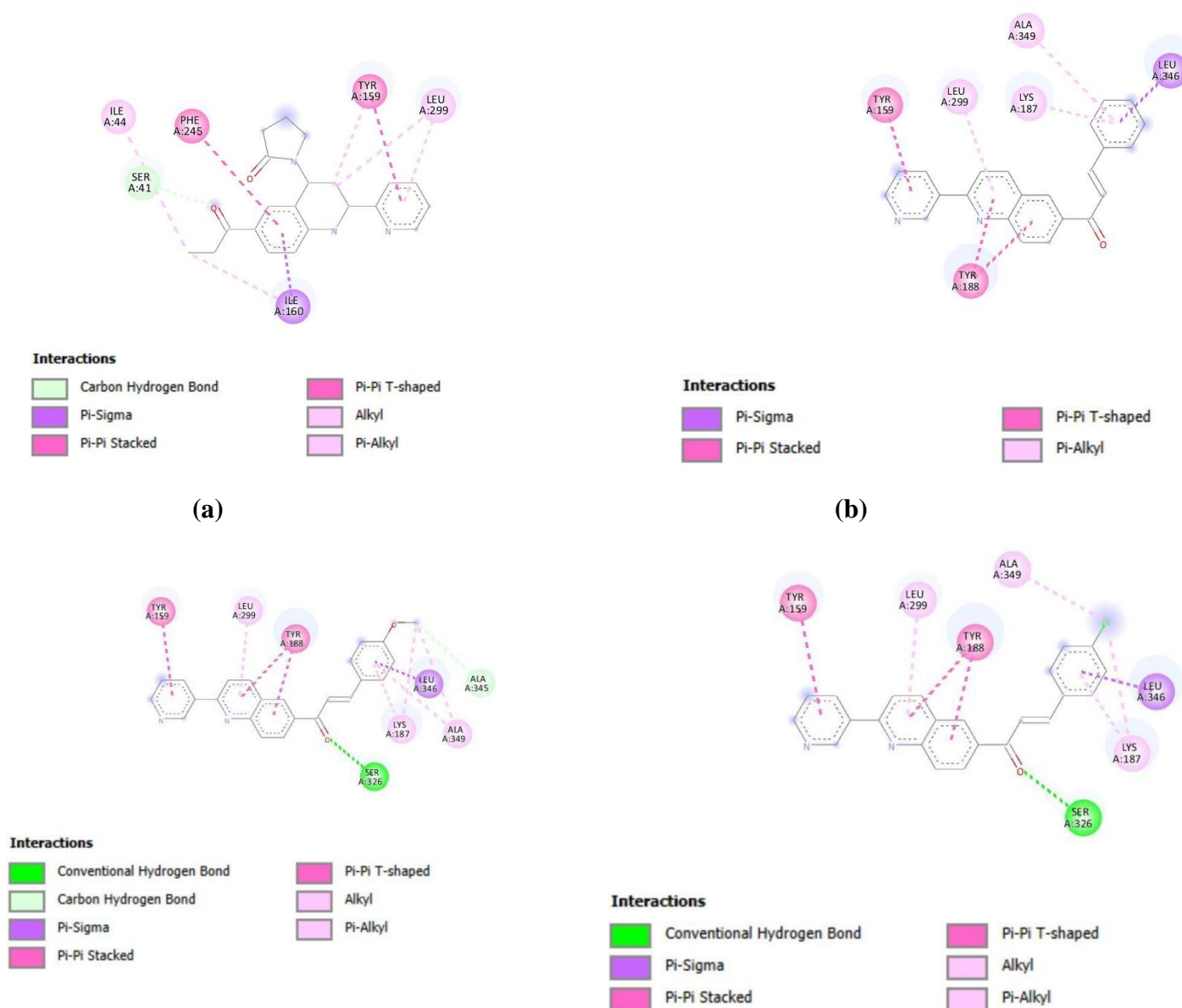
Nota. NO =No se observó

Como se puede observar en la **Tabla 9**, cada compuesto generó interacciones con tres de los residuos de aminoácidos involucrados con el dominio intermedio de unión a NADPH para la THQ y cuatro para los híbridos. Para la primera, estos residuos son Phe²⁴⁵, Ile¹⁶⁰ y Tyr¹⁵⁹, mientras que para los híbridos las interacciones se dieron con los residuos Tyr¹⁵⁹, Tyr¹⁸⁸, Leu²⁹⁹ y Lys¹⁸⁷. Sin embargo, todas estas interacciones son de tipo alquilo- π y π - π . Es notable que los enlaces surgidos con Tyr¹⁸⁸ se dieron en los dos anillos del núcleo quinolínico únicamente con los híbridos 3b1,3b3, 3b4, mientras que en 4b1, Tyr¹⁸⁸ solo presentó interacción con el anillo de benceno. Esto puede indicar que la posición *meta* del nitrógeno en el anillo de piridina permitió que dieran estos tipos de enlace.

En la **Figura 35** se puede observar que sí se generaron enlaces de puente de hidrógeno, pero con residuos que no hacen parte del sitio activo, a excepción de 2a y 3b1, quienes no presentaron enlaces de este tipo. Pese a esto, los resultados al compararse con la literatura indican que los compuestos 2a, 3b1, 3b3 y 3b4 tienen la capacidad de combatir el estrés oxidativo mediante la inhibición de NOX2 gracias a las interacciones con los diferentes residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo de la proteína (Bazaid et al., 2023; (Farouk et al., 2021; Kritsi et al., 2022)

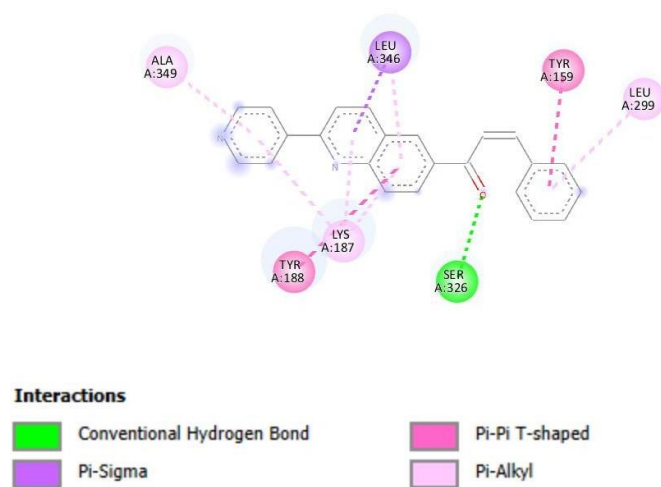
Figura 35

Interacciones entre los compuestos 2a, 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1 y la enzima NOX2



(c)

(d)



(e)

Nota. Se presentan resultados de (a) 2a, (b) 3b1, (c) 3b3, (d) 3b4 y (e) 4b1

Por otro lado, las interacciones entre la acetilcolinesterasa y los compuestos con una menor energía de enlace que la que expresó el Donepezil se tabularon en la **Tabla 10** (Para ver las interacciones de todos los compuestos ir al **Apéndice D**).

Tabla 10

Información del acoplamiento de los compuestos 3b1, 3b3, 3b4 y 2b1 con AChE

Compuesto	Interacciones con el receptor	Sitio catalítico
Donepezil	Trp ⁸⁶ / π - π sándwich	Subsitio aniónico
	Tyr ³³⁷ /Alquilo- π	Subsitio aniónico
	Phe ³³⁸ /Alquilo- π	Subsitio aniónico
	Tyr ⁷² /Alquilo- π	PAS
	Trp ²⁸⁶ / σ - π , π - π sándwich, alquilo π	PAS
	Tyr ³⁴¹ / π - π sándwich, alquilo- π	PAS
	His ⁴⁴⁷ /Puente de hidrógeno-carbono	CAS
3b1	His ⁴⁴⁷ / π - π en forma de T	CAS
	Ser ²⁰³ /Puente de hidrógeno convencional	CAS
	Phe ²⁹⁵ /Puente de hidrógeno convencional	Bolsillo de acil
	Tyr ³³⁷ / π - π en forma de T	Subsitio aniónico
	Tyr ³⁴¹ / π - π en forma de T	PAS
	Trp ²⁸⁶ / π - π sándwich	PAS

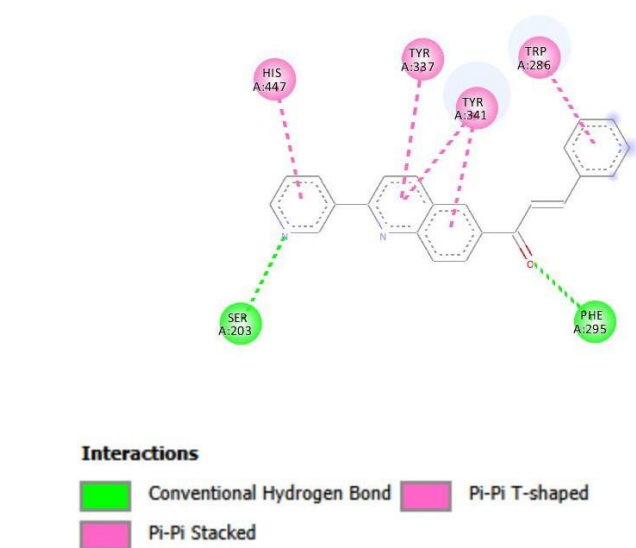
	Ser ²⁰³ /Puente de hidrógeno convencional	CAS
	Phe ²⁹⁵ /Puente de hidrógeno convencional	Bolsillo de acil
3b3	Tyr ⁷² /Alquilo- π , puente de hidrógeno-carbono	PAS
	Trp ²⁸⁶ / π - π sándwich, alquilo π	PAS
	Tyr ³⁴¹ / π - π en forma de T	PAS
	Tyr ³³⁷ / π - π en forma de T	Subsitio aniónico
<hr/>		
	Ser ²⁰³ / Puente de hidrógeno convencional	CAS
	Phe ²⁹⁵ / Puente de hidrógeno convencional	Bolsillo de acil
	His ⁴⁴⁷ / π - π en forma de T	CAS
3b4	Tyr ³³⁷ / π - π en forma de T	Subsitio aniónico
	Tyr ³⁴¹ / π - π en forma de T	PAS
	Trp ²⁸⁶ / π - π sándwich, alquilo π	PAS
	Tyr ⁷² /Alquilo- π	PAS
<hr/>		
	His ⁴⁴⁷ / π - π en forma de T	PAS
	Trp ²⁸⁶ / π - π sándwich	PAS
4b1	Tyr ³⁴¹ / π - π sándwich	PAS
	Trp ⁸⁶ / π - π en forma de T	Subsitio aniónico
	Tyr ³³⁷ / π - π sándwich	Subsitio aniónico

El docking del Donepezil con la AChE muestra que el fármaco se une tanto a CAS, como a PAS (principalmente a este último) y presenta enlaces con los residuos de aminoácido que conforman el subsitio aniónico. Los demás compuestos, que resultaron ser únicamente híbridos, de igual manera tuvieron uniones con ambos sitios. Es observable también que los cuatro compuestos tuvieron uniones con el subsitio aniónico, especialmente con interacciones de tipo π con Tyr³³⁷, y con Tyr³⁴¹, proveniente de PAS. Otros enlaces que se repitieron fueron los puentes de hidrógeno convencionales con los residuos Ser²⁰³ y Phe²⁹⁵ entre los compuestos 3b1, 3b3 y 3b4, y el apilamiento π - π en forma de T con His⁴⁴⁷, en los compuestos 3b1, 3b4 y 4b1. Los puentes de hidrógeno mencionados anteriormente formados con los híbridos quinolina-chalcona pertenecientes a la familia R₂ = 3-N fueron formados entre Ser²³⁰ y el átomo de nitrógeno de la piridina y entre Phe²⁹⁵ con el oxígeno del grupo carbonilo (**Figura 36**). Como se puede ver, ningún puente de hidrógeno se registró en el compuesto 4b1, por lo que se puede decir que la posición *meta* del átomo de nitrógeno en la piridina fue clave para que se generaran estas interacciones.

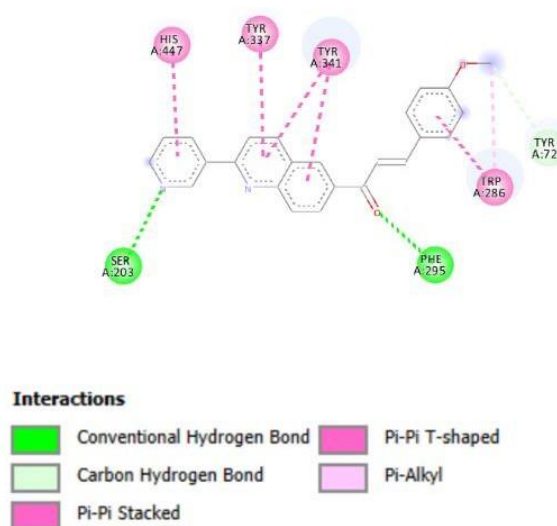
Precisamente, debido a las condiciones de estas interacciones, el anillo de piridina junto con el carbonilo, son quienes se encuentran ubicados enlazándose con el sitio CAS, mientras los demás anillos se comunican con PAS. De igual manera, estos mismos compuestos interactúan con el bolsillo de acilo a causa del puente de hidrógeno originado por el carbonilo, mientras 4b1 no.

Figura 36

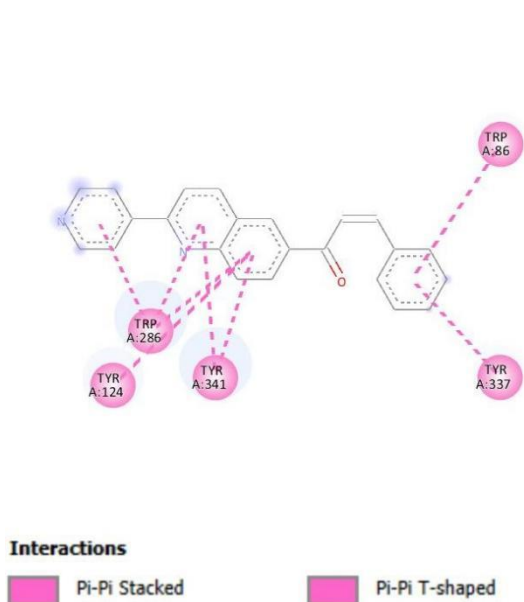
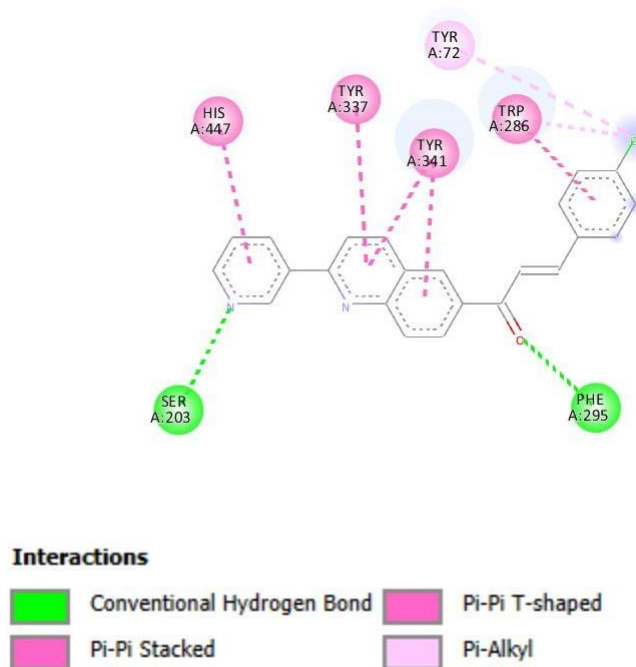
Interacciones de los híbridos 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1 con AChE



(a)



(b)



(c)

(d)

Nota. Se presentan resultados de (a) 3b1, (b) 3b3, (c) 3b4 y (d) 4b1

Como resultado de los bajos valores de energía de afinidad y las interacciones con residuos de aminoácidos característicos de los sitios CAS y PAS, junto con el subsitio aniónico y el bolsillo de acilo, los híbridos quinolina-chalcona 3b1, 3b3 y 3b4 se pueden considerar teóricamente inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.

El compuesto 4b1, con un valor de energía de unión de -12,5 kcal/mol, posee enlaces con residuos de aminoácidos que conforman el sitio PAS y el subsitio aniónico, por lo que de igual manera puede ser considerado como inhibidor de AChE.

Para culminar el análisis del acoplamiento molecular, se tienen los datos de la enzima tirosina quinasa HCK. Pese a que todos los compuestos seleccionados arrojaron energías de unión menores a la que exhibió la quercetina, se discutirá el docking de aquellos compuestos con valores menores a -9 kcal/mol, es decir, la tetrahydroquinolina 2a y los híbridos 3b1, 3b3 y 3b4 (**Tabla 11**) (Para ver las interacciones de todos los compuestos ir al **Apéndice E**).

Tabla 11

Interacciones de los compuestos 2a, 3b1, 3b3 y 3b4 con HCK

Compuesto	Interacciones con el receptor
Quercetina	Ala ³⁹⁰ / Puente de hidrógeno convencional
	Thr ³³⁸ / Enlace O-O
	Val ²⁸¹ / σ - π , Alquilo- π
	Gly ³³⁴ / Puente de hidrógeno-carbono
	Asp ³⁴⁸ / Anión- π
	Ala ²⁹³ / Alquilo- π
2a	Leu ²⁷³ / Alquilo- π
	Leu ³⁹³ / Alquilo- π
	Ser ³⁴⁵ / Puente de hidrógeno convencional, puente de hidrógeno-carbono

	Lys ²⁹⁵ / Puente de hidrógeno convencional
	Asp ⁴⁰⁴ / Puente de hidrógeno convencional
	Ala ³⁹⁰ / Puente de hidrógeno-carbono
	Ala ⁴⁰³ / Alquilo- π
	Leu ³⁹³ / Alquilo- π , alquilo-alquilo
	Met ³⁴¹ / Alquilo-alquilo
	Leu ²⁷³ / Alquilo-alquilo
	Val ²⁸¹ / Alquilo- π , alquilo-alquilo
3b1	Asp ³⁴⁸ / Anión- π
	Asp ⁴⁰⁴ /Anión- π
	Val ²⁸¹ / σ - π , Alquilo- π
	Leu ³⁹³ / Alquilo- π
	Ile ³³⁶ / Alquilo- π
	Lys ²⁹⁵ / Alquilo- π
	Leu ³²⁵ / Alquilo- π
	Ala ⁴⁰³ / Alquilo- π
3b3	Met ³¹⁴ / Sulfuro- π , Alquilo-alquilo
	Asp ⁴⁰⁴ /Anión- π
	Asp ³⁴⁸ / Anión- π
	Val ²⁸¹ / σ - π , Alquilo- π
	Leu ³⁹³ / Alquilo- π
	Ala ⁴⁰³ / Alquilo- π
	Lys ²⁹⁵ / Alquilo- π
	Leu ³²⁵ / Alquilo- π
Ile ³³⁶ / Alquilo- π , alquilo-alquilo	
Phe ³⁰⁷ / Alquilo- π	
3b4	Thr ³³⁸ / Puente de hidrógeno convencional
	Asp ⁴⁰⁴ /Anión- π , puente de hidrógeno- π
	Met ³¹⁴ / Alquilo- π
	Ile ³³⁶ / Alquilo- π
	Lys ²⁹⁵ / Alquilo- π
	Ala ²⁹³ / Alquilo- π
	Ala ⁴⁰³ / Alquilo- π
	Val ²⁸¹ / Alquilo- π
Leu ²⁷³ / Alquilo- π	

Con los datos de la **Tabla 11**, se puede observar que todas las moléculas establecieron un gran número de interacciones con los residuos con el sitio de unión del ATP. Un enlace que se repitió en todos los compuestos, incluida la quercetina, se trató de Val²⁸¹ de tipo alquilo- π , σ - π o alquilo-alquilo,

y en algunos casos de dos tipos en un compuesto. Los enlaces de tipo alquilo- π con Ala⁴⁰³ y con Lys²⁹⁵ tomaron presencia en los todos los híbridos y la THQ. Otro residuo de aminoácido que estuvo presente en los compuestos anteriormente nombrados fue Asp⁴⁰⁴, presentándose en enlaces de puente de hidrógeno convencional, puente de hidrógeno- π y anión- π . Asp³⁴⁸ fue expresado por la quercetina y los híbridos 3b1 y 3b3. Los puentes de hidrógeno convencional solo aparecieron en 2a y 3b4, teniendo el primer tres enlaces de este tipo, sin embargo, ninguno de los dos compuestos compartió el puente de hidrógeno con los mismos residuos. El enlace entre Ile³³⁶ se vio expresado únicamente en los tres híbridos quinolina-chalcona, pero los híbridos 3b1 y 3b3 lo presentan en el anillo A de la chalcona, mientras que 3b4 en el anillo de piridina y en la piridina de la quinolina.

5.7 Predicción del perfil ADMET

Las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de una molécula con potencial farmacológico (ADMET) poseen una gran relevancia para que ésta logre generar un efecto terapéutico de manera óptima. Independientemente de que un compuesto exhiba excelentes características de actividad y especificidad, no podrá emplearse como fármaco si no entra adecuadamente a un sistema, llega a las partes a las que está asignado abordar y sin sufrir procesos de metabolización antes de ejercer su actividad biológica, y eliminarse apropiadamente (Hodgson, 2001; Buxton, 2022). Además, aquellas sustancias que presentan un perfil ADME desfavorable generalmente conllevan a resultados fallidos en sus estudios clínicos (Jang et al., 2018).

A continuación, se presenta una recopilación de los datos de cada compuesto, referentes a sus propiedades de lipofilidad, solubilidad en agua y farmacocinética recolectadas por la herramienta *SwissADME*:

Tabla 12

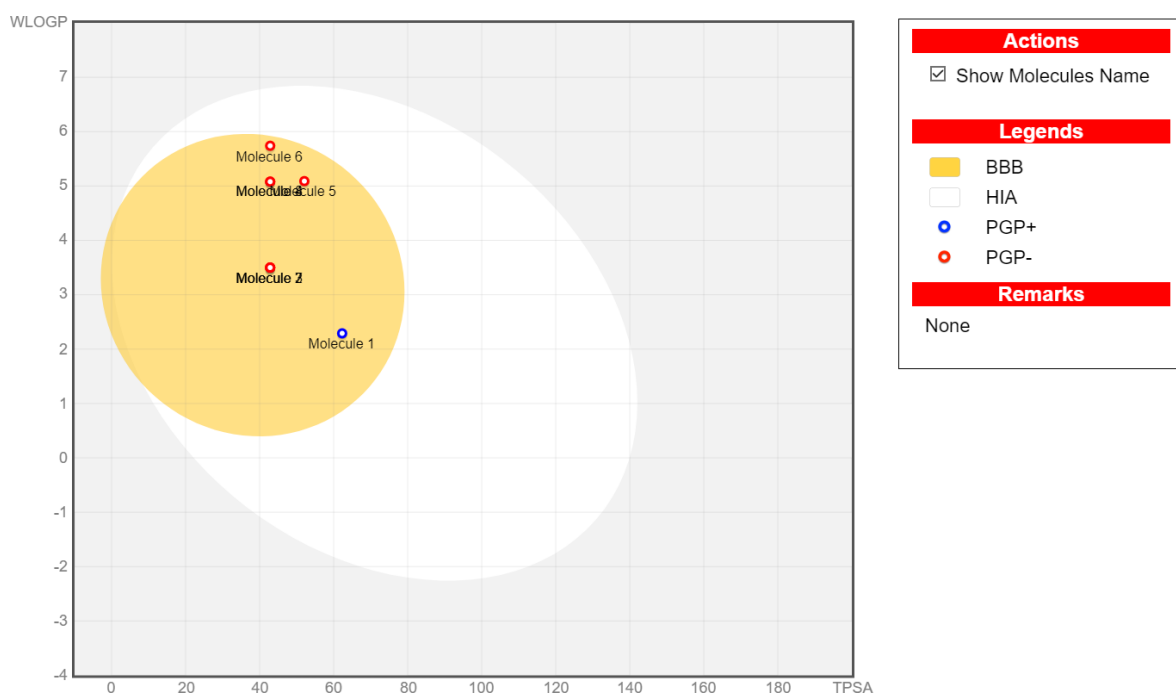
Propiedades ADME de los compuestos 2a, 2b, 3b, 3b1, 3b3, 3b4, 4b y 4b1

Compuesto	Log P _{o/w} Consenso	Log S	Inhibe CYP1A2	Inhibe CYP2C19	Inhibe CYP2C9	Inhibe CYP2D6	Inhibe CYP3A4	Log K _p (cm/s)	Violación reglas Lipinski
2a	2,41	-3,39	No	Sí	No	Sí	Sí	-6,95	0
2b	2,97	-3,97	Sí	Sí	No	Sí	Sí	-5,45	0
3b	2,74	-3,43	Sí	Sí	No	Sí	Sí	-6,06	0
3b1	4,22	-5,15	Sí	Sí	Sí	No	Sí	-5,12	0
3b3	4,21	-5,21	Sí	Sí	Sí	No	Sí	-5,33	0
3b4	4,76	-5,74	Sí	Sí	Sí	No	Sí	-4,88	0
4b	2,72	-3,43	Sí	Sí	No	Sí	Sí	-6,06	0
4b1	4,22	-5,15	Sí	Sí	Sí	No	Sí	-5,12	0

Nota. Log P_{o/w} = Coeficiente de partición octanol/agua, Log S = Solubilidad en agua Log K_p= Coeficiente de permeación de la piel.

Figura 37

Diagrama de huevo hervido para los compuestos 2a, 2b, 3b, 3b1, 3b3, 3b4, 4b y 4b1



Nota. Se muestra la información de Molecule 1(2a), Molecule 2 (2b), Molecule 3 (3b), Molecule 4(3b1), Molecule 5 (3b3), Molecule 6 (3b4), Molecule 7 (4b) y Molecule 8 (4b1). BBB: Área de permeación de la barrera hematoencefálica; HIA: Área de permeación del tracto intestinal; P-gp+ = sustrato de glicoproteína P; P-gp- = No es sustrato de glicoproteína P.

La **Tabla 12** permite saber, en primer lugar, el valor de Log $P_{o/w}$ Consenso, lo que quiere decir que este valor hace referencia al promedio de los valores arrojados por los modelos predictivos de la lipofilidad del compuesto. Estos métodos de cálculo de este parámetro se pueden dividir en: métodos de fragmentación del compuesto, métodos topológicos y métodos basados en la física. Valores mayores a 1 indican que el compuesto es de naturaleza lipofílica, mientras que valores menores a 1 son propios de compuestos hidrofílicos (Bannan et al., 2016). Según la tabla, todos los compuestos son hidrofóbicos, siendo la tetrahydroquinolina el menos lipofílico, y los híbridos quinolina-chalcona los más lipofílicos, siendo el 3b4 el de mayor puntaje.

La solubilidad en agua de las moléculas se midió mediante el descriptor Log S. Es importante que un fármaco sea soluble en agua para facilitar su formulación, manipulación y absorción. Ésta última teniendo en cuenta si se quiere administrar de manera oral (Daina et al., 2017). La solubilidad se clasifica de manera: Insoluble < -10 < Pobre < -6 < Moderada < -4 < Soluble < -2 < Muy soluble < 0 < Altamente soluble. De acuerdo con este criterio, los precursores se consideran solubles, mientras que todos los híbridos son moderadamente solubles. Este fenómeno se atribuye a que los híbridos poseen un grupo aromático adicional a los precursores; además los sustituyentes en el anillo A de la chalcona también agregan hidrofobicidad, mientras que la tetrahydroquinolina tiene mayor disposición a formar puentes de hidrógeno.

Para el análisis de la farmacocinética, se puede apreciar la **Figura 37**, en la que se ilustra un diagrama de huevo hervido o por sus siglas en inglés *BOILED-Egg (Brain Or IntestinaL EstimateD permeation predictive model)*. Es un diagrama en el que se combinan las áreas demarcadas para que una molécula asegure su paso tanto por el tracto intestinal (HIA) como por la barrera hematoencefálica (BBB) exclusivamente por transporte pasivo (Daina & Zoete, 2016). Por lo tanto, si una molécula permea la barrea de sangre-líquido cerebral, se puede decir que tampoco habrá problema para tener una buena absorción por la barrera permeación gastrointestinal. No obstante, atravesar el tracto intestinal no garantiza la permeación hematoencefálica.

El diagrama está construido a partir del descriptor de lipofiliidad WLOGP de un compuesto en función de su área de superficie polar topológica (TPSA). La TPSA es descrita por Ertl et al. (2000) como la suma de las superficies de los átomos polares de una molécula y es un parámetro muy útil para predecir el nivel de biodisponibilidad de un candidato a fármaco. Ahora, en la **Figura 37** también es posible conocer si dicha molécula es sustrato o no de la glicoproteína P. Esta proteína se encuentra expresada en las células sanguíneas, de la barrera hematoencefálica (BBB), del epitelio intestinal, túbulo renal, hígado, placenta, ovarios y testículos, entre otros, y se encarga de expulsar compuestos xenobióticos como fármacos fuera de las células. De esta manera, si una molécula es sustrato de P-gp, su absorción se verá disminuida e incrementada su eliminación del organismo (Peralta et al., 2008).

Según la información anterior, todos los precursores e híbridos permean la barrera hematoencefálica y gozan de una buena absorción gastrointestinal por su ubicación en la zona de la yema de huevo. Sin embargo, 2a presentará problemas en su proceso de distribución a los diferentes tejidos del cuerpo (incluyendo BBB y HIA) y tendrá una mayor tasa de eliminación debido a que es sustrato de P-gp.

Existe un importante grupo de enzimas encargadas metabolizar de aproximadamente el 50% de los fármacos. Las enzimas citocromo P450 (CYP) se encuentran principalmente en el hígado, pero también se expresa en el tubo digestivo, pulmones, riñones y sistema nervioso central. Como variadas moléculas son sustrato de estas proteínas, especialmente de las isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, su inhibición por parte de otros fármacos conduce a la ralentización del metabolismo de las moléculas sustrato, aumentando su concentración en el torrente sanguíneo. Debido a esto, pueden desencadenarse efectos tóxicos en el organismo (Daina et al., 2017; Di, 2014; Gonzalez et al., 2022).

En la **Tabla 12** se puede observar que se predijo una inhibición de CYP3A4 y CYP2C19 por parte de todos los compuestos. Además, los precursores quinolínicos 2b, 3b y 4b inhibieron todas las isoenzimas a excepción de CYP2C9, mientras que los híbridos inhibieron todas las enzimas a excepción de CYP2D6. En general, todos los compuestos poseen potencial para afectar cambios en el metabolismo de compuestos que sean sustrato de estas enzimas, por lo que se deberá tener precaución en este factor para evitar interacciones farmacológicas futuras y efectos tóxicos.

El $\log K_p$ es un descriptor que indica la capacidad de un compuesto para atravesar la piel. A medida que el valor de $\log K_p$ se vuelve más negativo, menos permeable a la piel será el compuesto (Daina et al., 2017). Según los resultados, los valores entre -4,88 y -6,95 cm/s de los compuestos seleccionados indican una baja permeabilidad a la piel, descartando la vía transdérmica para el ingreso al organismo.

Por último, Lipinski et al. (2001) establecieron una serie de parámetros para conocer si un fármaco puede ser administrado de forma oral de acuerdo con su biodisponibilidad. Las 4 reglas de Lipinski para una molécula candidata a fármaco:

1. Su peso molecular (MWT) debe ser menor o igual a 500 una
2. El Log P debe ser menor o igual a 5
3. Su número de aceptores de puentes de hidrógeno debe ser menor o igual a 10
4. No debe exceder 5 donadores de puentes de hidrógeno

Según la **Tabla 12**, ninguno de los compuestos infringe alguna regla, por lo que es posible que puedan ser administrados exitosamente de manera oral.

6. Conclusiones

Una serie de seis precursores y sus 12 híbridos quinolina-chalcona fueron seleccionados para estudiar su actividad citotóxica mediante el ensayo de viabilidad de MTT en células HeLa, HaCaT y

Vero. El screening a 10 μM permitió conocer que los híbridos que poseían un metilo como sustituyente en la posición *para* del anillo A de la chalcona (2b2, 3b2 y 4b2) presentaron una selectividad hacia las células no tumorales, ya que se observó un mayor efecto citotóxico en dichas células que en las células cancerosas. Con el trazado de curvas de IC_{50} en los compuestos tanto tóxicos (aquellos que bajaron la viabilidad a un porcentaje menor del 80%), como de los no tóxicos (aquellos que mantuvieron la viabilidad superior al 80%) se descubrió que el compuesto 2b es el más citotóxico de todos los ensayados con una $\text{IC}_{50} = 41,650 \mu\text{M}$ sobre las células tumorales, pero este a su vez exhibe una actividad proliferativa baja, por lo que se puede concluir que todos los compuestos son poco citotóxicos hacia las tres líneas celulares de estudio.

El ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno permitió conocer la capacidad antioxidante de los compuestos ensayados. El ensayo de ROS basales permitió conocer la alta cantidad de estas especies presentes en las células HeLa, con relación a las células no tumorales, confirmando el metabolismo alterado de los ambientes tumorales que se adaptan para promover la proliferación de sus células, además de la modificación de sus componentes y funciones causado por el estrés oxidativo. Se evidenció además que las células HaCaT no se vieron afectadas por los compuestos, a diferencia de las células HeLa y Vero. Los compuestos 2a, 2b, 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1 mostraron una alta capacidad antioxidante, reduciendo los porcentajes de ROS a valores de aproximadamente 19, 15, 20, 22, 3, 45 y 23%, respectivamente, en las células HeLa a una concentración de 10 μM . En las células Vero, los compuestos 2a y 3b redujeron. En las células tumorales, se observó que para los compuestos con el átomo de nitrógeno en la posición *orto* de la piridina, la hibridación de los precursores provocó una pérdida en su actividad antioxidante. En cambio, los compuestos con el átomo de nitrógeno en las posiciones 3 y 4 de la piridina mostraron un aumento en la actividad antioxidante al pasar del precursor de tetrahydroquinolina al de quinolina, y de este a los compuestos híbridos.

Dado que las moléculas presentan baja citotoxicidad en células no tumorales pero una gran capacidad antioxidante, se puede proponer su inclusión como terapia coadyuvante junto a agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Además, fue posible observar que no existe una relación directa entre la actividad antioxidante y la actividad citotóxica de los compuestos ensayados.

El procedimiento *in silico* de acoplamiento molecular reveló que la inhibición de la enzima NADPH oxidasa 2 es el mecanismo por el cual los híbridos, como 2a, 3b1, 3b3, 3b4 y 4b1, ejercen su función antioxidante en las células estudiadas. Estos compuestos mostraron valores de energía de enlace menores que el compuesto de referencia DEX y también exhibieron interacciones esenciales entre el ligando y la proteína. Además, el docking realizado con enzimas presentes en tejidos nerviosos, como la acetilcolinesterasa, y en células hematopoyéticas, como la quinasa de células hematopoyéticas, apoyó la teoría de que los compuestos 2a, 3b1, 3b3 y 3b4 tienen la capacidad de actuar como agentes antiinflamatorios y antiproliferativos, nuevamente por sus bajos valores de energía de enlaces, menores a sus respectivos compuestos de referencia y la aparición de interacciones necesarias para la inhibición de la enzima. Cabe destacar que los híbridos con el átomo de nitrógeno de la piridina en la posición meta (3b1, 3b3 y 3b4) presentaron los mejores valores de energía de enlace con las enzimas analizadas.

El perfil ADMET de los compuestos con mayor capacidad antioxidante exhibió excelentes resultados en cuanto a su biodisponibilidad oral, debido a sus características de lipofilicidad, solubilidad en agua y farmacocinética. Adicionalmente ninguna molécula presentó violaciones a las reglas de Lipinski, por lo que se presentan como buenos candidatos a fármacos.

7. Recomendaciones

Con el fin de continuar y expandir la investigación de los compuestos ensayados, se sugiere realizar ensayos de sinergismo con agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer de cuello uterino como el cisplatino o la doxorubicina para estudiar la capacidad de las moléculas de reducir la toxicidad asociada a la quimioterapia, el incremento de la eficacia terapéutica y el aumento en la supervivencia de los pacientes.

Para confirmar los resultados de los ensayos *in silico*, se recomienda realizar los respectivos ensayos de inhibición sobre las enzimas empleadas en el acoplamiento molecular.

8. Referencias bibliográficas

- Abbas, S. H., El-Hafeez, A. A. A., Shoman, M. E., Montano, M. M., & Hassan, H. A. (2019). New quinoline/chalcone hybrids as anti-cancer agents: Design, synthesis, and evaluations of cytotoxicity and PI3K inhibitory activity. *Bioorganic Chemistry*, 82, 360-377.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.064>
- Abdel-Aziz, M., Park, S. E., Abuo-Rahma, G. E. A., Sayed, M., & Kwon, Y. J. (2013). Novel N-4-piperazinyl-ciprofloxacin-chalcone hybrids: Synthesis, physicochemical properties, anticancer and topoisomerase I and II inhibitory activity. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 69, 427-438.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.040>
- Abdelbaset, M. S., Abdel-Aziz, M., Ramadan, M., Abdelrahman, M. H., Bukhari, S. N. A., Ali, T. F. S., Abuo-Rahma, G. E. A. (2019). Discovery of novel thienoquinoline-2-carboxamide chalcone derivatives as antiproliferative EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(6), 1076-1086. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.02.012>
- Aly, R. M., Serya, R. A. T., El-Motwally, A. M., Esmat, A., Abbas, S. Y., & Ella, D. A. A. E. (2017). Novel quinoline-3-carboxamides (Part 2): Design, optimization and synthesis of quinoline based scaffold as EGFR inhibitors with potent anticancer activity. *Bioorganic Chemistry*, 75, 368-392.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.018>
- Anisimov, V. N., Zabezhinski, M. A., Popovich, I. G., Zaripova, E. A., Musatov, S., André, V., Vigreux, C., Godard, T., & Sichel, F. (2000). Inhibitory effect of melatonin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene- induced carcinogenesis of the uterine cervix and vagina in mice and mutagenesis in vitro. *Cancer Letters*, 156(2), 199-205. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(00\)00463-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(00)00463-8)

- Bannan, C. C., Calabró, G., Kyu, D. Y., & Mobley, D. L. (2016). Calculating Partition Coefficients of Small Molecules in Octanol/Water and Cyclohexane/Water. *Journal Of Chemical Theory And Computation*, 12(8), 4015-4024. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00449>
- Barelíer, S., Linard, D., Pons, J., Clippe, A., Knoops, B., Lancelin, J., & Krimm, I. (2010). Discovery of Fragment Molecules That Bind the Human Peroxiredoxin 5 Active Site. *PloS One*, 5(3), e9744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009744>
- Barile, E., De, S. K., Feng, Y., Chen, V., Yang, L., Ronai, Z. A., & Pellecchia, M. (2013). Synthesis and SAR Studies of Dual AKT/NF- κ B Inhibitors Against Melanoma. *Chemical Biology & Drug Design*, 82(5), 520-533. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12177>
- Bazaid, A. S., Alsolami, A., Patel, M., Khateb, A. M., Aldarhami, A., Snoussi, M., Almusheet, S. M., & Qanash, H. (2023). Antibiofilm, Antimicrobial, Anti-Quorum Sensing, and Antioxidant Activities of Saudi Sidr Honey: In Vitro and Molecular Docking Studies. *Pharmaceutics*, 15(9), 2177. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092177>
- Bell, E. W., & Zhang, Y. (2019). DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *Journal Of Cheminformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
- Bhattacharjee, R., Dey, T., Kumar, L., Kar, S., Sarkar, R., Ghorai, M., Malik, S., Jha, N. K., Vellingiri, B., Kesari, K. K., De la Lastra, J. M. P., & Dey, A. (2022). Cellular landscaping of cisplatin resistance in cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113345. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113345>

- Bindu, P. J., Mahadevan, K. M., Naik, T. R. R., & Harish, B. S. (2014). Synthesis, DNA binding, docking and photocleavage studies of quinolinyl chalcones. *MedChemComm*, 5(11), 1708-1717.
<https://doi.org/10.1039/c4md00185k>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. F., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal Of Cell Biology*, 106(3), 761-771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Buxton I.O. (2022). Farmacocinética: la dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos. Brunton L.L., & Knollman B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 14e*. McGraw-Hill Education
- Calaf, G. M., Urzúa, U., Termini, L., & Aguayo, F. (2018). Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget*, 9(34), 23824-23842. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25323>
- Carlberg, C. (2000). Gene Regulation by Melatonin. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 917(1), 387-396. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05403.x>
- Chen, L., Liu, L., Li, Y., & Gao, J. (2017). Melatonin increases human cervical cancer HeLa cells apoptosis induced by cisplatin via inhibition of JNK/Parkin/mitophagy axis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 54(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0200-z>
- Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., Franklin, M. C., & Height, J. J. (2012). Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 55(22), 10282-10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>
- Chikhaliya, K. H., Patel, M. M., & Vashi, D. B. (2008). Design, synthesis and evaluation of novel quinolinyl chalcones as antibacterial agents. *Arkivoc*, 2008(13), 189-197.
<https://doi.org/10.3998/ark.55501900009.d21>
- CM-H2DCFDA (*General Oxidative Stress Indicator*). (s. f.).
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827>

- Coa, J. C., García, E., Cardá, M., Agut, R., Vélez, I. D., Muñoz, J. A., Yepes, L. M., Robledo, S. M., & Cardona, W. (2017). Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of quinoline-chalcone and quinoline-chromone hybrids. *Medicinal Chemistry Research*, 26(7), 1405-1414. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1846-5>
- Colombia Source: Globocan 2020. (2021, marzo). International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, 393(10167), 169-182. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32470-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32470-x)
- Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 11(11), 1117-1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Di, L. (2014). The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, 10(3), 379-393. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.876006>
- Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., & Perluigi, M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease*, 1822(5), 737-747. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.005>
- Díez, J. (2000). Apoptosis en las enfermedades cardiovasculares. *Revista Española de Cardiología*, 53(2), 267-274. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(00\)75089-5](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(00)75089-5)

- Divya, C. S., & Pillai, M. R. (2006). Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 45(5), 320-332.
<https://doi.org/10.1002/mc.20170>
- Dludla, P. V., Jack, B., Viraragavan, A., Pfeiffer, C., Johnson, R., Louw, J., & Muller, C. J. (2018). A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicology Reports*, 5, 1014-1020. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.10.002>
- Dorababu, A., Vijayalaxmi, S., Sanjeevamurthy, R., Vidya, L., Prasannakumar, R., & MM, R. (2020). Identification of quinoline-chalcones and heterocyclic chalcone-appended quinolines as broad-spectrum pharmacological agents. *Bioorganic Chemistry*, 105, 104419.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104419>
- Ďuračková, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*, 459-469.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.931844>
- Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P. (2000). Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 43(20), 3714-3717. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>
- Fan, J., & De Lannoy, I. A. M. (2014). Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, 87(1), 93-120.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>
- Farouk, A., Mohsen, M., Ali, H., Shaaban, H., & Albaridi, N. (2021). Antioxidant Activity and Molecular Docking Study of Volatile Constituents from Different Aromatic Lamiaceous Plants Cultivated in Madinah Monawara, Saudi Arabia. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 26(14), 4145.
<https://doi.org/10.3390/molecules26144145>

- Ferrer, R., Lobo, G., Gamboa, N., Rodríguez, J., Abramjuk, C., Jung, K., Lein, M., & Charris, J. (2009). Synthesis of 7-chloroquinolinyl-4-. *Scientia Pharmaceutica*, 77.
<https://doi.org/10.3797/scipharm.0905-07>
- Forkink, M., Smeitink, J. A., Brock, R., Willems, P. H., & Koopman, W. J. (2010). Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), 1034-1044.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.022>
- García, E., Coa, J. C., Otero, E., Cardá, M., Vélez, I. D., Robledo, S. M., & Cardona, W. (2017). Synthesis and antiprotozoal activity of furanchalcone–quinoline, furanchalcone–chromone and furanchalcone–imidazole hybrids. *Medicinal Chemistry Research*, 27(2), 497-511. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2076-6>
- George, R. F., Samir, E. M., Abdelhamed, M. N., Abdel-Aziz, H. A., & Abbas, S. Y. (2019). Synthesis and anti-proliferative activity of some new quinoline based 4,5-dihydropyrazoles and their thiazole hybrids as EGFR inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 83, 186-197.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.038>
- Georgescu, S. R., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Căruntu, C., Sârbu, M. I., Matei, C., Nicolae, I., Tocut, M., Popa, M. I., & Tampa, M. (2018). New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Journal Of Immunology Research*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/5315816>
- Gonzalez FJ, Coughtrie M. Gonzalez F.J., & Coughtrie M Gonzalez, Frank J., and Michael Coughtrie. (2022). Metabolismo de los fármacos. Brunton LL, Knollman BC. Brunton L.L., & Knollman B.C.(Eds.),Eds. Laurence L. Brunton, and Björn C. Knollman. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 14e*. McGraw-Hill Education

- Graeber, M. B., & Moran, L. (2002). Mechanisms of Cell Death in Neurodegenerative Diseases: Fashion, Fiction, and Facts. *Brain Pathology*, 12(3), 385-390. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2002.tb00452.x>
- Guantai, E. M., Ncokazi, K. K., Egan, T. J., Gut, J., Rosenthal, P. J., Bhampidipati, R., Kopinathan, A., Smith, P. J., & Chibale, K. (2011). Enone– and Chalcone–Chloroquinoline Hybrid Analogues: In Silico Guided Design, Synthesis, Antiplasmodial Activity, in Vitro Metabolism, and Mechanistic Studies. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 54(10), 3637-3649. <https://doi.org/10.1021/jm200149e>
- Gupta, S., Maheshwari, A., Parab, P., Mahantshetty, U., Hawaldar, R., Chopra, S., Kerkar, R., Tongaonkar, H., Ghosh, J., Gulia, S., Kumar, N., Shylasree, T., Gawade, R., Kembhavi, Y., Gaikar, M., Menon, S., Thakur, M., Shrivastava, S. K., & Badwe, R. (2018). Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Radical Surgery Versus Concomitant Chemotherapy and Radiotherapy in Patients With Stage IB2, IIA, or IIB Squamous Cervical Cancer: A Randomized Controlled Trial. *Journal Of Clinical Oncology*, 36(16), 1548-1555. <https://doi.org/10.1200/jco.2017.75.9985>
- Halgren T. A. (1999). MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *Journal of computational chemistry*, 20(7), 730–748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199905\)20:7<730::AID-JCC8>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<730::AID-JCC8>3.0.CO;2-T)
- Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2010). Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power Is Based on Transition-State Stabilization. *Journal Of Molecular Biology/Journal Of Molecular Biology*, 402(1), 194-209. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.022>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal Of Cheminformatics*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- HELA - CCL-2 / ATCC. (s. f.). <https://www.atcc.org/products/ccl-2>

- Hodgson, J. M. B. (2001). ADMET—turning chemicals into drugs. *Nature Biotechnology*, 19(8), 722-726.
<https://doi.org/10.1038/90761>
- Ibrahim, D. A., Ella, D. A. A. E., El-Motwally, A. M., & Aly, R. M. (2015). Molecular design and synthesis of certain new quinoline derivatives having potential anticancer activity. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 102, 115-131. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.030>
- Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). Cáncer de cuello uterino. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino>
- Jang, C., Yadav, D. K., Subedi, L., Venkatesan, R., Venkanna, A., Afzal, S., Lee, E., Yoo, J., Ji, E., Kim, S. Y., & Kim, M. (2018). Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors designed by pharmacophore-based virtual screening, molecular docking and bioassay. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33354-6>
- Johnson, G., & Moore, S. (2006). The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design*, 12(2), 217-225.
<https://doi.org/10.2174/138161206775193127>
- Jomová, K., Raptová, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S., Nepovimová, E., Kuča, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives Of Toxicology*, 97(10), 2499-2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>
- Kim, S., & Baek, K. (2021). Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(12), 6173.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126173>
- Knoops, B., Goemaere, J., Van Der Eecken, V., & Declercq, J. (2011). Peroxiredoxin 5: Structure, Mechanism, and Function of the Mammalian Atypical 2-Cys Peroxiredoxin. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(3), 817-829. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3584>

- Kramer, M. P., & Węsierska-Gądek, J. (2009). Monitoring of Long-Term Effects of Resveratrol on Cell Cycle Progression of Human HeLa Cells after Administration of a Single Dose. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 1171(1), 257-263. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04884.x>
- Kritsi, E., Tsiaka, T., Ioannou, A., Mantanika, V., Strati, I. F., Panderi, I., Zoumpoulakis, P., & Sinanoglou, V. J. (2022). In Vitro and In Silico Studies to Assess Edible Flowers' Antioxidant Activities. *Applied Sciences*, 12(14), 7331. <https://doi.org/10.3390/app12147331>
- Lauria, A., La Monica, G., Bono, A., & Martorana, A. (2021). Quinoline anticancer agents active on DNA and DNA-interacting proteins: From classical to emerging therapeutic targets. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 220, 113555. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113555>
- Leekha, A., Gurjar, B. S., Tyagi, A. K., Rizvi, A., & Verma, A. (2016). Vitamin C in synergism with cisplatin induces cell death in cervical cancer cells through altered redox cycling and p53 upregulation. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology*, 142(12), 2503-2514. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2235-z>
- Lewińska, A., Adamczyk, J., Pająk, J., Stokłosa, S., Kubis, B., Pastuszek, P., Słota, E., & Wnuk, M. (2014). Curcumin-mediated decrease in the expression of nucleolar organizer regions in cervical cancer (HeLa) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 771, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.07.001>
- Li, W., Xu, F., Wen, S., Sun, H., Yao, H., Ma, C., Xu, S., Yao, H., Zhu, Z., Yang, D., Chen, Z., & Xu, J. (2018). Discovery of Novel Quinoline–Chalcone Derivatives as Potent Antitumor Agents with Microtubule Polymerization Inhibitory Activity. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 62(2), 993-1013. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01755>
- Li, Z. (2011). In Vitro Micro-Tissue and -Organ Models for Toxicity Testing. En *Elsevier eBooks* (pp. 551-563). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00503-1>

- López, J., & Aristizábal, F. A. (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 35(1), 32. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182006000100001&lng=en&tlng=es
- Lountos, G., Jiang, R., Wellborn, W., Thaler, T., Bommarius, A., & Orville, A. (2006). The crystal structure of water-forming NAD(P)H oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.2210/pdb2cdu/pdb>
- MacWilliams, M., & Liao, M.-K. (2006, octubre). Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. American Society For Microbiology. <https://asm.org/getattachment/5d82aa34-b514-4d85-8af3-aeabe6402874/LB-Luria-Agar-protocol-3031.html>
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal Of Chemical Theory And Computation*, 11(8), 3696-3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Markowska, A., Antoszczak, M., Markowska, J., & Huczyński, A. (2022). Role of Vitamin C in Selected Malignant Neoplasms in Women. *Nutrients*, 14(4), 882. <https://doi.org/10.3390/nu14040882>
- McCauley, J. I., Zivanovic, A., & Skropeta, D. (2013). Bioassays for Anticancer Activities. En *Methods in molecular biology* (pp. 191-205). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_14
- Mirzaei, S., Hadizadeh, F., Eisvand, F., Mosaffa, F., & Ghodsi, R. (2020). Synthesis, structure-activity relationship and molecular docking studies of novel quinoline-chalcone hybrids as potential anticancer agents and tubulin inhibitors. *Journal Of Molecular Structure*, 1202, 127310. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127310>
- Mohamed, M. F. A., & Abuo-Rahma, G. E. A. (2020). Molecular targets and anticancer activity of quinoline-chalcone hybrids: literature review. *RSC Advances*, 10(52), 31139-31155. <https://doi.org/10.1039/d0ra05594h>
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. En *Biotechnology annual review* (pp. 227-256). [https://doi.org/10.1016/s1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/s1387-2656(05)11007-2)

- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. S. (2008). Molecular docking. En *Methods in molecular biology* (pp. 365-382). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Mosmann, T. R. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal Of Medicine*, 348(6), 518-527. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021641>
- Nadile, M., Retsidou, M. I., Gioti, K., Beloukas, A., & Tsiani, E. (2022). Resveratrol against Cervical Cancer: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients*, 14(24), 5273. <https://doi.org/10.3390/nu14245273>
- National Comprehensive Cancer Network. (2022). NCCN Guidelines for Patients: Cervical Cancer. <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/cervical-patient-guideline.pdf>
- Ojha, P. S., Maste, M. M., Tubachi, S., & Patil, V. S. (2022). Human papillomavirus and cervical cancer: an insight highlighting pathogenesis and targeting strategies. *VirusDisease*, 33(2), 132-154. <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00768-w>
- Pariente, R., Bejarano, I., Espino, J., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2017). Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, 80(5), 985-998. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3441-3>
- Peralta, G., Sánchez, M. B., Echevarría, S., Valdizán, E. M., & Armijo, J. A. (2008). Glucoproteína P e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(3), 150-159. <https://doi.org/10.1157/13116752>

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal Of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Poh, A. R., O'Donoghue, R. J., & Ernst, M. (2015). Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. *Oncotarget*, 6(18), 15752-15771. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4199>
- Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., & Boyer-Guittaut, M. (2015). Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology*, 4, 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.003>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. En *Methods in molecular biology* (pp. 1-17). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Prasath, R., Bhavana, P., Ng, S. W., & Tiekink, E. R. T. (2013). The facile and efficient ultrasound-assisted synthesis of new quinoline-appended ferrocenyl chalcones and their properties. *Journal Of Organometallic Chemistry*, 726, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2012.12.022>
- Prasath, R., Bhavana, P., Sarveswari, S., Ng, S. W., & Tiekink, E. R. T. (2015). Efficient ultrasound-assisted synthesis, spectroscopic, crystallographic and biological investigations of pyrazole-appended quinolinyl chalcones. *Journal Of Molecular Structure*, 1081, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.10.026>
- Preci, D. P., Almeida, A., Weiler, A. L., Franciosi, M. L. M., & Cardoso, A. M. (2020). Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. *International Journal Of Gynecological Cancer*, 31(2), 265-271. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001587>
- Rao, N., Shaik, A. B., Routhu, S. R., Hussaini, S. A., Sunkari, S., Rao, A., Reddy, A., Alarifi, A., & Kamal, Ä. (2017). New Quinoline Linked Chalcone and Pyrazoline Conjugates: Molecular Properties

Prediction, Antimicrobial and Antitubercular Activities. *ChemistrySelect*, 2(10), 2989-2996.

<https://doi.org/10.1002/slct.201602022>

Rhee, S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules And Cells/Molecules And Cells*, 39(1), 1-5.

<https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>

Rizvi, S. U. F., Siddiqui, H. L., Nisar, M., Khan, N., & Khan, I. (2012). Discovery and molecular docking of quinolyl-thienyl chalcones as anti-angiogenic agents targeting VEGFR-2 tyrosine kinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(2), 942-944.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.017>

Roberts, B. M., Fullerton, D. R., & Elliott, S. (2015). High concentrations of L-ascorbic acid (Vitamin C)

induces apoptosis in a human cervical cancer cell line (HeLa) through the intrinsic and extrinsic pathways. *Bios*, 86(3), 134-143.

<https://doi.org/10.1893/bios-d-14-00019.1>

Roskoski, R. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical And Biophysical*

Research Communications, 324(4), 1155-1164.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.171>

Sangweni, N. F., Dlodla, P. V., Chellan, N., Mabasa, L., Sharma, J. R., & Johnson, R. (2021). The

Implication of Low Dose Dimethyl Sulfoxide on Mitochondrial Function and Oxidative Damage in Cultured Cardiac and Cancer Cells. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 26(23), 7305.

<https://doi.org/10.3390/molecules26237305>

Sashidhara, K. V., Avula, S. R., Mishra, V., Palnati, G. R., Singh, L., Singh, N., Chhonker, Y. S., Swami, P.,

Bhatta, R. S., & Palit, G. (2015). Identification of quinoline-chalcone hybrids as potential antiulcer agents. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 89, 638-653.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.068>

Sashidhara, K. V., Kumar, M., Modukuri, R. K., Srivastava, R., Soni, A., Srivastava, K., Singh, S., Saxena, J.

K., Gauniyal, H. M., & Puri, S. K. (2012). Antiplasmodial activity of novel keto-enamine chalcone-chloroquine based hybrid pharmacophores. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(9), 2971-2981.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.011>

- Sayed, S. M. E., Mahmoud, A. A., Sawy, S. A. E., Abdelaal, E. A., Fouad, A. M., Yousif, R. S., Hashim, M. S., Hemdan, S. B., Kadry, Z. M., Abdelmoaty, M. A., Gabr, A. G., Omran, F. M., Nabo, M. M. H., & Ahmed, N. S. (2013). Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (Anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect). *Medical Hypotheses*, 81(5), 866-870. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.08.024>
- Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., & Kuriyan, J. (1999). Crystal Structure of Hck in Complex with a Src Family–Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *Molecular Cell*, 3(5), 639-648. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80357-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80357-3)
- Scientific Image and Illustration Software | BioRender*. (s. f.). <https://www.biorender.com/>
- Segeritz, C., & Vallier, L. (2017). Cell culture. En *Elsevier eBooks* (pp. 151-172). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803077-6.00009-6>
- Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., Mirzaei, H., Teymoordash, S. N., & Asemi, Z. (2019). Melatonin: A new inhibitor agent for cervical cancer treatment. *Journal Of Cellular Physiology*, 234(12), 21670-21682. <https://doi.org/10.1002/jcp.28865>
- Shang, H., Chang, C. H., Chou, Y. R., Yeh, M., Au, M. K., Lu, H. F., Chu, Y. L., Chou, H. M., Chou, H. C., Shih, Y., & Chung, J. G. (2016). Curcumin causes DNA damage and affects associated protein expression in HeLa human cervical cancer cells. *Oncology Reports*, 36(4), 2207-2215. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5002>
- Sicheri, F., Moarefi, I., & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature*, 385(6617), 602-609. <https://doi.org/10.1038/385602a0>
- Silva, G. Á. F., Nunes, R. A. B., Morale, M. G., Boccardo, E., Aguayo, F., & Termini, L. (2018). Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics*, 73, e548s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e548s>

- Sindhwani, A., Muthusammy, S., & Bhatia, A. (2018). Vitamin C may exert variable effects on viability and proliferation of HeLa cells exhibiting high and low chromosomal instability. *Advances In Clinical And Experimental Medicine*, 28(1), 19-24. <https://doi.org/10.17219/acem/76870>
- Skonieczna, M., Hejmo, T., Poterala-Hejmo, A., Cieslar-Pobuda, A., & Buldak, R. J. (2017). NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2017, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2017/9420539>
- Singh, K., Bhorl, M., Kasu, Y. A., Bhat, G., & Marar, T. (2018). Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(2), 177-190. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.013>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. En *Progress in Medicinal Chemistry* (pp. 273-343). <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tintori, C., Laurenzana, I., La Rocca, F., Falchi, F., Carraro, F., Ruiz, A., Esté, J. A., Kissova, M., Crespan, E., Maga, G., Biava, M., Brullo, C., Schenone, S., & Botta, M. (2013). Identification of Hck Inhibitors As Hits for the Development of Antileukemia and Anti-HIV Agents. *ChemMedChem*, 8(8), 1353-1360. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300204>
- Tredwell, M., & Gouverneur, V. (2012). 1.5 Fluorine in Medicinal Chemistry: Importance of Chirality. En *Elsevier eBooks* (pp. 70-85). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-095167-6.00106-3>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal Of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

- Tseng, C., Tzeng, C., Hsu, C., Cheng, C. C., Yang, C., & Chen, Y. (2015). Discovery of 3-phenylquinolinylchalcone derivatives as potent and selective anticancer agents against breast cancers. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 97, 306-319.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.054>
- Vaiyapuri, M., Sailaja, J. K., & Nalini, N. (2002). Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clinical Biochemistry*, 35(8), 621-625.
[https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00376-4](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00376-4)
- Valdés-Tresanco, M. S., Valdés-Tresanco, M. E., Valiente, P. A., & Moreno, E. (2020). AMDock: a versatile graphical tool for assisting molecular docking with Autodock Vina and Autodock4. *Biology Direct*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13062-020-00267-2>
- Vector Core. (2000, julio). *Sterility Test*. ATCC. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi2rJDM8vKGAXVwgIQIHcb3A8YQFnoECCgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.atcc.org%2F-%2Fmedia%2Fproduct-assets%2Fdocuments%2Fprotocols%2Fvirology%2Faav-sterility-test.pdf%3Frev%3Dd719a6665dc84b4a9779d0c7c094a5d8&usg=AOvVaw0rXM4bJJJaISz4_BM2ARYyj&opi=89978449
- Vero - CCL-81 / ATCC. (s. f.). <https://www.atcc.org/products/ccl-81>
- Via, L. D., Gia, O., Chiarelto, G., & Ferlin, M. G. (2009). DNA-targeting pyrroloquinoline-linked butenone and chalcones: Synthesis and biological evaluation. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 44(7), 2854-2861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.12.011>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
<https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S., & Rhee, S. G. (2005). Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. *Journal Of Biological Chemistry* / The Journal Of Biological Chemistry, 280(5), 3125-3128.
<https://doi.org/10.1074/jbc.c400496200>

- Woo, J. H., Lim, J. H., Kim, Y. H., Suh, S. I., Min, D. S., Chang, J., Lee, Y. H., Park, J. W., & Kwon, T. K. (2003). Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC δ signal transduction. *Oncogene*, 23(10), 1845-1853.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207307>
- World Health Organization: WHO. (2024, 5 marzo). *Cáncer de cuello uterino*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
- Wright, B., Watson, K. A., McGuffin, L. J., Lovegrove, J. A., & Gibbins, J. M. (2015). GRID and docking analyses reveal a molecular basis for flavonoid inhibition of Src family kinase activity. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1156-1165.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.004>
- Wu, T., Liu, S., Chen, S., Chen, G., Wu, C., & Huang, S. (2020). Mechanisms and Applications of the Anti-cancer Effect of Pharmacological Ascorbic Acid in Cervical Cancer Cells. *Frontiers In Oncology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01483>
- Yepes, A., Quintero-Saumeth, J., & Cardona-G, W. (2020). Chalcone-Quinoline Conjugates as Potential T. cruzi Cruzipain Inhibitors: Docking Studies, Molecular Dynamics and Evaluation of Drug-Likeness. *ChemistrySelect*, 5(23), 7104-7112. <https://doi.org/10.1002/slct.202000777>
- Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., Wang, L., & Xiao, M. (2014). Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PloS One*, 9(9), e107447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447>
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., & Xing, C. (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*, 117(1 2), 7762-7810.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>

Zinovkin, R. A., Lyamzaev, K. G., & Chernyak, B. V. (2023). Current perspectives of mitochondria-targeted antioxidants in cancer prevention and treatment. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 11.

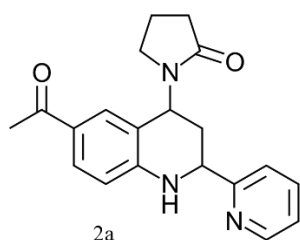
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1048177>

Zoberi, I., Bradbury, C. M., Curry, H. A., Bisht, K. S., Goswami, P. C., Roti, J. L. R., & Gius, D. (2002). Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines.

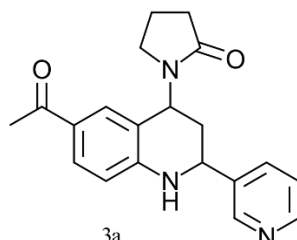
Cancer Letters, 175(2), 165-173. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00719-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00719-4)

Apéndices

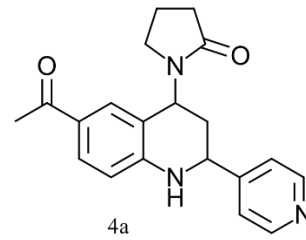
Apéndice A. Nombres IUPAC de cada compuesto ensayado



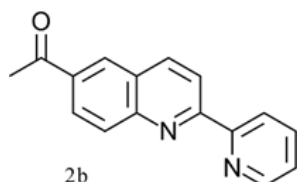
1-[6-acetil-2-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinol-4-il]pirrolidin-2-ona



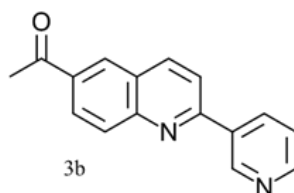
1-[6-acetil-2-(piridin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinol-4-il]pirrolidin-2-ona



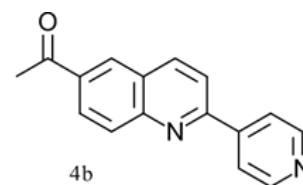
1-[6-acetil-2-(piridin-4-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinol-4-il]pirrolidin-2-ona



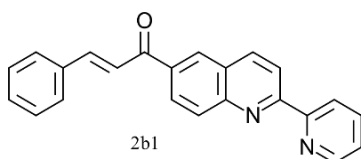
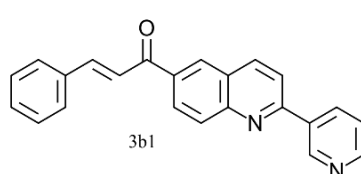
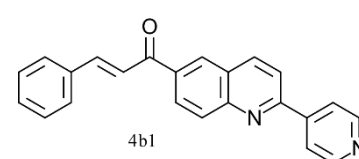
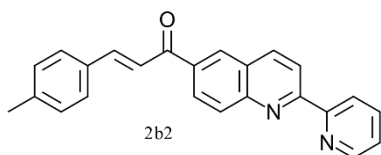
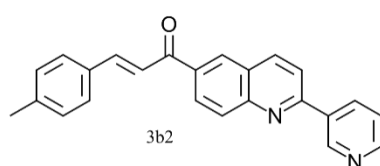
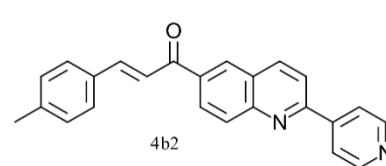
1-[2-(piridin-2-il)quinol-6-il]etan-1-ona

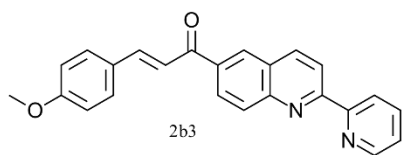


1-[2-(piridin-3-il)quinol-6-il]etan-1-ona

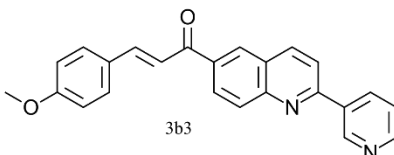


1-[2-(piridin-4-il)quinol-6-il]etan-1-ona

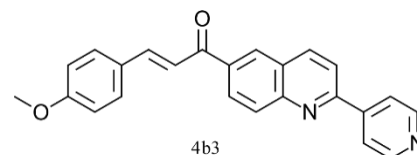
*(E)*-3-fenil-1-[2-(piridin-2-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona*(E)*-3-fenil-1-[2-(piridin-3-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona*(E)*-3-fenil-1-[2-(piridin-4-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona*(E)*-3-(4-metilfenil)-1-[2-(piridin-2-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona*(E)*-3-(4-metilfenil)-1-[2-(piridin-3-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona*(E)*-3-(4-metilfenil)-1-[2-(piridin-4-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona



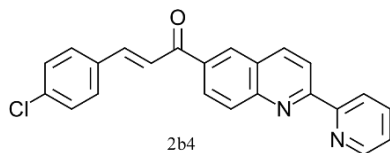
(*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-[2-(piridin-2-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona



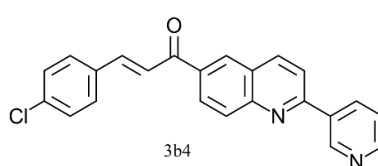
(*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-[2-(piridin-3-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona



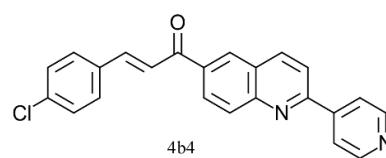
(*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-[2-(piridin-4-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona



(*E*)-3-(4-clorofenil)-1-[2-(piridin-2-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona

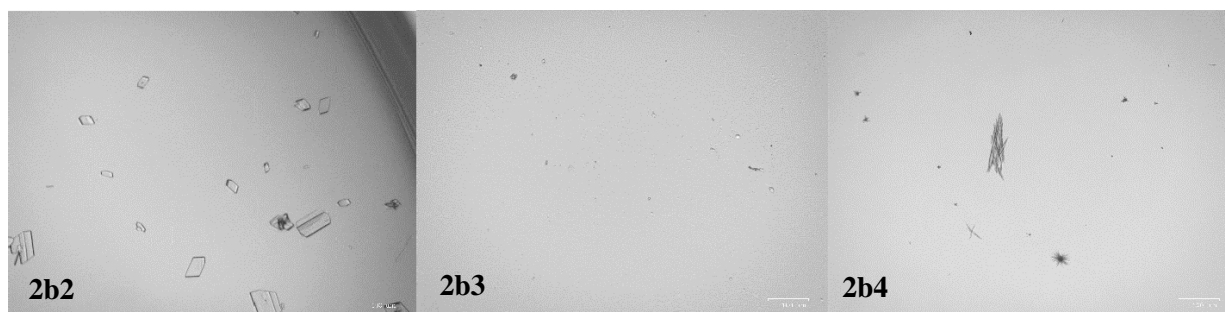
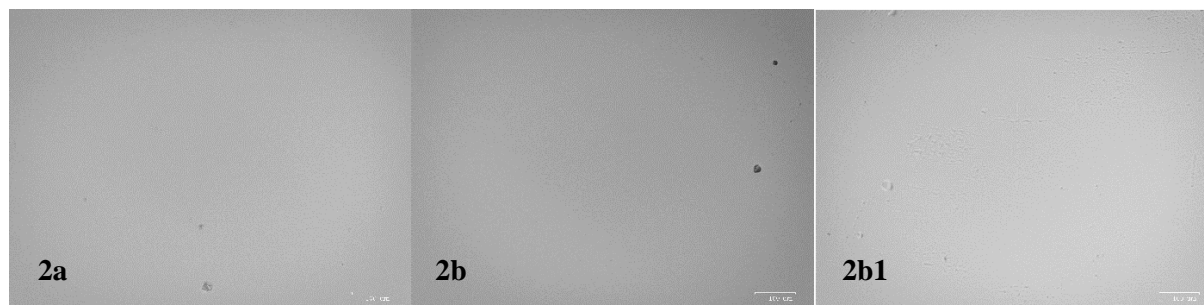


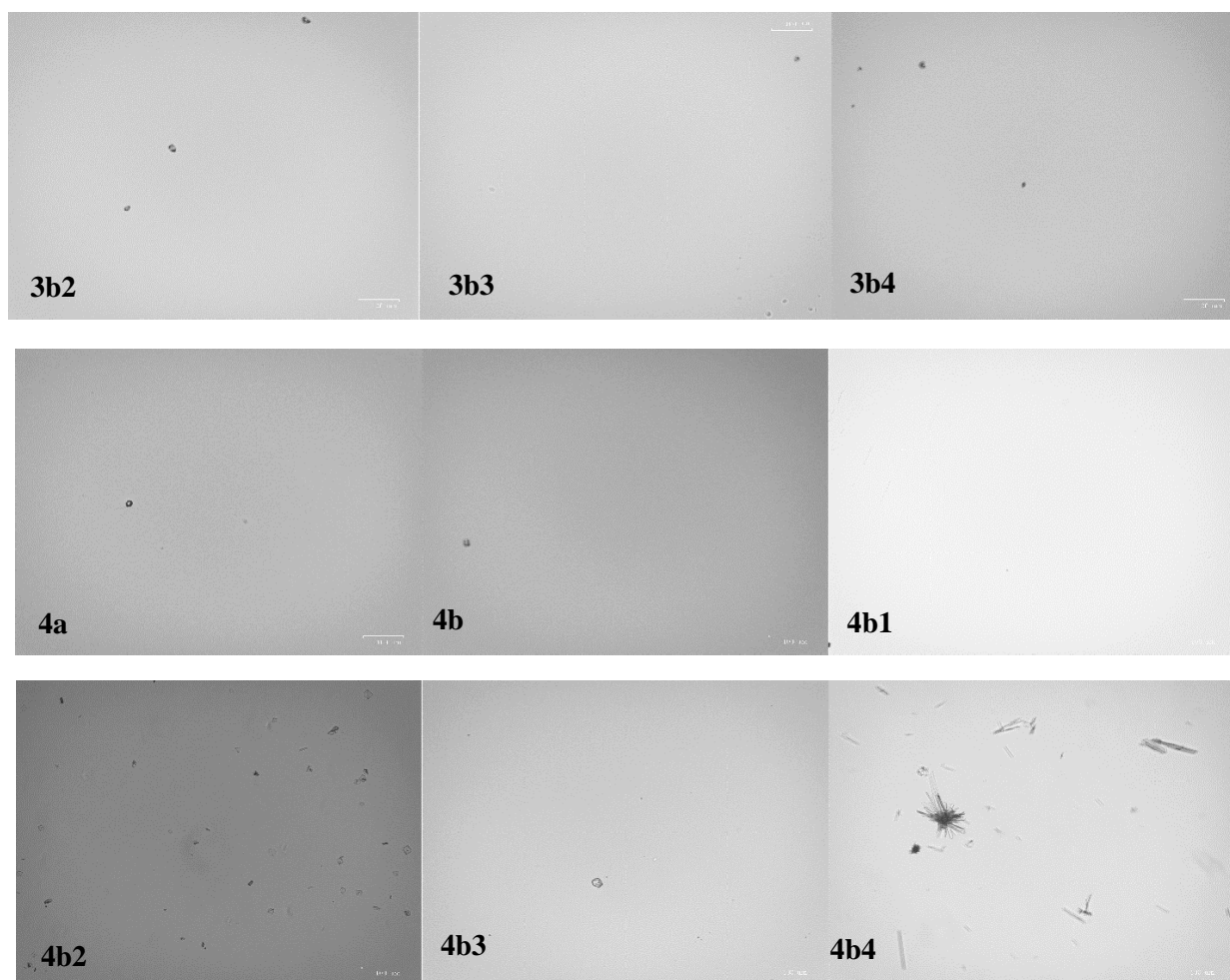
(*E*)-3-(4-clorofenil)-1-[2-(piridin-3-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona



(*E*)-3-(4-clorofenil)-1-[2-(piridin-4-il)quinol-6-il]prop-2-en-1-ona

Apéndice B. Ensayos de solubilidad a 10.000 μ M en DMSO





Apéndice C. Plantillas empleadas en los ensayos in vitro

Figura A

Plantilla aplicada en el screening a 10 uM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control negativo			Control solvente			Blanco					
B	10 uM - 4a			10 uM - 3a			10 uM - 2a					
C	10 uM - 4b			10 uM - 3b			10 uM - 2b					
D	10 uM - 4b1			10 uM - 3b1			10 uM - 2b1					
E	10 uM - 4b2			10 uM - 3b2			10 uM - 2b2					

F	10 uM - 4b3	10 uM - 3b3	10 uM - 2b3	
G	10 uM - 4b4	10 uM - 3b4		
H				

Nota: La plantilla se empleó para las tres líneas celulares. Control negativo = Pozos sin compuesto, Control solvente = Pozos con solución del solvente sin compuesto, Blanco = Pozos únicamente con DMSO.

Figura B

Plantilla aplicada en la determinación del IC₅₀ de cada compuesto

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control negativo			Control negativo			Control solvente			Blanco		
B	5 uM - 4a			10 uM - 4a			20 uM - 4a			50 uM - 4a		
C	5 uM - 4b			10 uM - 4b			20 uM - 4b			50 uM - 4b		
D	5 uM - 4b1			10 uM - 4b1			20 uM - 4b1			50 uM - 4b1		
E	5 uM - 3a			10 uM - 3a			20 uM - 3a			50 uM - 3a		
F	5 uM - 3b			10 uM - 3b			20 uM - 3b			50 uM - 3b		
G	5 uM - 3b1			10 uM - 3b1			20 uM - 3b1			50 uM - 3b1		
H	5 uM - 3b3			10 uM - 3b3			20 uM - 3b3			50 uM - 3b3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control negativo			Control negativo			Control solvente			Blanco		
B	5 uM - 2b1			10 uM - 2b1			20 uM - 2b1			50 uM - 2b1		
C	75 uM - 2b1			75 uM - 4a			75 uM - 4b			75 uM - 4b1		
D	75 uM - 3a			75 uM - 3b			75 uM - 3b1			75 uM - 3b3		

Nota: Control negativo = Pozos sin compuesto, pero con células, Control solvente = Pozos con solución del solvente sin compuesto y con células, Blanco = Pozos únicamente con DMSO.

Figura C

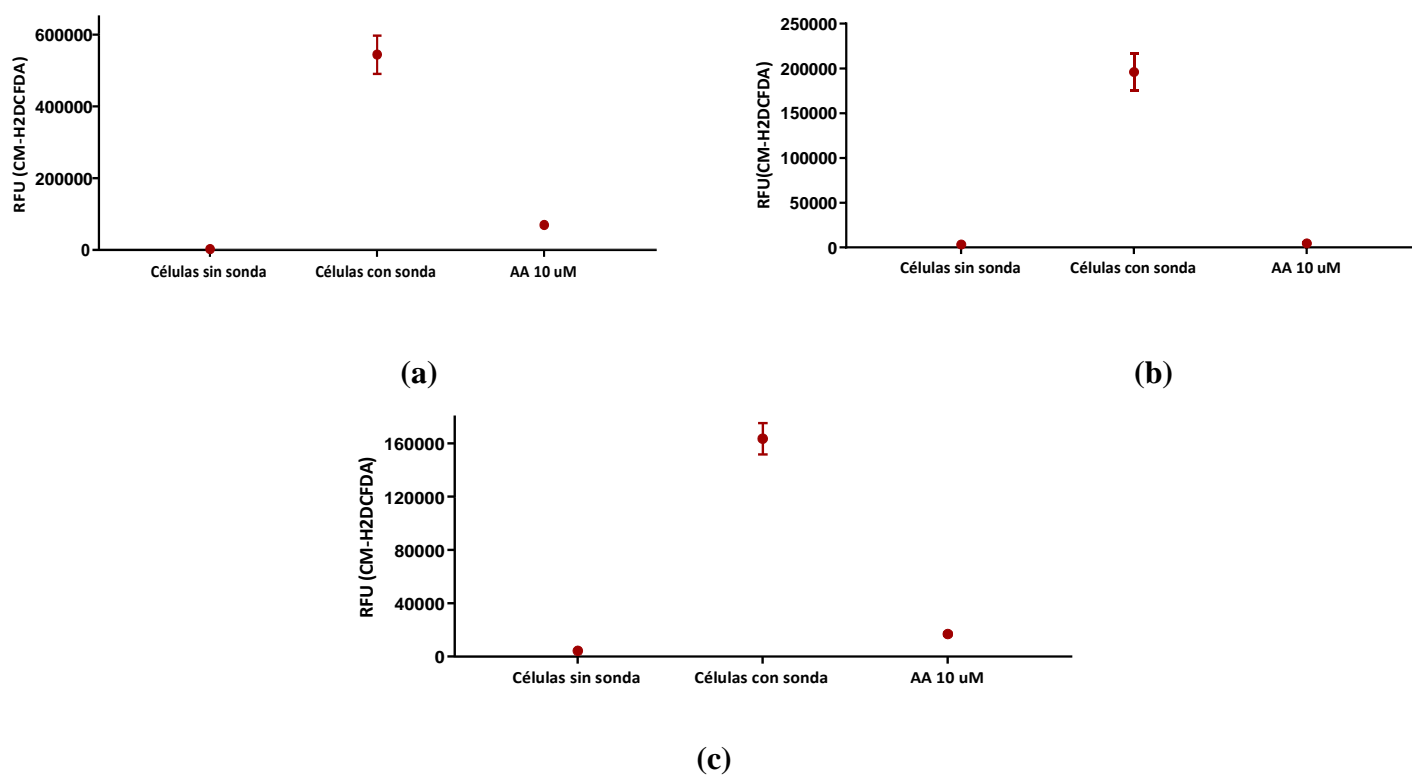
Plantilla aplicada en el ensayo de detección de ROS totales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Células sin sonda	Células sin sonda	Células sin sonda	Células + RT 5 uM	Células + RT 5 uM	Células + RT 5 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b3 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b3 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b3 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b3 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b3 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b3 50 uM
B	Células + RT 5 uM + Cpto 4a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b 50 uM
C	Células + RT 5 uM + Cpto 4b1 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b1 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b1 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b1 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b1 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b1 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3a 50 uM
D	Células + RT 5 uM + Cpto 3b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b1 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b1 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b1 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b1 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b1 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b1 50 uM
E	Células + RT 5 uM + Cpto 3b3	Células + RT 5 uM + Cpto 3b3	Células + RT 5 uM + Cpto 3b3	Células + RT 5 uM + Cpto 2b1	Células + RT 5 uM + Cpto 2b1	Células + RT 5 uM + Cpto 2b1	Células + RT 5 uM + Cpto 3b3	Células + RT 5 uM + Cpto 3b3	Células + RT 5 uM + Cpto 3b3	Células + RT 5 uM + Cpto 2b1	Células + RT 5 uM + Cpto 2b1	Células + RT 5 uM + Cpto 2b1
F	Células + RT 5 uM + DMSO *	Células + RT 5 uM + DMSO *	Células + RT 5 uM + DMSO *	Células + RT 5 uM + AA 10 uM	Células + RT 5 uM + AA 10 uM	Células + RT 5 uM + AA 10 uM	Células + RT 5 uM + DMSO **	Células + RT 5 uM + DMSO **	Células + RT 5 uM + DMSO **			
G	Células + RT 5 uM + Cpto 4b3 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b3 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b3 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b4 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b4 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b4 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b3 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b3 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 4b3 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b4 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b4 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 3b4 50 uM

H	Células + RT 5 uM + Cpto 2a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2a 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b 10 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2a 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b 50 uM	Células + RT 5 uM + Cpto 2b 50 uM
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Nota: La plantilla se aplicó de igual manera para las tres líneas celulares. En la primera mitad (columnas 1-6) se inocularon los compuestos a una concentración de 10 uM, y en la segunda mitad (columnas 7-12) la concentración fue de 50 uM. RT = Sonda, AA= Ácido ascórbico.

Apéndice D. Gráficas de ROS basales para cada línea celular



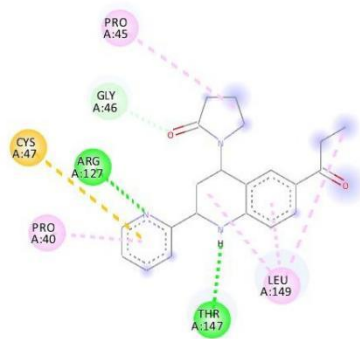
Nota. Se presentan resultados de (a) células HeLa, (b) células Vero y (c) células HaCaT

AA = Ácido ascórbico






Apéndice E. Interacciones entre los compuestos y las enzimas PRDX5, NOX2, AChE y HCK

Figura A

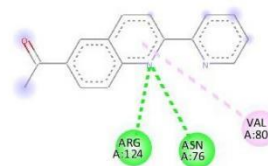
Interacciones de los compuestos con PRDX 5



Interactions

- | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|
|  | Conventional Hydrogen Bond |  | Alkyl |
|  | Carbon Hydrogen Bond |  | Pi-Alkyl |
|  | Pi-Sulfur | | |

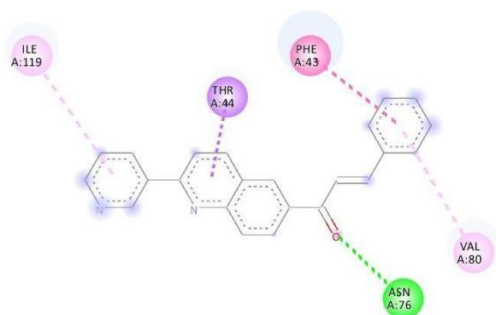
(a)







Interactions

- | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|
|  | Conventional Hydrogen Bond |  | Pi-Alkyl |
|---|----------------------------|---|----------|

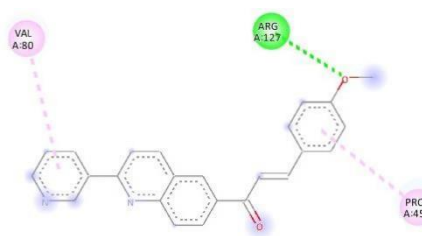
(b)



Interactions

- | | | | |
|---|----------------------------|---|---------------|
|  | Conventional Hydrogen Bond |  | Pi-Pi Stacked |
|  | Pi-Sigma |  | Pi-Alkyl |

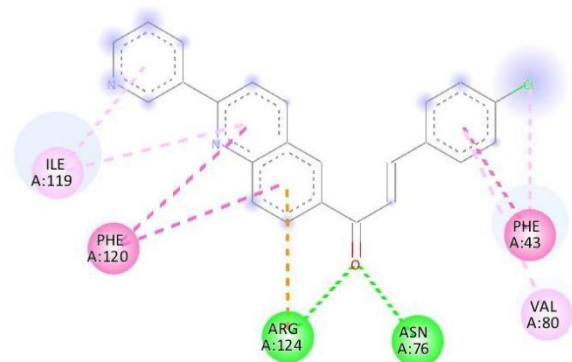
(c)



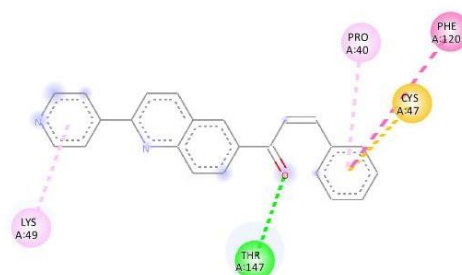
Interactions

- | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|
|  | Conventional Hydrogen Bond |  | Pi-Alkyl |
|---|----------------------------|---|----------|

(d)



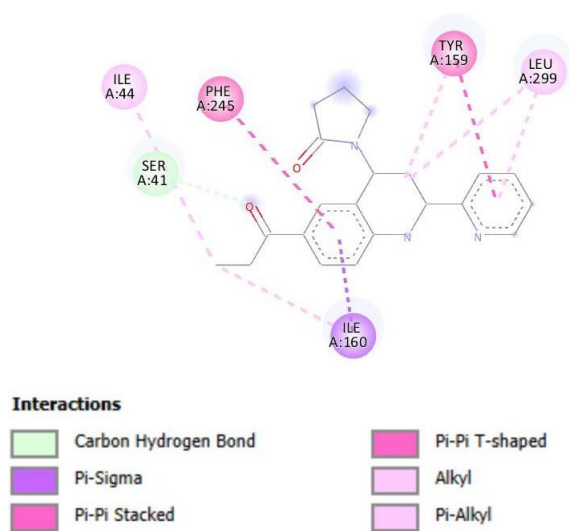
(e)



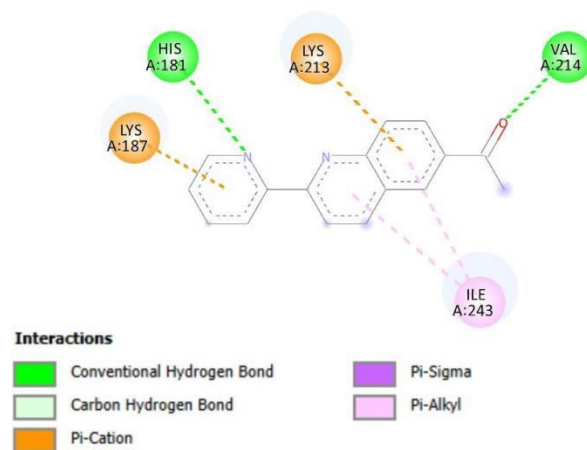
(f)

Nota. Se presentan resultados de (a) 2a, (b) 2b, (c) 3b1, (d) 3b3, (e) 3b4 y (f) 4b1

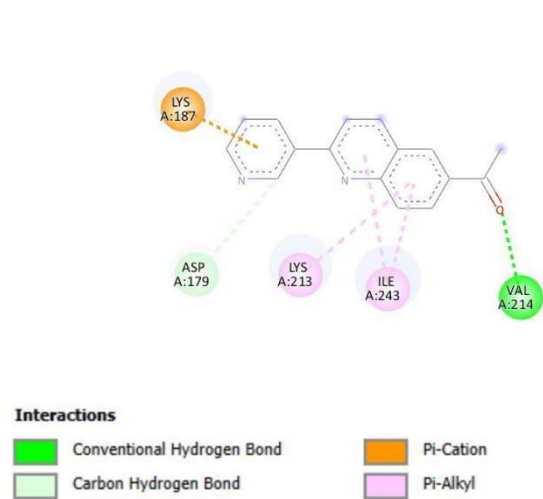
Figura B
Interacciones de los compuestos con NOX2



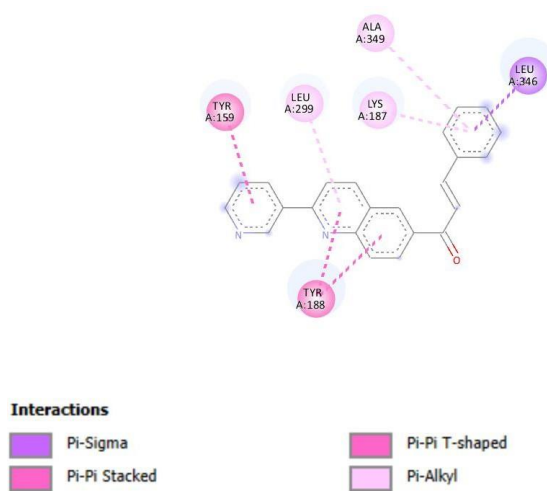
(a)



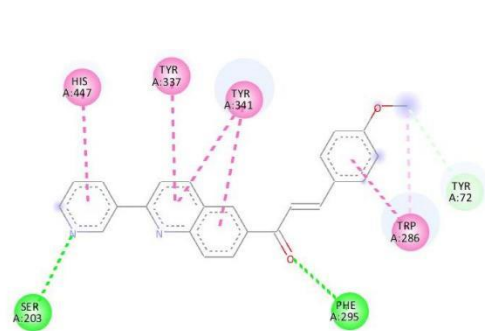
(b)



(c)

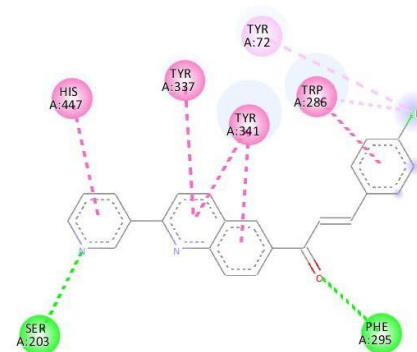


(d)

**Interactions**

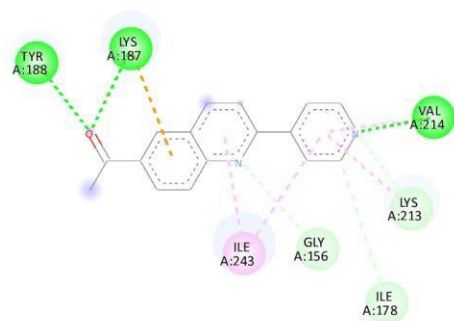
Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped
Carbon Hydrogen Bond	Pi-Alkyl
Pi-Pi Stacked	

(e)

**Interactions**

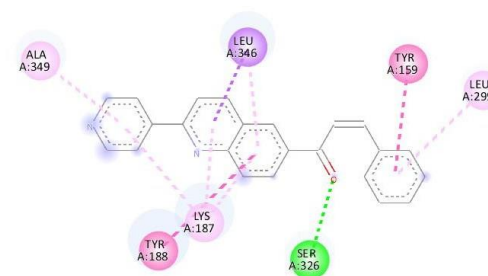
Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped
Pi-Pi Stacked	Pi-Alkyl

(f)

**Interactions**

Conventional Hydrogen Bond	Pi-Cation
Carbon Hydrogen Bond	Pi-Alkyl

(g)

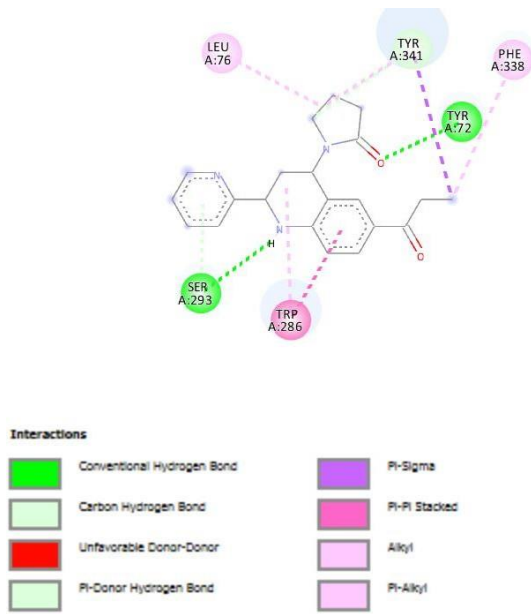
**Interactions**

Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped
Pi-Sigma	Pi-Alkyl

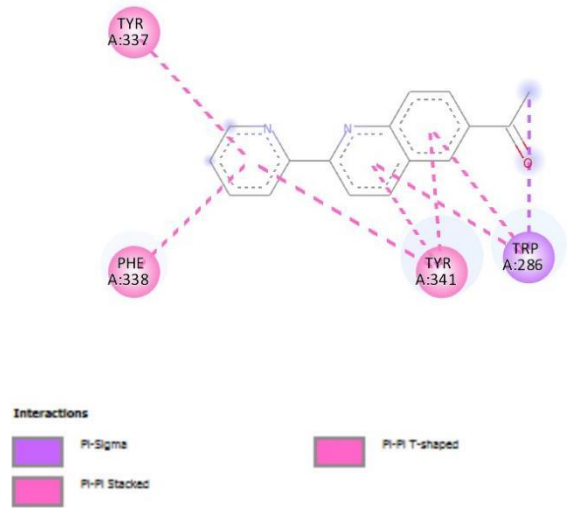
(h)

Nota. Se presentan resultados de (a) 2a, (b) 2b, (c) 3b, (d) 3b1, (e) 3b3, (f) 3b4, (g) 4b y (h) 4b1

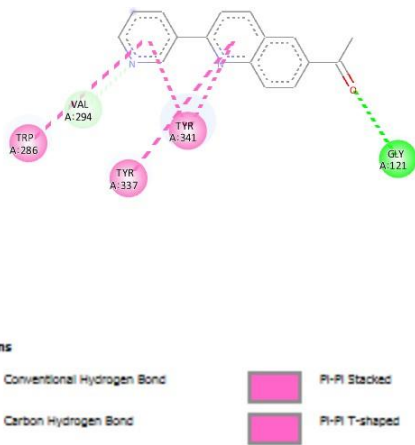
Figura C
Interacciones de los compuestos con AChE



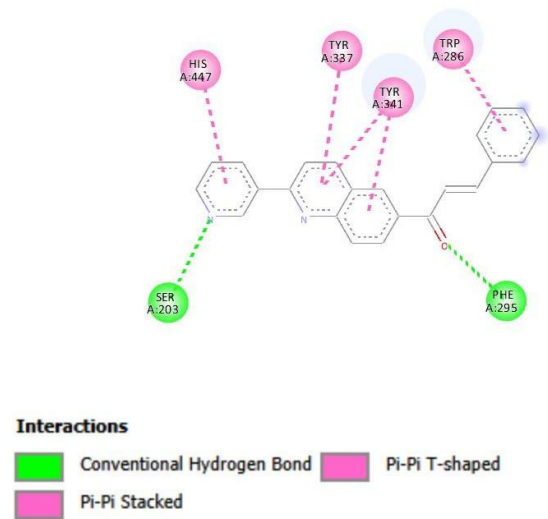
(a)



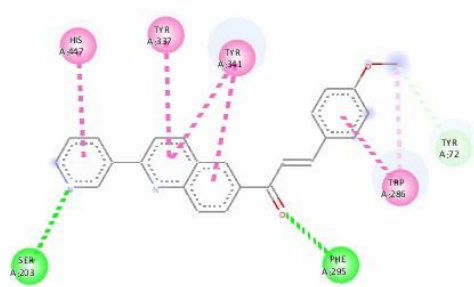
(b)



(c)



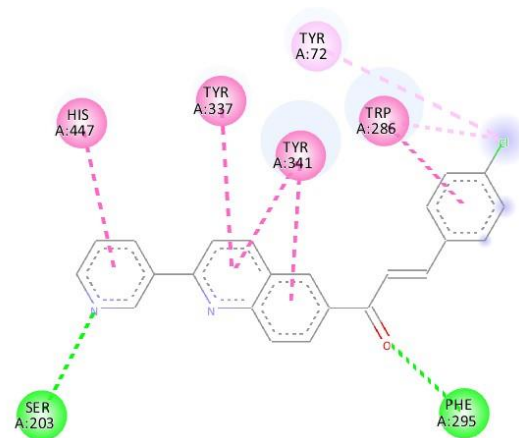
(d)



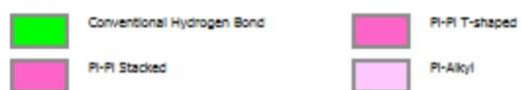
Interactions



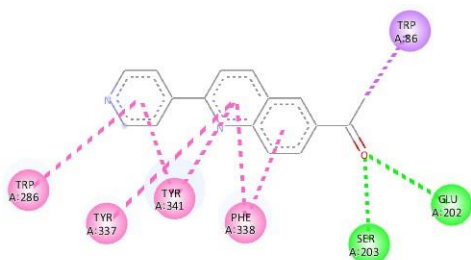
(e)



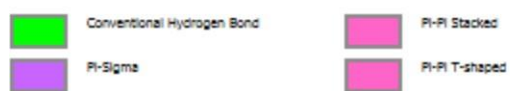
Interactions



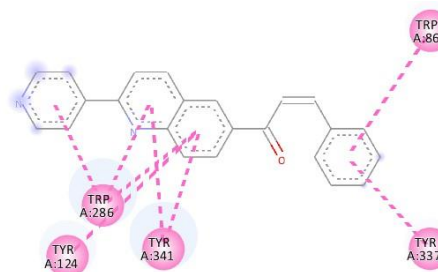
(f)



Interactions



(g)



Interactions

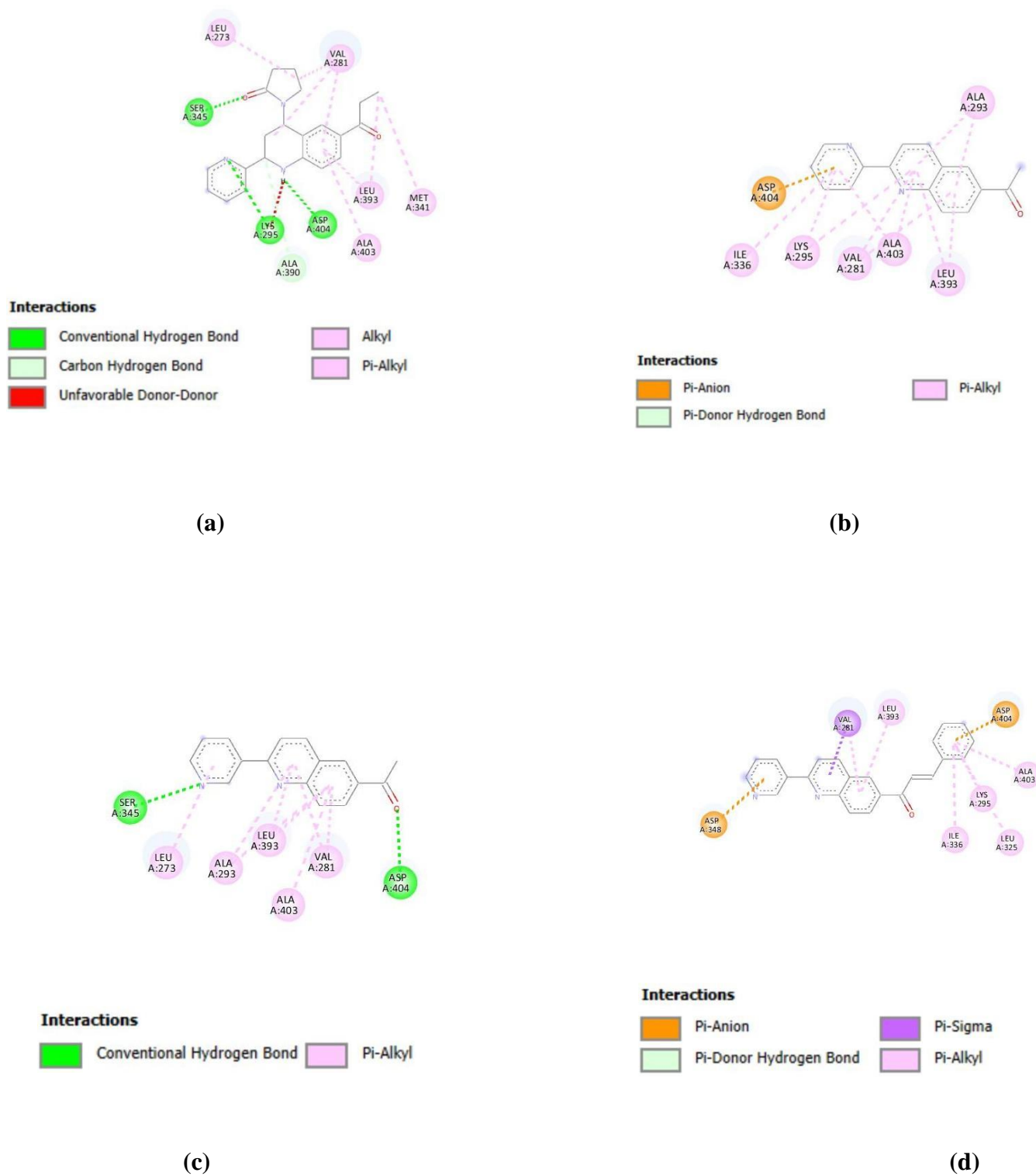


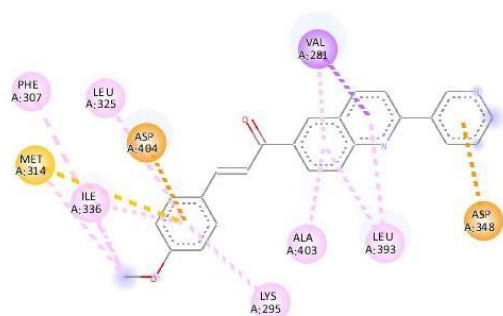
(h)

Nota. Se presentan resultados de (a) 2a, (b) 2b, (c) 3b, (d) 3b1, (e) 3b3, (f) 3b4, (g) 4b y (h) 4b1

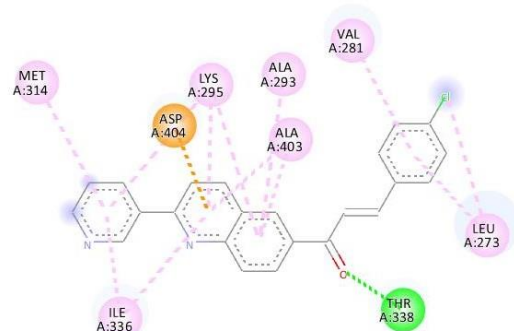
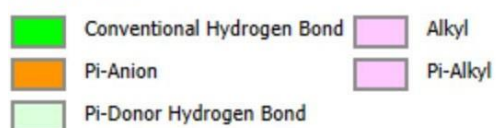
Figura D

Interacciones de los compuestos con HCK

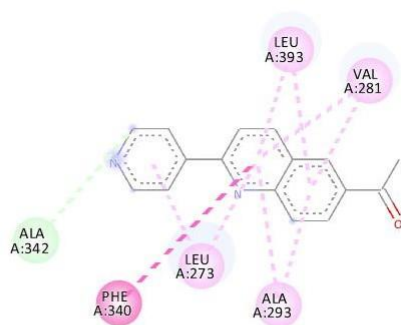
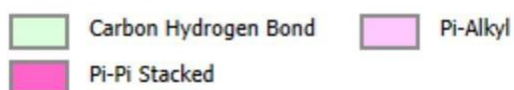


**Interactions**

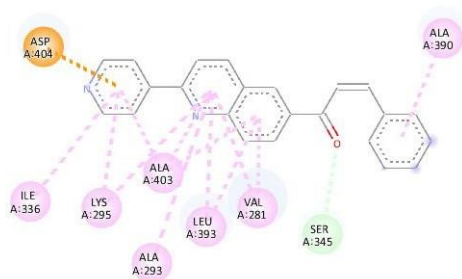
(e)

**Interactions**

(f)

**Interactions**

(g)

**Interactions**

(h)

Nota. Se presentan resultados de (a) 2a, (b) 2b, (c) 3b, (d) 3b1, (e) 3b3, (f) 3b4, (g) 4b y (h) 4b1