

Identificación de metabolitos presentes en plantas medicinales como adyuvantes en el tratamiento contra el adenocarcinoma de cérvix y estudio del mecanismo de acción sobre la bioenergética mitocondrial.

Andrea Otero Mojica

Trabajo de Grado para Optar para el título de química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología

Doctora en ciencias-Bioquímicas

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología

Doctor en química

Universidad Industrial de Santander

Escuela de química

Facultad de ciencias

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

Le dedico este trabajo de grado a los dos pilares de mi vida.

Mi mamá, mi ejemplo a seguir, mi todo y la razón que me impulsa a nunca rendirme. Su sabiduría y fortaleza para enfrentar las adversidades de la vida me han enseñado a ver el mundo de otra forma, aprendiendo de los errores y esforzándome cada día para ser mejor.

Y mi tía Oliva, mi segunda mamá, quien me ha dado su amor y apoyo incondicional. La que siempre me pone los pies en la tierra y me aconseja. Un vivo ejemplo de que con sudor y esfuerzo todo es posible.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi mamá, mi tía Oliva y mi tío Jairo por el gran apoyo que me han brindado toda la vida y por ser parte clave de mi formación profesional. A mi primo Jairo, por ser tan incondicional y preocuparse por mi bienestar siempre. A Ximena, por su apoyo y compañía, y a mi primo Juan Felipe por muchas veces alegrarme el día con sus ocurrencias.

Agradezco también a mi prima Margarita, por la ayuda y el apoyo que siempre me ha dado, gracias por pensar en mí y darme el mejor regalo, la educación. A mi tía Dolly y mis primos, Ana y Josué, por estar siempre para mí y por todo el amor que me dan.

A mis amigos y compañeros de carrera, en especial a Yinna, Danna y Yilber, que durante todo este proceso se han convertido en personas demasiado importantes en mi vida, gracias por ser mis confidentes, por todos los momentos de risa, de frustración, de estrés y de alegría que compartimos.

También agradezco a mi amigo Felipe, por las salidas que me ayudaban a despejarme de todo el estrés de la semana y por las risas que nunca faltaron. Y a una persona especial que siempre me apoyó y creyó en mí, incluso cuando yo no lo hacía y fue mi polo a tierra por mucho tiempo.

Agradezco a la profe Stelia, por ayudarme en mi crecimiento profesional y permitirme llevar a cabo mi proyecto de grado con ella. A Luis Carlos, mi codirector, por su dedicación, su paciencia, sus consejos, correcciones y por su apoyo.

A Tatiana y Mayra, mis amigas y compañeras de cultivo, gracias por su vital compañía en este proceso y por todos los momentos de risa.

A todas las personas que estuvieron presentes en el transcurso de mi carrera y en mi vida, mil gracias.

Finalmente, agradezco a la vicerrectoría de investigación y extensión (VIE-UIS), por la financiación del proyecto de investigación "Búsqueda de compuestos de origen natural con efecto sinérgico para el tratamiento de cáncer de mama, cérvix e hígado, usando la mitocondria como diana farmacológica", con código 3705.

Contenidos

Resumen	10
Abstract.....	12
1. Introducción	14
2. Marco teórico	16
2.1 La epigenética del cáncer	16
2.2 Contribución de las mitocondrias y la fosforilación oxidativa en la dinámica del cáncer.....	17
2.3 Cáncer de cérvix, tratamiento actual y factores de riesgo.	19
2.4 Metabolitos secundarios como alternativa para el tratamiento del adenocarcinoma de cuello uterino e inhibidores de la bioenergética mitocondrial.....	21
2.5 Diseño de fármacos asistido por computadoras	22
2.5.1 Acoplamiento molecular	23
2.5.2 Algoritmos de muestreo	24
2.5.3 Funciones de puntuación	25
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo general	27
3.2 Objetivos específicos.....	27

CAPITULO 1: DETERMINACIÓN <i>in silico</i> DE METABOLITOS PRESENTES EN PLANTAS NATURALES CON POSIBLE EFECTO INHIBITORIO EN LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....		29
1. Metodología fase <i>in silico</i>		29
2. Resultados y discusión.....		33
3. Conclusión		41
CAPITULO 2: DETERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE METABOLITOS PRESENTES EN PLANTAS NATURALES CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTICANCEROSA.....		42
1. Metodología fase <i>in vitro</i>		42
1.1 Cultivo celular		43
1.2 Evaluación de citotoxicidad		43
1.3 Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármacos de referencia para el tratamiento del adenocarcinoma de cuello uterino		44
1.4 Efecto de la mejor mezcla seleccionada sobre la respiración de las células HeLa		45
1.5 Análisis estadístico		46
2. Consideraciones éticas		47
2.1 Manejo de los residuos o desechos químicos		47
2.2 Manejo de células		48
3. Resultados		49

3.1 Efecto de los metabolitos secundarios de plantas sobre la viabilidad celular en células HeLa	49
3.1 Determinación de sinergismo entre metabolismo y fármacos de referencia	50
3.2 Acción de la mezcla entre el carvacrol y la doxorubicina sobre la respiración mitocondrial en las células HeLa.....	60
Conclusiones.....	63
Recomendaciones	63
Agradecimientos	64
Divulgación de resultados	64
Apéndices	65
Referencias bibliográficas	72

Lista de tablas

Tabla 1. Docking score, energía de afinidad y descriptores adme de los posibles mejores inhibidores del complejo IV.....	34
Tabla 2. CC ₅₀ a las 48h de tratamiento sobre las células HeLa de cada fármaco de referencia y metabolito seleccionado.	50
Tabla 3. Mezclas binarias, terciarias y cuaternarias.....	51
Tabla 4. Concentraciones utilizadas en las mezclas entre los metabolitos carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol.	52
Tabla 5. Valores obtenidos de porcentaje de viabilidad celular, índice de combinación (IC), tipo de interacción e índice de reducción de dosis (DRI) obtenidos para cada mezcla evaluada.	56

Lista de figuras

Figura 1. Esquema metodológico fase in silico para la selección de los metabolitos con mejores interacciones en el sitio de unión del complejo IV de la ETC.....	30
Figura 2. Mejores poses de acoplamiento obtenidas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo IV y el respectivo inhibidor reportado.....	39
Figura 3. Estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.	40
Figura 4. Diagrama metodológico fase in vitro.....	43
Figura 5. Porcentaje de viabilidad sobre las células HeLa vs concentración de los fármacos de referencia en el lado izquierdo y metabolitos secundarios seleccionados como posibles inhibidores de la ETC en el lado derecho, en un tiempo de tratamiento de 48h.	49
Figura 6. Mezclas binarias de los fármacos doxorubicina y oxaliplatino con los metabolitos seleccionados (carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol)	53
Figura 7. Mezclas terciarias y cuaternarias de los fármacos doxorubicina y oxaliplatino con los metabolitos seleccionados (carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol).....	54
Figura 8. Mezclas binarias evaluadas en tres concentraciones diferentes.....	55
Figura 9. Porcentaje de viabilidad sobre las células HeLa en tres concentraciones de las mezclas doxorubicina-gálico, doxorubicina-carva y doxorubicina-timol durante 12, 24, y 48 horas de tratamiento.....	60

Figura 10. Efecto de la mezcla doxorubicina-carvacrol sobre las células HeLa luego de 48 horas de tratamiento 62

Resumen

Título: Identificación de metabolitos presentes en plantas medicinales como adyuvantes en el tratamiento contra el adenocarcinoma de cérvix y estudio del mecanismo de acción sobre la bioenergética mitocondrial.

Autor: Andrea Otero Mojica, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez

Palabras Clave: Cáncer de cérvix, HeLa, citotoxicidad, metabolitos secundarios.

Descripción

El cáncer de cérvix es la cuarta principal causas de muerte por cáncer en mujeres alrededor del mundo (GLOBOCAN, 2020). En países con bajos recursos económicos y deficiencia en los servicios de salud, el número de casos de mortalidad es mayor debido a la baja probabilidad de supervivencia a un año en pacientes en estado avanzado/recurrente. La quimioterapia es el método más empleado para tratar el cáncer de cuello uterino avanzado, sin embargo, debido a los efectos secundarios letales que genera y a la quimioresistencia, son más los riesgos que los beneficios.

A partir de esto, la búsqueda de alternativas para el tratamiento con quimioterapia se ha ido incrementando. El uso de la mitocondria como una diana farmacológica y el uso de compuestos naturales que potencialicen sinérgicamente el efecto citotóxico generado por fármacos, son dos de los diversos enfoques de estudio que se han ido implementando. Con base en lo anterior, el presente proyecto tuvo como objetivo general identificar metabolitos presentes en plantas medicinales que potencialicen el efecto citotóxico de los fármacos empleados en la quimioterapia (la doxorubicina y el oxaliplatino) en células HeLa, teniendo como diana farmacológica la mitocondria.

Para el cumplimiento del objetivo planteado, se llevó a cabo una fase *in silico* que consistió en un cribado virtual de una base de datos de 187 metabolitos a partir de interfaz Maestro de la suit Schrödinger Drug Discovery para modelado molecular. En primer lugar, se calcularon las propiedades ADME de los metabolitos, luego se llevó a cabo el docking score en dos niveles de precisión (precisión estándar y extra-precisión), para así determinar las posibles interacciones presentes con los residuos de la subunidad 4 (Lys122, Leu129, Met119 y Tyr126) y subunidad 1 (Ile452, Val456 y Phe459) del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, reportados como sitio de unión del inhibidor clorpromazina (ID:5z62, resolución 3.60 Å).

A partir del acoplamiento molecular, fueron identificados la quercetina, el carvacrol, el ácido gálico y el timol como posibles inhibidores del complejo IV debido a sus propiedades ADME, energía de afinidad, docking score e interacciones presentes con los residuos aminoacídicos importantes.

Teniendo los metabolitos seleccionados, se llevó a cabo la fase *in vitro*, donde inicialmente se evaluó la citotoxicidad de los metabolitos y fármacos seleccionados sobre la línea de cáncer de cérvix HeLa, a partir del método MTT descrito por Mossmann (Mosmann, 1983). Se determinó la concentración citotóxica que causa el 50% de la muerte celular (CC_{50}), en un tiempo de 48 horas para cada compuesto, cuyos valores obtenidos fueron 95, 432, 87,52 y 256,4 μM para la quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol respectivamente, así como 1,55 y 3,63 μM para los fármacos doxorubicina y oxaliplatino respectivamente.

A partir del CC_{50} de los compuestos, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad evaluando mezclas entre los metabolitos (quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol) y los fármacos (doxorubicina y oxaliplatino) sobre las células HeLa, con el objetivo de determinar el efecto citotóxico y la interacción farmacológica presente. La mezcla doxorubicina-carvacrol, se seleccionó como la mejor combinación debido a que disminuyó el porcentaje de viabilidad celular en un 98% y presentó efecto sinérgico.

Finalmente, con el objetivo de corroborar el efecto de la mezcla sobre la mitocondria, se llevaron a cabo ensayos de respiración celular con la mezcla doxorubicina-carvacrol, sobre la línea HeLa ($0,25CC_{50}$), obteniendo una disminución significativa de 27 y 40% en los estados basal y desacoplado respectivamente, indicando así una alteración en la respiración celular.

A partir de los resultados obtenidos mediante acoplamiento molecular, se sugiere que los metabolitos quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol son posibles inhibidores del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Posteriormente, con los ensayos realizados de la fase *in vitro* se identificó que estos compuestos potencializaron sinérgicamente el efecto citotóxico de la doxorubicina sobre las células HeLa. Además, a partir de ensayos de respiración celular, se obtuvo que el efecto citotóxico generado por la mezcla carvacrol-doxorubicina era debido una alteración en los estados basal y desacoplado de la respiración mitocondrial.

Abstract

Title: Identification of metabolites present in medicinal plants as adjuvants in the treatment against cervical adenocarcinoma and study of the mechanism of action on mitochondrial bioenergetics.

Author: Andrea Otero Mojica, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez

Keywords: Cervical cancer, HeLa, cytotoxicity, secondary metabolites.

Description

Cervical cancer is the fourth leading cause of cancer death in women around the world, in 2020 there were 340,000 deaths and 604,127 new cases of cervical cancer (GLOBOCAN, 2020). In countries with low economic resources and health services, the number of mortality cases is higher due to the low probability of one-year survival in patients with advanced/recurrent cervical cancer. Chemotherapy is the most widely used method of treating advanced-stage cervical cancer, but due to its deadly side effects and chemoresistance, the risks outweigh the benefits.

From this, the search of alternatives for chemotherapy treatment has been increasing. The use of mitochondria as a pharmacological target and the use of natural compounds that synergistically potentiate the cytotoxic effect generated by drugs are two of the various study approaches that have been implemented. Based on this, the present project had the general objective of identify metabolites present in medicinal plants that potentiate the cytotoxic effect of the drugs used in chemotherapy (doxorubicin and oxaliplatin) in HeLa cells, having mitochondria as a pharmacological target.

To fulfill the stated objective, an *in silico* phase was carried out, consisted of a virtual screening of a database of 187 metabolites from the Maestro interface of the Schrödinger Drug Discovery suite for molecular modeling. First, the ADME properties of the metabolites were calculated, then the docking score was carried out at two levels of precision (standard precision and extra-precision), in order to determine the possible interactions present with the residues of subunit 4 (Lys122, Leu129, Met119 and Tyr126) and subunit 1 (Ile452, Val456 and Phe459) of complex IV of the mitochondrial electron transport chain, reported as a binding site for the inhibitor chlorpromazine (ID: 5z62, resolution 3.60 Å).

From molecular docking, quercetin, carvacrol, gallic acid and thymol were identified as possible inhibitors of complex IV due to their ADME properties, affinity energy, docking score and present interactions with important amino acid residues.

Taking the selected metabolites, the *in vitro* phase was carried out, where initially the cytotoxicity of the selected metabolites and drugs on the HeLa cervical cancer line was evaluated, based on the MTT method described by Mossman (Mosmann, 1983). The cytotoxic concentration that causes 50% of cell death (CC_{50}) was determined in 48 hours for each compound, whose values were 95, 432, 87.52 and 256.4 μM for quercetin, carvacrol, gallic acid and thymol respectively, as well as 1.55 and 3.63 μM for the drugs doxorubicin and oxaliplatin respectively.

Starting from the CC_{50} of the compounds, cytotoxicity assays were carried out evaluating mixtures between the metabolites (quercetin, carvacrol, gallic acid and thymol) and the drugs (doxorubicin and oxaliplatin) on HeLa cells, with the aim of determining the effect cytotoxic and drug interaction present. The doxorubicin-carvacrol mixture was selected as the best combination because it decreased the percentage of cell viability by 98% and had a synergistic effect.

Finally, with the objective of corroborating the effect of the mixture on the mitochondria, cellular respiration tests were carried out with the doxorubicin-carvacrol mixture, on the HeLa line ($0.25CC_{50}$), obtaining a significant decrease of 27 and 40% in the basal and uncoupled states respectively, thus indicating an alteration in cellular respiration.

Based on the results obtained by molecular docking, it is suggested that the metabolites quercetin, carvacrol, gallic acid and thymol are possible inhibitors of complex IV of the mitochondrial electron transport chain. Subsequently, with the tests carried out in the *in vitro* phase, it was identified that these compounds synergistically potentiated the cytotoxic effect of doxorubicin on HeLa cells. In addition, from cellular respiration assays, it was found that the cytotoxic effect generated by the carvacrol-doxorubicin mixture was due to an alteration in the basal and uncoupled states of mitochondrial respiration.

1. Introducción

El cáncer de cuello uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres en el mundo y en 42 países continúa siendo la principal causa. A partir de las estadísticas realizadas por el observatorio global de cáncer GLOBOCAN, en el año 2020, 340.000 mujeres fallecieron a causa de esta neoplasia y se presentaron 604.127 nuevos casos (GLOBOCAN, 2020). Gracias a los diversos métodos de detección como la citología cervical y la colposcopia, así como a los tratamientos para su eliminación, se ha logrado disminuir el porcentaje de mortalidad del cáncer de cérvix. A pesar de esto, en países con bajos recursos en servicios de salud, la detección tardía del cáncer es un gran problema, donde la tasa de supervivencia a 1 año de pacientes en estado avanzado/recurrente es del 10-20% (Zhu et al., 2016).

Los principales tratamientos para el cáncer de cérvix son la intervención quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia (Zhu et al., 2016). Dependiendo del estado del tumor se emplea el método más adecuado, para etapas tempranas es común el uso de la intervención quirúrgica, pero para etapas de cáncer avanzado/recurrente, la quimioterapia es uno de los métodos estándar usados. Su mecanismo de acción consiste en la administración, comúnmente intravenosa, de fármacos con actividad anticancerígena que generen una inhibición de la proliferación celular y multiplicación tumoral (Nakamura & Maeda, 2022).

A pesar de tener un mecanismo de acción efectivo contra el cáncer, la quimioterapia presenta dos principales inconvenientes que limitan su uso, la farmacorresistencia y los efectos secundarios (Lin et al., 2020). A causa de esto, la combinación de fármacos con el

fin de disminuir la dosis empleada y el uso de compuestos naturales como adyuvantes que potencialicen el efecto de los fármacos quimioterapéuticos, han sido alternativas bastante prometedoras (Lin et al., 2020).

Frente a la problemática anterior, el presente proyecto de investigación se llevó a cabo con el objetivo de identificar metabolitos presentes en plantas medicinales que potencialicen el efecto citotóxico de la doxorubicina y el oxaliplatino, fármacos usados en el tratamiento contra el adenocarcinoma de cáncer de cérvix, teniendo como diana terapéutica la mitocondria.

Con el fin de cumplir el objetivo planteado, se realizó un cribado *in silico* a partir de acoplamiento molecular, donde se identificó que los metabolitos quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol podrían inhibir el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Posteriormente, se evaluó el efecto citotóxico de los metabolitos seleccionados, con los fármacos doxorubicina y oxaliplatino, identificando la concentración citotóxica que mata el 50% (CC₅₀) de las células HeLa.

A partir del CC₅₀ obtenido para cada compuesto, se realizaron ensayos de citotoxicidad mezclando los fármacos con los metabolitos, identificando que el carvacrol potencializa el efecto citotóxico generado por la doxorubicina sobre las células HeLa. Por último, se llevaron a cabo ensayos de respiración celular, donde se obtuvo una disminución del 27% en el estado basal y 35% en el estado desacoplado, lo cual indica que el carvacrol probablemente potencializa el efecto de la doxorubicina mediante la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Con la finalidad de facilitar la presentación de los resultados obtenidos, se expone inicialmente un marco teórico con los conceptos necesarios para comprender este proyecto de investigación, tales como la epigenética del cáncer, la contribución de la mitocondria en la dinámica del cáncer, las características, tratamientos y factores de riesgo del cáncer de cérvix, el uso de metabolitos secundarios de plantas medicinales como alternativa para el tratamiento del adenocarcinoma de cuello uterino y el uso del docking molecular para el desarrollo de fármacos. Posteriormente, se presenta la metodología, los resultados, el análisis de estos y las conclusiones obtenidas en la parte computacional y en la experimental, exponiendo esta información en dos capítulos por aparte, uno para la fase *in silico* y otro para la *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1 La epigenética del cáncer

El cáncer es producto de mutaciones genéticas que alteran la homeostasis del cuerpo, ocasionando desregulación en genes encargados de controlar funciones como la división celular, muerte celular y el transporte de las células en el cuerpo (Baylin & Jones, 2016). Se ha demostrado que el proceso de carcinogénesis es causado también por cambios epigenéticos, en donde se presentan alteraciones en la expresión génica sin afectar la secuencia de ADN (Gonzalo et al., 2008), así como la activación o inactivación de genes encargados del buen funcionamiento del cuerpo (Zhang et al., 2020). Entre las principales alteraciones producidas por la aberración epigenética, se encuentran la metilación del ADN, la modificación de histonas y el ARN no codificante (Lu et al., 2020).

Los cambios epigenéticos se encuentran regulados por enzimas específicas, cuya expresión depende del linaje y estado celular; y por los correspondientes sustratos (acetil-CoA, α -cetoglutarato (α -KG), lactato, etc), los cuales dependen en mayor parte del metabolismo celular (Liu et al., 2022). Este último es un proceso clave en el crecimiento, división y diferenciación celular, encargado de satisfacer las necesidades energéticas y biosintéticas de las células. Cualquier alteración presente en las vías metabólicas se ve reflejada en enfermedades, tales como el cáncer (Dai et al., 2020).

Teniendo presente que la reprogramación metabólica es un factor clave y regulador dependiente de las alteraciones epigenéticas (Liu et al., 2022), y que las mitocondrias cumplen un papel esencial en el metabolismo y en el estado energético celular, el estudio de estas como diana farmacológica en el cáncer se ha ido incrementando (Liu et al., 2022).

2.2 Contribución de las mitocondrias y la fosforilación oxidativa en la dinámica del cáncer.

Las mitocondrias son orgánulos indispensables en las células, debido a su papel regulador en el metabolismo celular y a sus múltiples funciones vitales y letales como, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la regulación de los niveles de calcio citosólico (Ca^{2+}), la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), la inducción de muerte celular, entre otras (Wallace, 2012). Al ser un punto crítico en el metabolismo celular, y debido a que las alteraciones en los componentes mitocondriales están relacionadas con diversas enfermedades, el estudio de la mitocondria como factor implicado en el desarrollo y progresión del cáncer se ha ido incrementando en los últimos años (Jeena et al., 2019).

Las observaciones del científico Otto Warburg, sobre la reprogramación metabólica de las células cancerosas hacia la glucólisis a causa de daños en la fosforilación oxidativa, contribuyeron hacia el estudio de la maquinaria mitocondrial como gran implicado en el cáncer (Wallace, 2012). Warburg, planteó que los cambios metabólicos eran producto de mitocondrias disfuncionales, sin embargo, a partir de diversos estudios se ha determinado que muchas líneas celulares de cáncer presentan mitocondrias funcionales, como el estudio realizado por Xiong et al., donde se reporta que, en la línea celular de cáncer de cérvix, HeLa, se presentan mitocondrias funcionales, siendo la fosforilación oxidativa su principal fuente de ATP (Xiong et al., 2012).

La fosforilación oxidativa es el proceso metabólico que tiene lugar en la mitocondria, donde se lleva a cabo la producción de energía en forma de ATP, mediante la cadena de transporte de electrones (ETC, del inglés Electron Transport Chain) (Cardol et al., 2009). Entre los principales componentes de la ETC se encuentra el complejo IV o citocromo c oxidasa, el cual es un regulador importante de la respiración mitocondrial, encargado de catalizar la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular, formando dos moléculas de agua y generando un gradiente de protones (Pajuelo Reguera et al., 2020). La inhibición de este complejo enzimático se ve reflejado en una alteración en el potencial de membrana y una disminución en los niveles de ATP, afectando la respiración mitocondrial en las células (Li et al., 2006).

A partir de lo anterior, la mitocondria presenta un papel importante en el desarrollo del cáncer, razón por la cual es una buena alternativa como objetivo de estudio para el tratamiento de este, y teniendo presente que las células de cáncer de cérvix presentan

mitocondrias funcionales y la fosforilación oxidativa es su principal fuente de ATP, el enfoque hacia la maquinaria mitocondrial en este tipo de cáncer es bastante prometedor.

2.3 Cáncer de cérvix, tratamiento actual y factores de riesgo.

El cáncer de cérvix se origina a partir de dos tipos de células epiteliales, las células escamosas que se encuentran en la parte externa del cuello uterino y las células glandulares o columnares presentes en el canal interno (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002). Según la OMS, existen tres principales categorías de tumores de cuello uterino, los tumores de células escamosas (carcinomas en su mayoría), los tumores glandulares (adenocarcinomas) y otros tumores epiteliales (carcinoma adenoescamoso, carcinoide, etc) (Marth et al., 2017).

Entre los factores de riesgo que impulsan el desarrollo de cáncer de cuello uterino, se encuentra principalmente la infección por el virus del papiloma humano (VPH), la cual produce una alteración en procesos celulares críticos, como la proliferación celular, la síntesis de ADN y la respuesta ante factores de crecimiento (Jaudan et al., 2018). Por otra parte, en menor porcentaje de casos, el consumo de tabaco, el uso prolongado de anticonceptivos orales, la mala alimentación y tener antecedentes familiares de cáncer de cérvix también son causales del desarrollo de cáncer de cervix (American Cancer Society, 2021).

Por otro lado, la citología cervical y la colposcopia son los principales métodos de detección del cáncer de cérvix. Los cuales permiten identificar el tamaño del tumor y realizar su clasificación a partir del sistema de estadificación dado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), el cual se divide en cuatro etapas principales (I, II, III y IV), cada una dividida en subetapas y subgrupos (Salib et al., 2020).

Para etapas tempranas de cáncer de cuello uterino (estadios IA1, IA2, IB2 y IIA) el tratamiento más empleado es la intervención quirúrgica, siendo la traquelectomía (extirpación del cuello uterino), la histerectomía (extirpación del cuello uterino, el útero, los ovarios y las trompas) y la exenteración pélvica (extirpación de la vagina, la vejiga y el recto) los principales tipos de cirugía empleados (United Kingdom National Health Service, 2021).

En etapas de cáncer avanzado (estadios I3B a IIA2), es común el uso de quimioterapia, radioterapia o la combinación de ambas, es decir la quimioradioterapia (CRT, chemoradiotherapy) debido a los buenos pronósticos de supervivencia que ha presentado (Bhatla et al., 2021). Para el caso de la quimioterapia, el cisplatino, el paclitaxel y la doxorubicina son los principales fármacos empleados (Bhatla et al., 2021) (X. Wang et al., 2022). Seguidamente, para etapas de cáncer avanzado/metastásico (estadios III y IV), donde el pronóstico de supervivencia es lamentable, se suele implementar quimioterapia paliativa, con el objetivo de disminuir los síntomas generados (Bhatla et al., 2021).

La quimioterapia es uno de los métodos estándar implementados en el tratamiento contra el cáncer de cérvix, pero debido a factores como la toxicidad de los fármacos, los efectos secundarios letales (la cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad) y la generación de resistencia, su uso se ha ido limitando (Zhu et al., 2016). Razón por la cual, se han planteado diversas alternativas como la combinación de fármacos que permita disminuir la dosis empleada, reduciendo los efectos adversos y la probabilidad de generar resistencia (Cragg et al, 2016).

Otra alternativa bastante prometedora es el uso de compuestos de origen natural como adyuvantes en el tratamiento de quimioterapia, que logren potencializar el efecto citotóxico

generado por los fármacos quimioterapéuticos (Lin et al., 2020). Por lo que, la profundización sobre esta alternativa es necesaria.

2.4 Metabolitos secundarios como alternativa para el tratamiento del adenocarcinoma de cuello uterino e inhibidores de la bioenergética mitocondrial.

El estudio del potencial terapéutico de compuestos presentes en la naturaleza ha llevado a la creación de fármacos quimioterapéuticos empleados hoy en día para el tratamiento contra el cáncer (M. Huang et al., 2021). Un ejemplo de esto es el paclitaxel, fármaco obtenido a partir de la corteza de tejo del Pacífico, que genera efecto citotóxico en las células cancerosas a partir de detección mitótica mediada por la supresión en los cambios dinámicos de los microtúbulos (Cragg & Pezzuto, 2016). La doxorubicina, de igual forma, se obtiene a partir de microbios presentes en el suelo y su mecanismo de acción consiste en generar muerte por apoptosis (Cragg & Pezzuto, 2016).

A pesar de la efectividad de los compuestos mencionados anteriormente frente a las células cancerosas, la doxorubicina presenta efectos secundarios que pueden ser letales y el paclitaxel presenta una alta probabilidad de resistencia (Cragg & Pezzuto, 2016). Frente a esto, se han ido implementado alternativas como el uso de compuestos naturales en combinación con fármacos, con el fin de potencializar el efecto generado y así mismo, disminuir la dosis aplicada, reduciendo la posibilidad de generar resistencia y efectos secundarios letales (Lin et al., 2020).

Los beneficios de la combinación de compuestos naturales con fármacos quimioterapéuticos se ven reflejados en estudios como el realizado por Banerjee et al, donde demostraron que la combinación del fármaco docetaxel y la curcumina presentaba un efecto

mayor en la inducción de apoptosis y la inhibición de la proliferación en células de cáncer de próstata, comparado con el efecto generado por los compuestos en separado (Banerjee et al., 2017). De igual forma, el estudio realizado por Zhao et al, demostró que el metabolito quercetina presentaba efecto sinérgico con el fármaco cisplatino, mejorando la supresión del crecimiento y la inducción de apoptosis generada por el fármaco sobre las células de cáncer de hígado (Zhao et al., 2014).

Teniendo presente la importancia de los compuestos naturales como alternativas en la terapia contra el cáncer, en el presente proyecto se evaluó la actividad citotóxica de metabolitos secundarios, presentes en plantas medicinales, tales como la quercetina, el carvacrol, el ácido gálico y el timol.

Debido a que la selección de los metabolitos a usar en el presente proyecto se llevó a cabo a partir de técnicas computacionales, es necesario conocer las ventajas de usar dicha herramienta en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de cáncer.

2.5 Diseño de fármacos asistido por computadoras

En el desarrollo de fármacos exitosos, factores como el costo, la duración y el alto porcentaje de fracasos en los ensayos clínicos (Schaduangrat et al., 2020), han impulsado la búsqueda de nuevas estrategias que permitan facilitar el descubrimiento y desarrollo de medicamentos comerciales, así como la técnica de diseño de fármacos asistido por computadora (CADD – Computer-Aided Drug Design). Esta técnica emplea estrategias químico-moleculares y cuánticas que permiten mejorar moléculas bioactivas y desarrollar alternativas terapéuticas (Prieto-Martínez et al., 2019), a partir de un trabajo conformado por

diversas disciplinas científicas como el acoplamiento molecular, modelado molecular, cribado virtual entre otros.

El CADD tiene como objetivo principal realizar un filtrado de los compuestos que se van a evaluar en futuras pruebas experimentales, enfocándose en los más prometedores y así disminuir el tiempo y los costos generados en el desarrollo de fármacos potenciales. Consta de dos categorías principales: el diseño de fármacos basados en ligandos (LBDD-Ligand Based Drug Design) y el diseño de fármacos basados en estructuras (SBDD – Structure Based Drug Design) (del Rio & Varchi, 2016). El LBDD se emplea cuando el diseño molecular no se enfoca en el objetivo biológico (target), sino en las moléculas que se unen a este. Herramientas como el modelado de farmacoforos son ampliamente utilizadas en el LBDD (Aparoy et al., 2012).

Por otro lado, el SBDD, consiste en analizar la estructura 3D de la proteína u objetivo de estudio, para así identificar y optimizar el ligando o molécula de unión. Dentro de los diversos enfoques del SBDD se encuentra el modelado de homología y la técnica empleada en presente proyecto de investigación, el acoplamiento molecular (Tomar et al., 2019).

2.5.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta computacional que consiste en el cálculo y predicción de la posición más óptima presente en la interacción de un ligando (molécula pequeña) y una diana farmacológica (proteína o molécula grande) (Ballón & Grados, 2019). Esta técnica se ha ido implementando en los últimos años, debido a que es un método bastante novedoso, rentable y rápido en comparación con otras técnicas convencionales. Estudios como el realizado por Ahmed et al, reportan la eficacia del uso del

docking molecular en el cáncer para anticipar la posible unión de un ligando o compuesto de estudio con una proteína o diana farmacológica, obteniendo resultados correlacionados fuertemente con los obtenidos en la fase *in vitro* (W. Ahmad et al., 2022).

El proceso para realizar un acoplamiento molecular consiste primero, en la predicción de la conformación, posición y orientación del ligando en el sitio de unión, para luego, a partir de una función de puntuación, que estima la afinidad entre la proteína y ligando (Meng et al., 2012), determinar la mejor pose (Stanzione et al., 2021). El emparejamiento y la búsqueda de los mejores ligandos se realiza a partir de algoritmos de muestreo (Halperin et al., 2002), que facilitan la detección de los modos de acoplamiento posibles (Meng et al., 2012).

2.5.2 Algoritmos de muestreo

Los algoritmos de muestro facilitan la detección de los modos de acoplamiento molecular posibles entre la unión de dos moléculas (Meng et al., 2012). Debido a que el espacio conformacional involucra gran cantidad de grados de libertad como los presentes en el ligando, en la proteína y en la rotación y traslación de la molécula, se han desarrollado diversos algoritmos de muestreo, como Monte Carlo, MCSS, LLUDI, entre otros, encargados de detectar las conformaciones posibles disminuyendo la complejidad y el costo (Meng et al., 2012).

Teniendo presente que un muestreo eficiente del espacio conformacional comprende un gran reto, el enfoque efectivo de varios programas de acoplamiento molecular, ha consistido en la búsqueda de las conformaciones posibles de la unión proteína-ligando,

centrándose en modelar la flexibilidad del ligando y manteniendo rígida la proteína (Stanzione et al., 2021).

Existen dos métodos para llevar a cabo el muestreo de la conformación del ligando, el método estocástico, usado en algoritmos como el de Monte Carlo, ACO, y tabú; y el método sistemático ampliamente usado por el programa Glide (Stanzione et al., 2021).

Los algoritmos de muestreo trabajan en conjunto con las funciones de puntuación para evaluar y clasificar la calidad de la pose de unión obtenida entre el ligando y el receptor (Stanzione et al., 2021).

2.5.3 *Funciones de puntuación*

Las funciones de puntuación corresponden a métodos matemáticos que se emplean para predecir la afinidad de unión entre dos o más moléculas. Existen cuatro principales clases de funciones de puntuación, las basadas en la física, basadas en campos de fuerza, basadas en el conocimiento y las empíricas. Esta última, se caracteriza por la rapidez de las funciones de puntuación para generar cálculos de puntuación vinculante.

Un ejemplo de función de puntuación empírica es ChemScore, la cual se describe a partir de la ecuación 1. El término $C_{lipo} \sum f(r_{lr})$ hace referencia a los átomos lipofílicos en las interacciones ligando-receptor, el término $C_{bond} \sum g(\Delta r)h(\Delta \alpha)$ a las interacciones de enlace de hidrogeno, término $C_{metal} \sum f(r_{lm})$ a las interacciones metal-ligando y el término $C_{rotb}H_{rot}$ a los enlaces rotables (Friesner et al., 2004).

$$\Delta G_{\text{unión}} = C_0 + C_{\text{lipo}} \sum f_{(r_{lr})} + C_{\text{hbond}} \sum g(\Delta r)h(\Delta \alpha) + C_{\text{metal}} \sum f_{(r_{lm})} + C_{\text{rotb}} H_{\text{rot}}$$

Ecuación 1. Ecuación empleada por la función de puntuación, ChemScore.

La plataforma computacional Schrodinger, con la cual se llevó a cabo el acoplamiento molecular del presente proyecto, emplea una función de puntuación GlideScore, la cual que tiene como base y punto de partida la función ChemScore (Schrodinger, 2015).

GlideScore, utiliza dos formas de puntuación, la GliseScore SP (Standar Precision) y la GlideScore XP. La diferencia entre estas se basa en que la primera emplea una función de puntuación con precisión baja, para identificar los ligandos propensos a unirse a la proteína. Mientras que, la segunda presenta una precisión más alta, presentando severas penalizaciones hacia las confirmaciones que violen las normas fisicoquímicas establecidas (Friesner et al., 2004).

GlideScore, a diferencia de ChemScroe, incluye nuevos términos, recompensas y penalizaciones (Stanzione et al., 2021), tal y como se presenta en la ecuación 2 (Schrodinger, 2015), en donde se muestran los componentes del GlideScore, que incluye el choque estérico, los términos polares enterrados que tienen como fin penalizar los desajustes electrostáticos, las penalizaciones de amida y de volumen excluido, los términos de recinto hidrofóbico, entre otros (Schrodinger, 2015).

$$GScore = 0,05 * vdW + 0,15Coul + Lipo + Hbond + Metal \\ + Rewards + RotB + site$$

Ecuación 2. Componentes para el cálculo de la función de puntuación GlideScore de la plataforma Schrödinger.

A partir de los conceptos y problemáticas tratadas anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar metabolitos presentes en plantas medicinales que potencialicen el efecto citotóxico de la doxorubicina y el oxaliplatino en células HeLa, teniendo como diana farmacológica la mitocondria.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar metabolitos de plantas medicinales con potencial inhibitorio de la subunidad 4 del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial mediante acoplamiento molecular.
- Evaluar la actividad citotóxica y el sinergismo entre los fármacos doxorubicina y oxaliplatino con los metabolitos previamente identificados en la línea celular HeLa.
- Determinar el efecto de las mezclas (fármaco/metabolito) con mejor efecto citotóxico sobre la respiración celular mitocondrial en la línea celular HeLa.

La metodología establecida para el cumplimiento de los objetivos planteados anteriormente consistió en dos fases, una *in silico* y otra *in vitro*. Por lo que, para una mejor comprensión, se dividió el documento en dos capítulos, donde se presenta la metodología, los resultados obtenidos y la discusión de estos, para cada fase por separado. En el primer capítulo se expondrá la parte *in silico* y en el segundo la parte *in vitro*.

CAPITULO 1: DETERMINACIÓN *in silico* DE METABOLITOS PRESENTES EN PLANTAS NATURALES CON POSIBLE EFECTO INHIBITORIO EN LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.

1. Metodología fase *in silico*.

Con el fin de cumplir con el primer objetivo específico planteado para el presente proyecto de investigación, se llevó a cabo de la fase *in silico* siguiendo el diagrama metodológico que se presenta en la **figura 1**. Como primer paso, se creó una base de datos con 187 metabolitos reportados en la literatura con actividad anticancerosa, para luego seleccionar la proteína mitocondrial a evaluar, en este caso la subunidad 1 y 4 del complejo IV. El acoplamiento molecular se llevó a cabo empleando la interfaz Maestro del paquete de Schrödinger Drug Discovery suit para modelado molecular (2020-4) (Schrödinger, 2020). Inicialmente se prepararon los ligandos a partir de sus estructuras 2D; y la proteína, a partir de su estructura cristalina reportada en la PDB. Posteriormente, se seleccionó el sitio de unión a partir de los residuos aminoacídicos de la subunidad 4 y 1 del complejo IV y se realizó el acoplamiento molecular en dos grados de precisión, docking de precisión estándar (SP) y docking de extraprecisión (XP). Finalmente, se seleccionaron los posibles inhibidores, teniendo en cuenta como criterios de selección el docking score, las interacciones presentes, las propiedades ADME y la energía de afinidad.

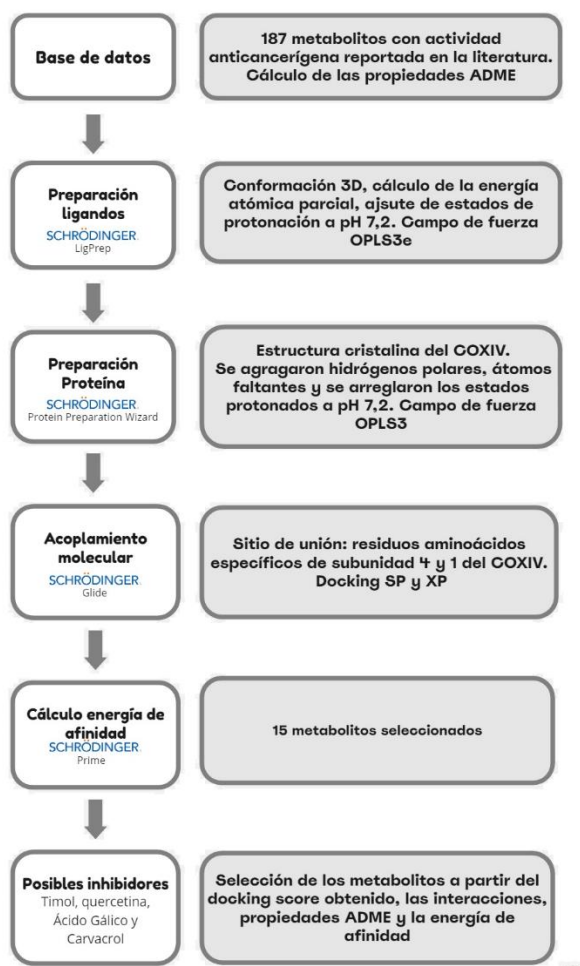


Figura 1. Esquema metodológico fase in silico para la selección de los metabolitos con mejores interacciones en el sitio de unión del complejo IV de la ETC.

1.1 Base de datos metabolitos y preparación de ligandos

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de metabolitos con actividad anticáncer presentes en plantas medicinales, y a partir de esto se creó una base de datos con 187 metabolitos (Anexo 1) con información de su estructura química, su procedencia y sus propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME).

Para llevar a cabo el acoplamiento molecular, se realizó primero la preparación de los ligandos obtenidos a partir de la plataforma PubChem en formato SDF, junto con el compuesto de referencia (clorpromazina) reportado por Olivia et al, 2017 como inhibidor del complejo IV (Oliva et al., 2017). Posteriormente, se empleó la herramienta LigPrep (LigPrep et al., 2021) que ofrece el software maestro, para generar la conformación tridimensional con menor energía de cada ligando a evaluar, aplicando un campo de fuerza OPLS3 (Roos et al., 2019) y calculando la carga atómica parcial, generando tautómeros, estados de protonación a $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$, manteniendo la quiralidad y la estereoisomería de las moléculas.

1.2 Preparación de la proteína

La preparación de la proteína se llevó a cabo a partir de la estructura cristalina del complejo IV (ID:5z62, resolución 3.60 Å) (Zong et al., 2018), obtenida de la Protein Data Bank (RCSB PDB, 2023). Posteriormente, se empleó el módulo de maestro, Protein Preparation Wizard, que permitió ajustar los estados de protonación de los aminoácidos, agregar hidrógenos polares, residuos y átomos faltantes. Se optimizó la estructura de la proteína y se minimizó su energía a partir de la aplicación de un campo de fuerza OPLS3 (Madhavi Sastry et al., 2013).

1.3 Docking molecular

Antes de llevar a cabo el acoplamiento molecular de los 187 ligandos y la proteína preparada, se hizo uso de la herramienta que ofrece el módulo Glide, Receptor grid generation, para configurar las coordenadas de la caja docking, es decir el sitio de unión de los ligandos con la proteína, en los residuos aminoacídicos correspondientes a la subunidad

4 (Lys122, Leu129, Met119 y la Tyr126) y subunidad 1 (Ile452, Val456 y Phe459), reportados por Oliva et al como sitio de unión más probable para una posible inhibición en el complejo IV (Oliva et al., 2017).

Luego, se llevó a cabo el acoplamiento molecular a partir de dos diferentes grados de precisión, docking de precisión estándar (SP) y docking de extra-precisión (XP). Inicialmente, se realizó el docking SP con los 187 metabolitos y el compuesto de referencia ya preparados, donde se obtuvo una pose por ligando. Teniendo presente la importancia de conocer el posible comportamiento de los compuestos en el organismo (permeabilidad, estabilidad metabólica, etc) se calcularon además las propiedades de Adsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME), empleando la herramienta Qikprop que ofrece maestro (QikProp, 2015). Después de esto, se seleccionaron 40 de los metabolitos, teniendo en cuenta criterios importantes como las interacciones presentes en el sitio de unión, el docking score y las reglas de Lipinsky presentes en los descriptores ADME.

Por último, se llevó a cabo el docking XP con los metabolitos seleccionados, obteniendo 5 poses por ligando. Se realizó una inspección visual, analizando las interacciones presentes en las poses obtenidas de cada compuesto, y teniendo como otro criterio de selección el docking score, esto con el fin de seleccionar finalmente 15 metabolitos para el cálculo de su energía de afinidad con la proteína.

1.4 Cálculo de la energía de afinidad

Luego de seleccionar los 15 mejores metabolitos, se llevó a cabo la predicción de la energía de afinidad de estos y la proteína, haciendo uso del módulo que ofrece Schrödinger,

Prime/MM-GBSA (E. Wang et al., 2019). Esta herramienta emplea el método de energía libre de punto final, la mecánica molecular generalizada de área superficial de Born (MM-GBSA) para calcular la energía de enlace de los ligandos libres, la proteína y el complejo proteína-ligando (E. Wang et al., 2019), empleando un modelo de solvatación VSGB 2.0 y un campo de fuerza OPLS3 (Madhavi Sastry et al., 2013). Teniendo en cuenta los valores de energía obtenidos, junto con el análisis de las interacciones presentes y el docking score, se seleccionaron los metabolitos a usar en los posteriores ensayos *in vitro*.

1.5 Diseño de figuras

El modelado gráfico de las interacciones de la proteína con los ligandos en la mejor pose se realizaron a partir del software desarrollado por Schrödinger, PyMol y del editor de gráficos Inkscape 1.0.

2 Resultados y discusión

Luego de crear la base de datos con 187 metabolitos con actividad anticancerígena reportada presentes en plantas medicinales, y de calcular las propiedades ADME de cada uno (ver apéndice A), se llevó a cabo el acoplamiento molecular (docking molecular) de precisión estándar o docking SP. A partir de esto se seleccionaron 40 compuestos, teniendo presente parámetros como el docking score obtenido, las reglas de Lipinski y las interacciones con los residuos importantes del sitio de unión. Posteriormente, se realizó el docking de extra-precisión o docking XP y se seleccionaron 15 metabolitos, para luego realizar el cálculo de la energía de afinidad, como se presenta en la **tabla 1**.

Para la selección de los metabolitos a evaluar experimentalmente, se tuvieron en cuenta aspectos como la energía de afinidad, el docking score, las interacciones presentes y las propiedades ADME, principalmente las reglas de lipinsky, la permeabilidad en células de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2), que simulan la barrera epitelial intestinal, y la permeabilidad sobre las células de riñón canino (MDCK), que simulan la barrera hematoencefálica. A partir de esto, y como se puede observar en la **tabla 1**, se seleccionaron como posibles inhibidores del complejo IV los compuestos, quercetina, capsaicina, ácido rosmarínico, carvacrol, ácido gálico y timol.

Tabla 1. Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del complejo IV y el inhibidor de referencia, clorpromazina.

Compuesto	EA (kcal/mol)	DS	PM	Log P O/A	DH	AH	PSA	ER	Caco-2	MDCK
Quercetina	-46,35	-4,899	302,24	0,41	1	4	91,9	1	58	23
Capsaicina	-40,03	-3,301	305,42	3,76	2	2	36,7	9	1860	967
Ácido rosmarínico	-38,91	-4,846	360,32	1,21	5	7	114,52	7	1	0
Arbutina	-33,49	-6,278	272,25	-1,05	5	10	119,61	3	69	26
Mahanina	-32,04	-3,408	347,46	5,5	2	2	45,25	4	2034	1066
Carvacrol	-31,0	-3,734	150,22	3,3	1	1	20,23	1	3687	2027
Sinalbina	-28,74	-5,461	425,43	-1,56	6	15	220	14	0	0
Acido gálico	-28,0	-5,451	170,12	-0,55	1	2	84,38	4	106	43
Timol	-27,33	-3,897	150,22	3,3	1	1	20,23	1	3816	2104
Pricrocrocina	-25,19	-5,979	330,38	-0,61	4	12	116,45	4	97	40
Oroxilina A	-24,68	-3,878	284,27	0,3	2	5	78,9	1	664	318
Sinigrina	-24,36	-5,921	359,37	-1,4	5	14	185,98	13	5	2
Catequina	-21,17	-4,566	290,27	1,39	2	2	81,3	1	107	44
Ácido cafeico	-18,54	-5,591	180,16	-0,67	3	3	77,67	2	184	79
Indol-3-carbbinol	-2,79	-4,366	147,18	0,96	2	2	36,02	1	2557	1368
Clorpromazina	-35,15	-6,218	318,86	4,35	0	1	31,78	4	2115	4284

Nota: Se muestran los resultados obtenidos de DS: docking score del XP, EA: energía de afinidad, las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular (rango recomendado: 130 - 725), Log P O/A: coeficiente de octanol-agua (rango recomendado: -2 - 6,5), DH: número de donadores de puentes de hidrogeno (rango recomendado: 0 - 6) y AH: número de aceptores de puentes de hidrogeno (rango recomendado: 2 - 20), ASP: área de superficie polar (rango recomendado: 7 - 200), ER: número de enlaces rotatorios (rango recomendado: 0 - 15). Los valores que encuentran fuera de los rangos están coloreados en rojo. Por último, se presentan los resultados obtenidos de permeabilidad en células intestinales caco-2 y las células renales MDCK, donde los valores significan rojo (≤ 25); poca permeabilidad, amarillo; permeabilidad intermedia y verde (≥ 500); alta permeabilidad. Resaltado en color azul se muestran los resultados obtenidos para el inhibidor clorpromazina.

A parte de factores como la energía de afinidad, el docking score y las propiedades ADME, la inspección visual (**figura 2**) correspondió a un criterio de gran importancia en la selección de los metabolitos, donde se tuvieron en cuenta las interacciones de los compuestos con los residuos aminoacídicos de la subunidad 1 (Met119, Lys122, Tyr126 y Leu129) y de la subunidad 4 (Ile452 Val456 y Phe459), los cuales fueron determinados por Olivia et al como residuos importantes en el sitio de unión de la clorpromazina (CPZ), identificada como inhibidor del complejo IV (Oliva et al., 2017).

Según lo reportado por Oliva et al, la CPZ se une a un bolsillo hidrofóbico conformado principalmente por residuos de la subunidad 4 y de la subunidad 1, cercanos al grupo Hemo. Lo cual se pudo observar a partir de los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular (EA:35,15 kcal/mol; DS: -6,218; **Tabla 1**), donde la CPZ presentó interacciones hidrofóbicas con los residuos Met119, Tyr126, Leu129, Ile452, Val456 y Phe459 (**figura 2A**).

A partir de lo anterior, dentro de los compuestos seleccionados como posibles inhibidores del complejo IV de la ETC, se encuentra la quercetina (EA: -46,35 kcal/mol; DS: -4,899; **Tabla 1**). Los resultados de docking sugieren que la quercetina se puede ubicar en un sitio de unión formado por los aminoácidos Lys122-Leu129 de la cadena D y Glu63-Ser60 de la cadena M, donde además presenta interacciones de puente de hidrógeno con la Tyr126, His123 y Ser60 (**Figura 2B**). Su permeabilidad en células Caco y MDCK es baja, pero debido a sus múltiples actividades biológicas y sus efectos antioxidantes, anticancerígenos y antiinflamatorios, este flavonoide ha sido un objeto de estudio en diversos tipos de cáncer, entre esos el de cuello uterino. Se ha reportado que la quercetina inhibe selectivamente el crecimiento de las células HeLa y genera la inducción de apoptosis (He et al., 2021).

Por otro lado, para el caso de la capsaicina, los resultados del acoplamiento molecular (EA: -40,03 kcal/mol; DS: -3,301, **Tabla 1**) indican que este metabolito se puede ubicar en un sitio de unión conformado por los residuos aminoacídicos Leu116-Leu129 de la cadena D, Tyr55 y Val60-Glu63 de la cadena K. Donde, presenta interacciones tipo puente de hidrógeno con la Lys122 y la Gly61 y una interacción π -catión con la Lys122 (**Figura 2C**). Además de sus valores de permeabilidad altos en células caco-2 y MDCK, este metabolito presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Se ha reportado que genera muerte celular por activación de especies reactivas de oxígeno y proteínas proapopticas en células de cáncer colorrectal (Oliver & Teniente, 2016).

Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular para el carvacrol (EA: -31,0 kcal/mol; DS: -3,734, **Tabla 1**) sugieren que este se puede ubicar en un sitio de unión con

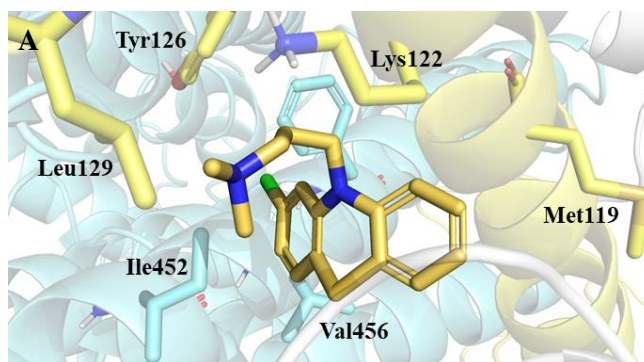
los residuos aminoacídicos Tyr126-Leu129, Ile118- Lys122 de la cadena D y Thr448, Ile452-Phe459, Gly42-Pro44 de la cadena A. Donde, además presenta puentes de hidrógeno con la Gly42 e interacciones π - π con la Tyr126 (**Figura 2D**). Sus valores de permeabilidad en las células caco-2 y MDCK son altos, indicando esto una posible buena absorción vía oral y permeabilidad en las membranas. Además, es un fenol monoterpenoide con actividad antioxidante y anticancerígena reportada. En las células de cáncer de cérvix, HeLa, suprime la proliferación a partir de apoptosis dependiente de caspasas y supresión del ciclo celular (A. Ahmad & Ansari, 2021).

Por otro lado, los resultados de docking obtenidos para el timol (EA: -27,33 kcal/mol; DS-3,897; **Tabla 1**) indican que este podría ubicarse en el sitio de unión conformado por los residuos aminoacídicos Tyr126, Ile118-Lys122 de la cadena D, Ile452-Phe459, Gly42-Gln43. Además, presenta interacciones tipo puente de hidrogeno con la Gly42 e interacciones hidrofóbicas con la Ile452, Val456, Tyr126 y Phe159 (**Figura 2E**). El timol es un fenol monoterpenoide, isómero del carvacrol, y de igual forma, presentó valores altos de permeabilidad en células caco-2 y MDCK, además se ha reportado actividad antioxidante, antiinflamatorias y antiapoptótica. En la línea celular HeLa, se ha reportado que genera disfunción mitocondrial, apoptosis, un fuerte efecto antitumoral y un efecto antiproliferativo dependiente de antioxidantes (Islam et al., 2019).

Para el caso del ácido gálico, los resultados de docking obtenidos (EA:-28,0 kcal/mol; DS: -5,451; **tabla 1**), sugieren que este metabolito se puede ubicar en un sitio de union conformado por los residuos aminoacidicos Ile119, Lys122, Tyr126 y Leu129 de la cadena D, Ile452-Phe459, Arg38-Gln43 de la cadena A y Ile62-Glu63 de la cadena K. Donde,

además presenta interacciones de puente de hidrógeno con la Tyr126, Gln43 y Glu63, e hidrofóbicas con la Ile452, Val456, Phe459 y Leu129 (**Figura 2F**). De igual forma, se ha reportado en la literatura que presenta actividad prooxidante induciendo apoptosis en células HeLa, por medio del aumento en la expresión de p53 y de caspasa3 (Aborehab & Osama, 2019).

Finalmente, los resultados obtenidos para el ácido rosmarínico a partir del acoplamiento realizado (EA:-38,91 kcal/mol; DS: -4,846; **tabla 1**) indican que se puede ubicar en el sitio de unión conformado por los residuos Met119-Pro128 de la cadena D y Val60-Gly61 de la cadena K. Donde, además presenta interacciones de puente de hidrógeno con la Lys122, Tyr126 y con la Gly127 e interacciones hidrofóbicas con la Met119 y la Val60 (**Figura 2G**). Sus valores de permeabilidad en células caco-2 y MDCK son bajos, pero presenta diversas propiedades farmacológicas, como ser antioxidante, antiinflamatorio y anticáncer (Cai et al., 2022). Este compuesto polifenólico, se ha reportado que genera apoptosis en cáncer de próstata a través de la expresión de proteínas Bax, Bcl-2 y Caspasa-3, y en células de leucemia, alteró el potencial de membrana mitocondrial a partir de la generación de ROS, y la supresión del factor de necrosis tumoral (Han et al., 2019).



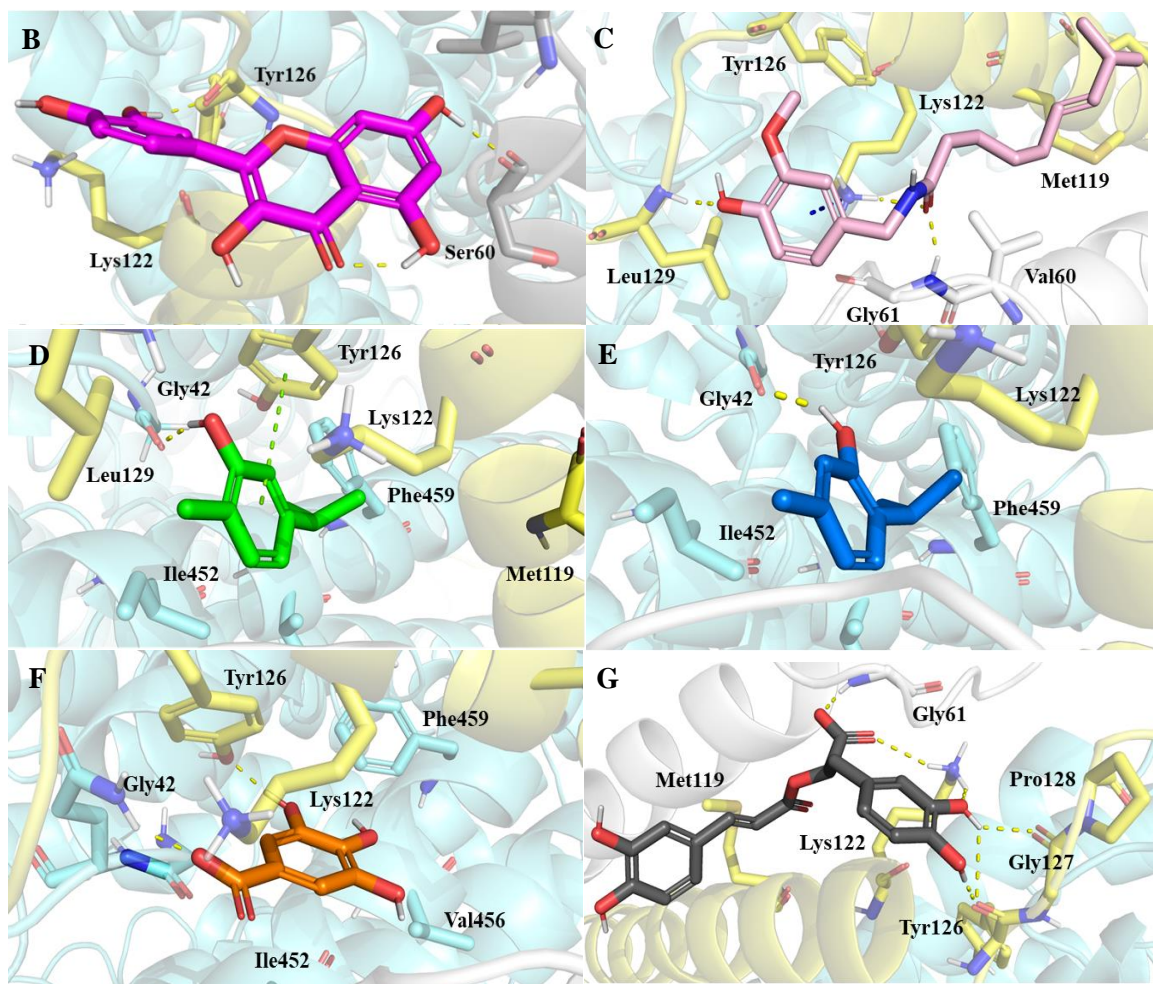


Figura 2. Mejores poses de acoplamiento obtenidas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo IV y el respectivo inhibidor reportado. A: clorpromazina, B: quercetina, C: Capsaicina, D: carvacrol, E: timol, F: Ácido gálico, G: Ácido rosmarinico. Los residuos estan coloreados de acuerdo con el tipo de átomo presente (carbono de la proteína, blanco; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco y azufre, amarillo). Las cadenas A,D,K y M estan coloreadas de azul, amarilli, gris y blanco respectivamente. Las interacciones presentes entre proteína-ligando se representan de la siguiente forma: los puentes de hidrogeno estan coloreados de amarillo, las interacciones π - π en color verde y las π -catión en azul.

De esta forma, los resultados del docking sugieren que los compuestos quercetina, capsaicina, carvacrol, timol, ácido gálico y el ácido rosmarinico pueden ser potenciales inhibidores del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, y pueden ser evaluados en la se *in vitro*. No obstante, factores como la disponibilidad comercial, y tiempos de importación dificultaron la evaluación de los compuestos capsaicina y ácido rosmarinico.

Finalmente, se seleccionaron para los ensayos experimentales la quercetina, el carvacrol, el ácido gálico y el timol, debido a que presentaron interacciones con los residuos aminoácidos presentes en el sitio de unión de la clorpromazina, y a sus valores obtenidos de energía de afinidad, docking score y propiedades ADME. Las estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo IV de la ETC se presentan en la **figura 3**.

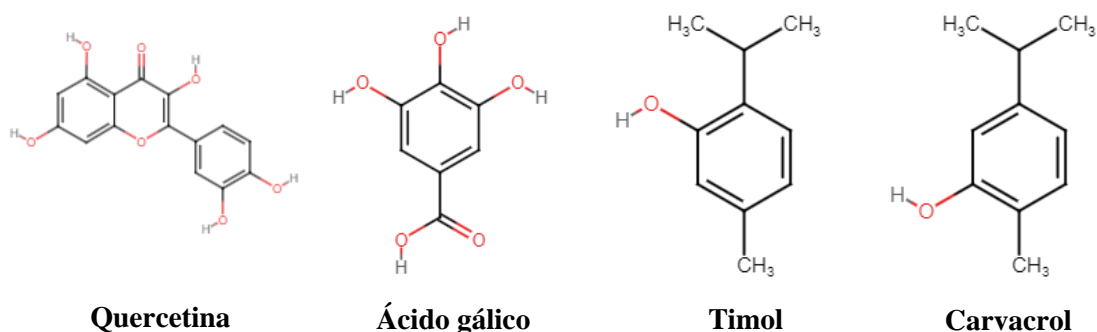


Figura 3. Estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

3 Conclusión

A partir de los resultados obtenidos del docking molecular, fue posible identificar los compuestos quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol como posibles inhibidores en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, debido a interacciones con los residuos reportados como importantes en el sitio de unión del inhibidor del complejo IV. Por lo que, estos compuestos fueron seleccionados para llevar a cabo ensayos de citotoxicidad sobre las células HeLa.

Por lo anterior, estos compuestos fueron seleccionados para llevar a cabo ensayos de citotoxicidad sobre las células HeLa.

CAPITULO 2: DETERMINACIÓN *in vitro* DE METABOLITOS PRESENTES EN PLANTAS NATURALES CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTICANCEROSA

A partir de los resultados obtenidos en la fase *in silico*, se seleccionó la quercetina, el carvacrol, el ácido gálico y el timol como los posibles inhibidores del complejo IV de la ETC, para luego evaluarlos en la fase *in vitro* mediante siguiente metodología.

1. Metodología fase *in vitro*

Con el fin de cumplir con los objetivos de evaluar la actividad citotóxica y el sinergismo entre los fármacos doxorubicina y oxaliplatino con los metabolitos previamente identificados en la línea celular HeLa, y segundo, determinar el efecto de la mezcla seleccionada con mejor efecto citotóxico sobre la respiración celular mitocondrial en la línea celular HeLa, se llevó a cabo la fase *in vitro* siguiendo el diagrama metodológico presente en la **figura 4**. Como primer paso, se cultivaron las células HeLa, para luego determinar el CC_{50} de los metabolitos seleccionados (quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol) y los fármacos (doxorubicina y oxaliplatino) a un tiempo de tratamiento de 48h sobre las células HeLa. Posteriormente, se llevaron a cabo combinaciones de metabolito-fármaco, con el fin de determinar su posible efecto sinérgico, para así, con la mejor mezcla obtenida determinar su efecto en la respiración celular.

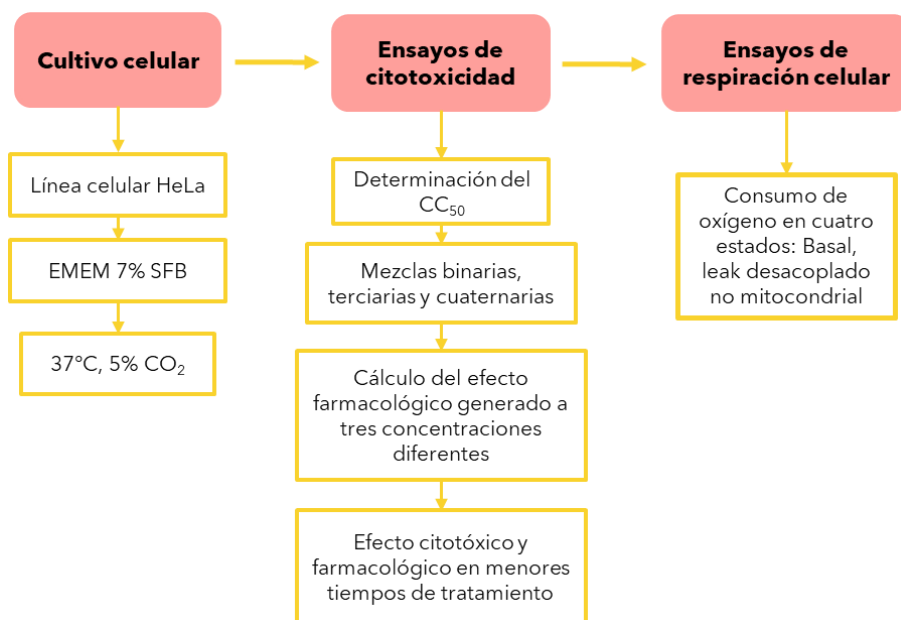


Figura 4. Diagrama metodológico fase in vitro.

1.1 Cultivo celular

Las células HeLa se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm², con medio EMEM a un pH de 7,3, suplementado con gentamicina (80 mg/mL) y 7% v/v de suero fetal bovino (SFB) manteniendo una temperatura de 37°C y una atmosfera de 5% de CO₂. Los subcultivos se llevaron a cabo empleando una solución de tripsina-EDTA a un pH de 7,3.

1.2 Evaluación de citotoxicidad

La viabilidad de la línea celular HeLa se evaluó a partir del método colorimétrico MTT (sal de bromuro de 3-4,5 dimetil-tiazol-2il-2,5-difeniltetrazolio) descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). Las células se sembraron en placas de 96 pozos (1x10⁴ células/pozo) y se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Pasado el tiempo de adherencia, se retiró el medio y se adicionaron las concentraciones establecidas para cada fármaco de referencia y metabolito a un tiempo de tratamiento de 48h inicialmente.

Luego del tiempo establecido, se descartó el sobrenadante de cada pozo, se agregaron 50 μ L de MTT (0,5mg/mL en solución salina de Hanks, HBSS) y se procedió a incubar durante 3h para la formación de los cristales de formazán. Pasado el tiempo de reacción, se retiró la solución MTT y se agregaron 100 μ L de DMSO, para de esta forma solubilizar los cristales formados por las células viables y metabólicamente activas, que redujeron la sal de tetrazolio (amarilla) y formaron cristales de formazán (violeta) solubles en DMSO, los cuales se cuantificaron a 570 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo.

Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad celular respecto al control, y se determinó el CC_{50} (concentración a la cual la viabilidad celular se disminuye un 50%) de cada metabolito y fármaco evaluado.

1.3 Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármacos de referencia para el tratamiento del adenocarcinoma de cuello uterino

Conociendo el CC_{50} a las 48h de tratamiento con cada compuesto, se realizaron ensayos de viabilidad celular a partir de mezclas binarias, terciarias y cuaternarias entre los metabolitos secundarios (carvacrol, timol, ácido gálico y quercetina) y los fármacos (doxorubicina, oxaliplatino y sorafenib), con el fin de analizar la posible interacción farmacológica generada, y tomando como referencia el esquema metodológico reportado por T. Chou (Chou, 2006).

Las combinaciones se llevaron a cabo manteniendo una relación de concentración equivalente entre los compuestos. Para el caso de las mezclas binarias se empleó el CC_{50} obtenido para cada compuesto; para las terciarias el 0,33 del CC_{50} y para las cuaternarias el 0,25 del CC_{50} , esto previendo un efecto aditivo y un porcentaje de viabilidad celular del 0%

después del tratamiento. Por lo que, las mezclas que presentaron un porcentaje de viabilidad mayor al 30% fueron descartadas para ensayos posteriores.

Con el fin de determinar el efecto sinérgico o antagonista generado en las mezclas metabolito-fármaco seleccionadas, se llevaron a cabo tres ensayos independientes a tres concentraciones diferentes, las cuales fueron el CC_{50} de los compuestos, el 0,5 del CC_{50} y el 0,25 del CC_{50} . Posteriormente, se realizaron ensayos de citotoxicidad a menores tiempos de tratamiento (12 y 24h) con las mezclas que presentaron efecto sinérgico o aditivo en al menos dos de las concentraciones evaluadas, para finalmente seleccionar la mezcla doxorubicina-carvacrol como la combinación que presentó los mejores resultados de sinergismo y porcentaje de viabilidad.

El efecto generado de las mezclas se calculó empleando la herramienta CompuSyn, para así determinar el índice de combinación (IC) y el índice de reducción de dosis (DRI – Dose Reduction Index). El IC permitió obtener cuantitativamente el grado de interacción farmacológica de las mezclas empleadas de metabolito-fármaco (R. Y. Huang et al., 2019), a partir de los rangos establecidos (IC<1 sinergismo, IC=1 efecto aditivo y IC>1 antagonismo). Por otra parte, el DRI indicó cuántas veces era posible reducir la dosis empleada para cada compuesto en la mezcla, con el fin de obtener un efecto que se pueda comparar con el generado por los compuestos individuales (Chou, 2006).

1.4 Efecto de la mejor mezcla seleccionada sobre la respiración de las células HeLa

Luego de seleccionar la mezcla que presentó el mejor efecto sobre la viabilidad celular y sinergismo, se evaluó el efecto sobre el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial.

Para esto, se sembraron 1×10^6 células en cajas Petri de 8,5 x 1,45 mm y se dejaron en un tiempo de incubación de 24 horas a 37°C , 5% CO_2 . Posteriormente, se expusieron las células a la menor concentración evaluada de la mezcla, correspondiente al 0,25 del CC_{50} de cada compuesto (doxorubicina $0,3875 \mu\text{M}$ y carvacrol $108 \mu\text{M}$) durante un tiempo de tratamiento de 48 horas. Luego, las células fueron aisladas con 1,5 mL de tripsina y resuspendidas en medio de cultivo ENEM, realizando el respectivo conteo y centrifugando la cantidad correspondiente a 600xg por 10 minutos, se tomaron 1×10^6 células para cada ensayo.

El consumo de oxígeno se determinó empleando un oxígrafo de alta resolución Oxygraph-2k (*O₂ Consumption - Oroboros Instruments, 2021*), compuesto por dos cámaras de oxígeno a 37°C bajo agitación constante. Para esto, se determinó el efecto inhibitor en cuatro estados, el basal, respiración en ausencia de inhibidores y/o desacopladores; el Leak, o respiración en presencia de oligomicina ($2 \mu\text{g/mL}$); el desacoplado, consumo de oxígeno en presencia del desacoplador FCCP ($4 \mu\text{M}$); y el estado de respiración no mitocondrial, consumo de oxígeno en presencia de rotenona ($1 \mu\text{M}$) y antimicina ($5,5 \mu\text{g/mL}$) (Meira et al., 2017). Los resultados se expresaron como la media del porcentaje de flujo de oxígeno por número de células ($\text{pmol O}_2/(\text{seg} * 1 \times 10^6 \text{ células}) \pm \text{DE}$).

1.5 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se llevaron a cabo al menos tres ensayos independientes, cada uno con tres replicas y fueron representados por la media. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el software GraphPad Prism 8 para Windows, llevando a cabo un análisis de varianza (ANOVA) en una vía y la prueba de comparaciones

múltiples, Tukey, la cual permitió determinar que los resultados con un valor de $p < 0.05$ eran estadísticamente significativos respecto al control. Las gráficas presentadas se obtuvieron de igual forma con el programa GraphPad (GraphPad, 2008)

2. Consideraciones éticas

2.1 Manejo de los residuos o desechos químicos

A partir del principio de no maleficencia y para evitar el impacto sobre el medio ambiente y la salud de los investigadores del presente proyecto, el manejo de los residuos biológicos y/o químicos que se generaron, fueron manipulados de acuerdo con el Manual de Gestión Integral de Residuos-2010 del Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia y los lineamientos del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR), órgano institucional que se encarga de velar por el cumplimiento de las normas legales para el manejo correcto de los residuos peligrosos llevando a cabo diversas estrategias preventivas.

La doxorubicina, el oxaliplatino y los colorantes usados en el proceso experimental del proyecto, se clasificaron como residuos químicos peligrosos, debido a la posibilidad de que sean citotóxicos y puedan afectar la salud tanto de los seres humanos como del medio ambiente. A partir del código de colores para el almacenamiento de sustancias, estos residuos se depositaron en bolsas rojas junto con etiquetas rotuladas como “riesgo químico”, para posteriormente entregar los residuos en la ruta de recolección y almacenamiento de residuos peligrosos organizada por PGIR en el parque tecnológico Guatiguará, diligenciando el formato FGA.06 para la respectiva disposición final a la empresa contratada, quienes realizarán la neutralización de los residuos y la incineración de estos. De igual forma, los residuos biosanitarios (botellas de cultivo, microplacas, etc) fueron clasificados como

residuos infecciosos o de riesgo biológico los cuales se desecharon en bolsas color rojo etiquetadas como “riesgo biológico”, esto según el acuerdo con el Manual de gestión integral de residuos.

Por otra parte, se implementaron insumos tales como guantes de látex y gafas de seguridad, como prevención hacia cualquier contacto con los compuestos utilizados en este proyecto de investigación, además de los implementos necesarios obligatorios para trabajar en el laboratorio, entre estos zapatos cerrados y bata de laboratorio.

2.2 Manejo de células

A partir de los principios establecidos en las normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC) (la Protección Social et al., 2009), el presente trabajo de grado correspondió a un estudio no clínico, por lo cual siguió las orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC. Se realizaron ensayos dosis respuesta en células cultivadas *in vitro*. Según la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del ministerio de salud de la república de Colombia, este trabajo de trabajo de grado se considera de no riesgo de acuerdo con el artículo 11 de esta última resolución (de Salud, 1993).

Adicionalmente, mediante ensayos dosis respuesta en células cultivadas *in vitro*, y siguiendo con los objetivos propuestos, en este trabajo de grado se identificaron metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencializan el efecto anticanceroso de fármacos utilizados en el cáncer de cuello uterino, impactando de forma favorable el tratamiento contra este cáncer. Las células empleadas fueron donadas por la Universidad Federal de Paraná (UFPR) al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) dirigido por la profesora de la escuela de química, Stelia Carolina Méndez Sánchez.

3. Resultados

3.1 Efecto de los metabolitos secundarios de plantas sobre la viabilidad celular en células HeLa.

Teniendo como selección los posibles inhibidores de la cadena respiratorio mitocondrial (timol, carvacrol, ácido gálico y quercetina), se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad sobre las células HeLa. El tiempo de tratamiento fue de 48h y se evaluó un rango de concentraciones entre 10-450 μ M para los metabolitos y 0,5-15 μ M para los fármacos de referencia, esto teniendo presente las concentraciones citotóxicas reportadas en la literatura. Como se observa en la **figura 5**, la viabilidad celular de las células HeLa disminuyó de forma dosis dependiente significativamente en tratamiento con los metabolitos quercetina, carvacrol, gálico y timol, y de igual forma, se observó disminución con los fármacos de referencia doxorrubicina y oxaliplatino.

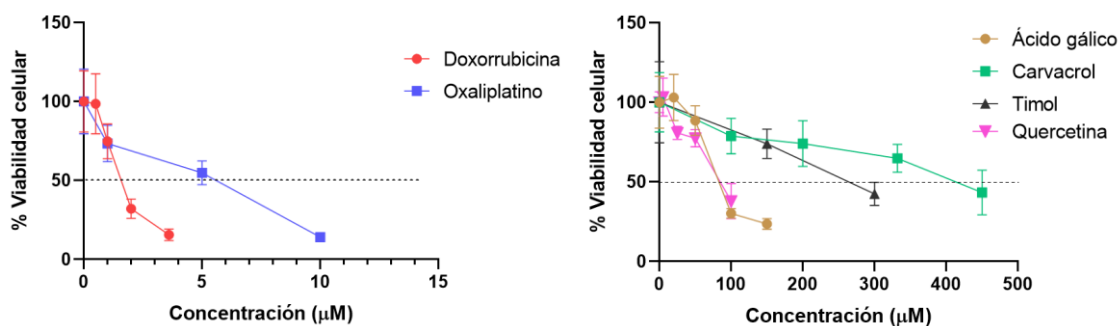


Figura 5. Porcentaje de viabilidad sobre las células HeLa vs concentración de los fármacos de referencia en el lado izquierdo y metabolitos secundarios seleccionados como posibles inhibidores de la ETC en el lado derecho, en un tiempo de tratamiento de 48h.

Como se observa en la **tabla 2**, a partir de los resultados obtenidos del efecto en la viabilidad celular a diferentes concentraciones, se determinó el CC₅₀ a las 48h de los

metabolitos carvacrol, ácido gálico, timol y quercetina, los cuales fueron 432, 87,5, 256,4 y 95 μ M, respectivamente. Así como para los fármacos doxorubicina y oxaliplatino se obtuvieron valores CC_{50} de 1,55 y 3,63 μ M, respectivamente.

Tabla 2. CC_{50} a las 48h de tratamiento sobre las células HeLa de cada fármaco de referencia y metabolito seleccionado.

METABOLITO /FÁRMACO	CC_{50} [μ M]
Carvacrol	432
Ácido gálico	87,52
Timol	256,4
Quercetina	95
Doxorrubicina	1,55
Oxaliplatino	3,63

A partir de los resultados obtenidos, se realizaron ensayos de citotoxicidad con el fin de determinar si la combinación de los metabolitos con los fármacos de referencia generaba un efecto sinérgico entre ellos.

3.2 Determinación de sinergismo entre metabolismo y fármacos de referencia.

Con el objetivo de determinar el tipo de interacción farmacológica generada entre los metabolitos (carvacrol, ácido gálico, timol y quercetina) y los fármacos (doxorubicina y oxaliplatino), se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad de 8 mezclas binarias, 12 terciarias y 8 cuaternarias entre los fármacos y los metabolitos, empleando un tiempo de tratamiento de 48h como se presenta en la **tabla 3**.

Tabla 3. Mezclas binarias, terciarias y cuaternarias realizadas entre los metabolitos carvacrol, ácido gálico, quercetina, timol y los fármacos doxorubicina y oxaliplatino.

Mezclas	Carvacrol	Ácido gálico	Timol	Quercetina	Doxorrubicina	Oxaliplatino
MEZCLAS BINARIAS						
D+C	X				X	
D+G		X			X	
D+T			X		X	
D+Q				X	X	
O+C	X					X
O+G		X				X
O+T			X			X
O+Q				X		X
MEZCLAS TERCIARIAS						
D+G+T		X	X		X	
D+T+C	X		X		X	
D+Q+T			X	X	X	
D+Q+C	X			X	X	
D+Q+G		X		X	X	
D+C+G	X	X			X	
O+G+T		X	X			X
O+T+C	X		X			X
O+Q+T			X	X		X
O+Q+C	X			X		X
O+Q+G		X		X		X
O+C+G	X	X				X
MEZCLAS CUATERNARIAS						
D+C+T+G	X	X	X		X	
D+C+Q+T	X		X	X	X	
D+C+G+Q	X	X		X	X	
D+Q+T+G		X	X	X	X	
O+C+T+G	X	X	X			X
O+C+Q+T	X		X	X		X
O+C+G+Q	X	X		X		X
O+Q+T+G		X	X	X		X

Nota: **D:** doxorubicina, **O:** oxaliplatino, **C:** carvacrol, **G:** ácido gálico, **Q:** quercetina y **T:** timol.

Cada mezcla se evaluó manteniendo una relación equivalente entre los compuestos, para las binarias se empleó el CC_{50} de cada compuesto, las terciarias el 0,33 del CC_{50} y las cuaternarias el 0,25 del CC_{50} (**tabla 4**). Estas concentraciones fueron seleccionadas con el fin de prever un posible efecto aditivo y un porcentaje de viabilidad del 0% después del tratamiento con las mezclas.

Tabla 4. Concentraciones empleadas en las mezclas entre los metabolitos carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol, y los fármacos doxorubicina y oxaliplatino.

	CONCENTRACIONES (μ M)		
	CC_{50}	0,33 CC_{50}	0,25 CC_{50}
Carvacrol	432	144	108
Ácido gálico	87,52	29,17	21,88
Timol	256,4	85,46	64
Quercetina	95	31,4	23,8
Doxorrubicina	1,55	0,516	0,3875
Oxaliplatino	3,63	1,21	0,9075

Como se puede observar en la **figura 6**, las mezclas binarias entre el fármaco doxorubicina con los metabolitos carvacrol, ácido gálico, timol y quercetina, y el fármaco oxaliplatino con el ácido gálico, lograron disminuir la viabilidad celular en más de un 50% respecto al control, lo cual nos da indicios de un posible efecto aditivo o sinérgico.

Por otra parte, las mezclas binarias de oxaliplatino con timol, carvacrol y quercetina generaron una disminución significativa respecto al control, no obstante, el porcentaje de

viabilidad celular fue mayor al 50%, presentando un posible efecto antagonista, razón por la cual se descartaron estas últimas mezclas para futuros ensayos.

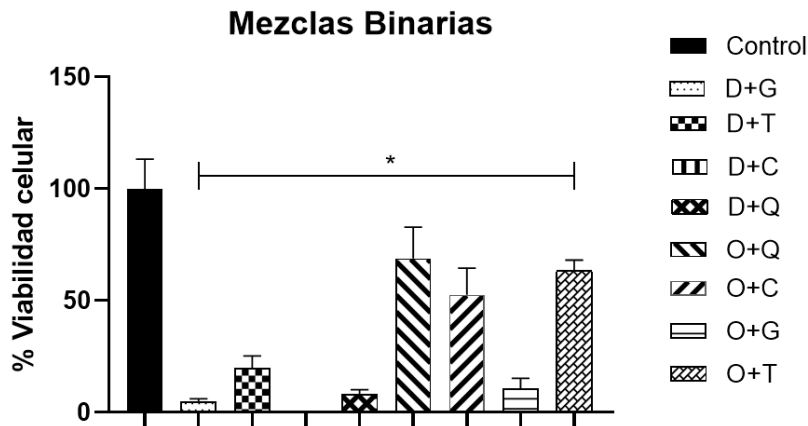


Figura 6. Mezclas binarias de los fármacos doxorubicina y oxaliplatino con los metabolitos seleccionados (carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol). Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada a partir del análisis ANOVA, utilizando la prueba de Tukey,

$*p < 0,05$.

Como se puede observar en la **figura 7**, las mezclas terciarias y cuaternarias presentaron un porcentaje de viabilidad mayor al 40%, lo cual nos permite suponer que la mezcla de dos o más metabolitos puede generar un efecto antagonista. Por esta razón, estas combinaciones fueron descartadas para los posteriores ensayos.

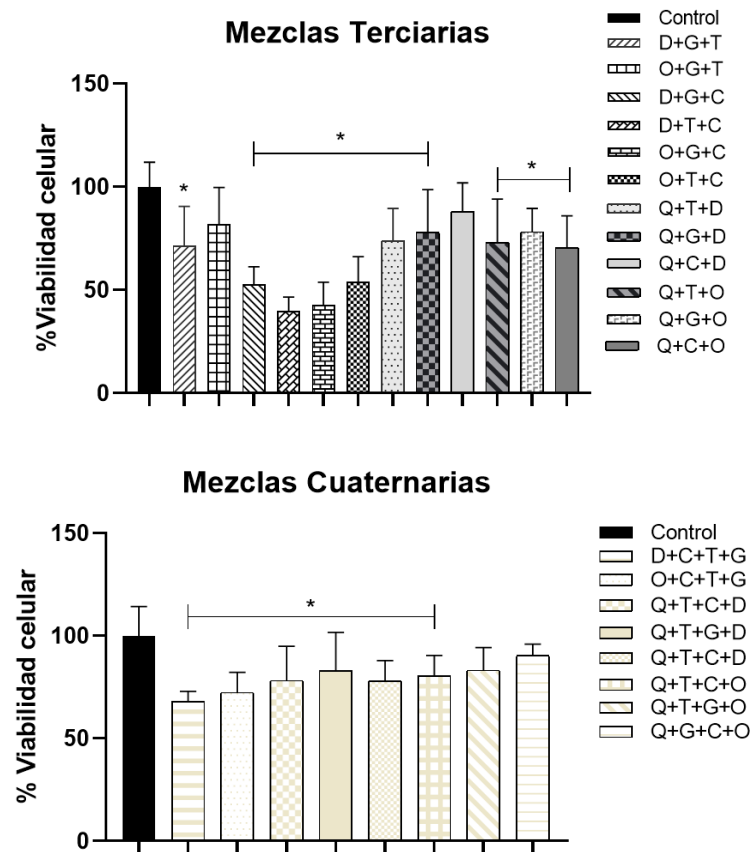


Figura 7. Mezclas terciarias y cuaternarias de los fármacos doxorubicina y oxaliplatino con los metabolitos seleccionados (carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol). Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada a partir del análisis ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, $*p < 0,05$.

Una vez identificadas las mezclas binarias que presentaron un posible efecto sinérgico (D+C, D+G, D+T, D+Q y O+G), se evaluó el efecto citotóxico de estas mezclas a concentraciones del CC_{50} , $0,5 CC_{50}$ y $0,25 CC_{50}$ de cada compuesto con el fin de obtener porcentajes de viabilidad del 0, 50 y 75% respectivamente, previendo un efecto aditivo. De

igual forma, se pretendía identificar la menor concentración en la que se generaran efectos estadísticamente significativos en la viabilidad celular (**figura 8**).

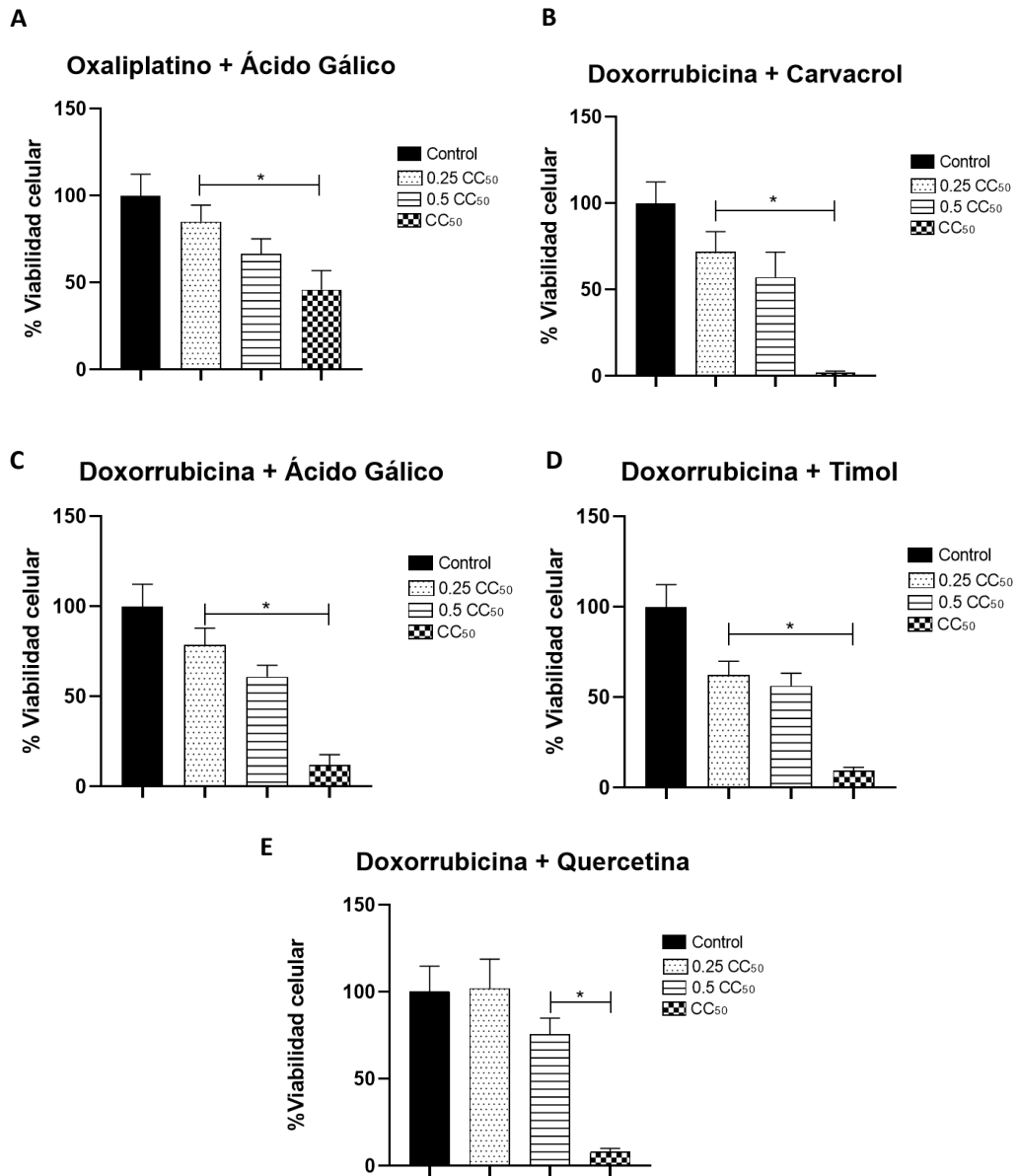


Figura 8. Mezclas binarias evaluadas en tres concentraciones diferentes. A: oxliplatino-gálico, B: doxorubicina-carvacrol, C: doxorubicina-ácido gálico, D: doxorubicina-timol y C: doxorubicina-quercetina. Los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación

*estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada a partir del análisis ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, * $p < 0,05$.*

Como se observa en la **figura 8**, todas las mezclas presentaron una diferencia significativa respecto al control en las tres concentraciones evaluadas, a excepción de la mezcla doxorubicina-quercetina en la concentración del 0,25 del CC_{50} . Por otro lado, de la **figura 8** también se puede inferir que las mezclas oxaliplatino-gálico, en las tres concentraciones evaluadas, y doxorubicina-quercetina, en las concentraciones del 0,5 y 0,25 del CC_{50} , posiblemente no generaron un efecto aditivo, debido a que los porcentajes de viabilidad que obtuvieron fueron mayores que los esperados (0% para el CC_{50} , 50% para el $0,5CC_{50}$ y 75% para el $0,25CC_{50}$).

Conociendo los valores de porcentaje de viabilidad se determinó la interacción farmacológica presente, a partir del software CompuSyn (Chou, 2006). Donde, se tuvieron en cuenta los rangos de Índice de Combinación (IC) descritos por Chou (IC<0.1, sinergismo muy fuerte; IC<0.3, sinergismo fuerte; IC<0.7, sinergismo, IC<0.85, sinergismo moderado; IC<0.9, sinergismo leve, IC<1.1, casi aditivo, IC>1,1 Antagonismo), además de calcular el DRI para cada mezcla, como se presenta en la **tabla 5**.

Tabla 5. *Valores obtenidos de porcentaje de viabilidad celular, índice de combinación (IC), tipo de interacción e índice de reducción de dosis (DRI) obtenidos para cada mezcla evaluada.*

Concentración (µM)	% viabilidad celular	IC	Tipo de sinergismo	DRI fármaco	DRI metabolito
Mezcla oxaliplatino-ácido gálico					
0,25CC ₅₀	85	1,865	Antagonismo	0,98	1,09
0,5CC ₅₀	66,6	2,87	Antagonismo	0,90	0,56
CC ₅₀	45,8	1,984	Antagonismo	0,69	2,34
Mezcla doxorubicina-ácido gálico					
0,25CC ₅₀	78,6	0,711	Sinergismo moderado	2,21	2,00
0,5CC ₅₀	60,9	1,071	Casi aditivo	1,94	1,79
CC ₅₀	11,9	0,952	Casi aditivo	2,91	2,71
Mezcla doxorubicina-timol					
0,25CC ₅₀	62,4	0,5865	Sinergismo	2,42	3,23
0,5CC ₅₀	56,3	1,0511	Casi aditivo	2,07	1,75
CC ₅₀	9,3	0,722	Sinergismo moderado	3,81	3,08
Mezcla doxorubicina-quercetina					
0,25CC ₅₀	90	1,178	ligero antagonismo	2,57	3,2
0,5CC ₅₀	75,3	1,477	Antagonismo fuerte	1,61	1,17
CC ₅₀	7,9	0,702	Sinergismo moderado	2,16	1,39
Mezcla doxorubicina-carvacrol					
0,25CC ₅₀	72,1	0,786	Sinergismo moderado	4,1	15,5
0,5CC ₅₀	49,8	1,109	Ligero antagonismo	2,05	1,60
CC ₅₀	2,1	0,324	Sinergismo fuerte	3,28	2,07

Como se puede observar en la **tabla 5**, la mezcla oxaliplatino y ácido gálico, a partir del IC determinado, presentó un efecto antagonista en las tres concentraciones evaluadas, por lo cual se descartó para futuros ensayos, de igual forma la mezcla doxorubicina-quercetina que presentó un antagonismo fuerte en la concentración del 0,5CC₅₀ y antagonismo leve en la concentración del 0,25CC₅₀.

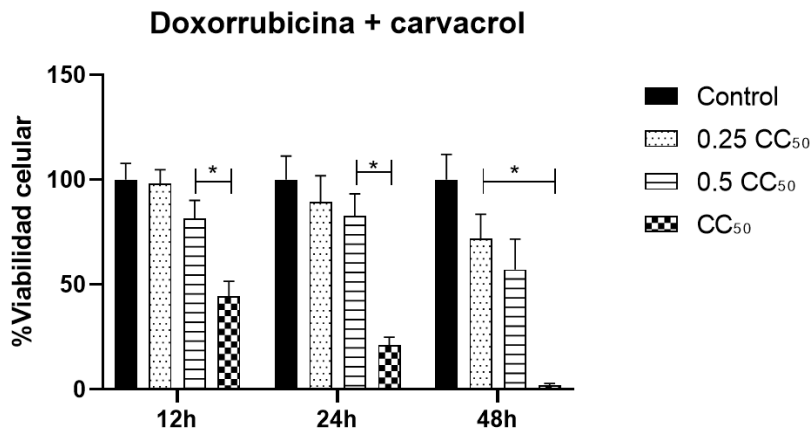
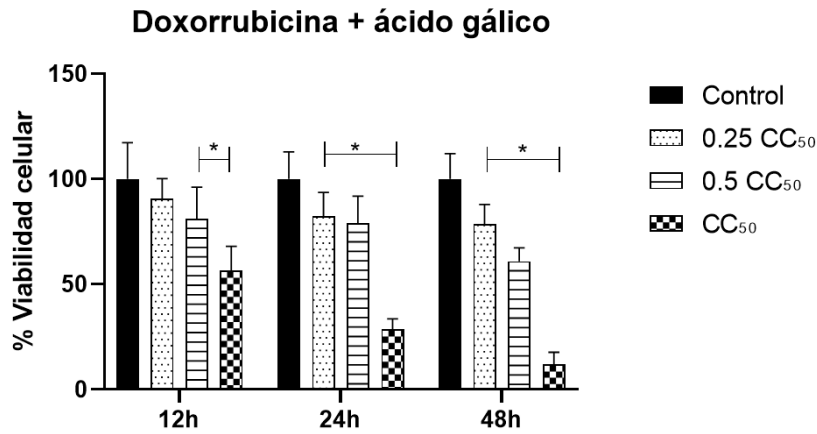
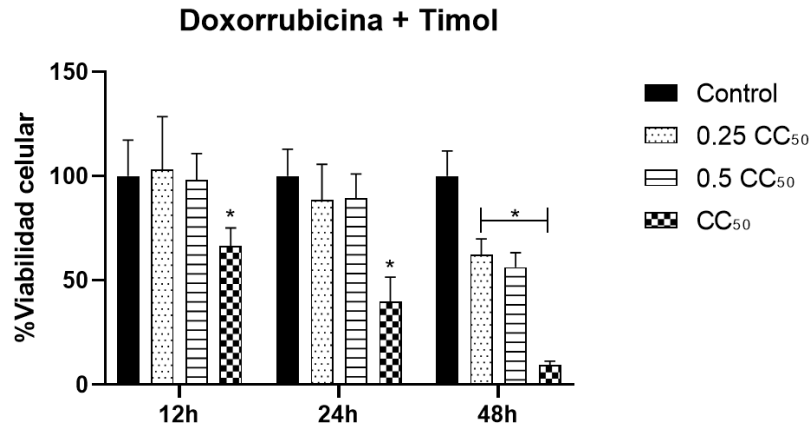
Por otro lado, la mezcla doxorubicina-carvacrol, presentó ligero antagonismo en la concentración del $0,5CC_{50}$, pero presentó un sinergismo fuerte y moderado en las concentraciones de CC_{50} y $0,25CC_{50}$ respectivamente. Además, según los valores obtenidos de DRI se destaca que, en esta mezcla (doxorubicina-carvacrol) a la concentración del $0,25CC_{50}$ se puede disminuir la dosis de doxorubicina hasta 4 veces y de carvacrol hasta 15 veces y seguir presentando un efecto sinérgico (**tabla 5**). Por lo que, fue seleccionada para futuros ensayos, junto con las mezclas de doxorubicina con ácido gálico y timol, que presentaron sinergismo en las tres concentraciones evaluadas.

A partir de los resultados de sinergismo y teniendo presente también los valores obtenidos de viabilidad celular, se evaluó el efecto citotóxico en las mezclas binarias seleccionadas a tres diferentes concentraciones y a tres tiempos (12, 24 y 48h), con el objetivo de analizar el efecto generado e identificar efectos estadísticamente significativos en el menor tiempo de tratamiento posible.

Como se observa en la **figura 9**, la mezcla doxorubicina-timol en menores tiempos evaluados solo presentó un efecto significativo en la concentración del CC_{50} , además de presentar antagonismo en las tres concentraciones evaluadas a 24 y 12 horas, según los resultados de índice de combinación obtenidos (Apéndice B), por lo que se descartó para los siguientes ensayos.

Por otro lado, la mezcla de doxorubicina-carvacrol y doxorubicina-ácido gálico presentaron efecto significativo desde las 12 horas respecto al control y un efecto antagonista en dos de las concentraciones evaluadas, (D-G: CC_{50} y $0,5CC_{50}$; D-C: $0,25CC_{50}$ $0,5CC_{50}$) a 12 y 24 horas (**Figura 9**) (Anexo C). Sin embargo, se seleccionó la mezcla doxorubicina-

carvacrol, debido a que su efecto citotóxico generado fue mayor y fue la única que presentó un sinergismo fuerte en la concentración del CC_{50} .



*Figura 9. Porcentaje de viabilidad sobre las células HeLa en tres concentraciones de las mezclas Doxorubicina-gálico, Doxorubicina-carva y Doxorubicina-Timol durante 12, 24, y 48 horas de tratamiento, obtenidos del ensayo MTT. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, $*p < 0,05$.*

Para evaluar el efecto de la mezcla doxorubicina-carvacrol sobre el transporte de electrones mitocondrial, se seleccionó la concentración de $0,25CC_{50}$ (Doxorubicina $0,3875\mu\text{M}$ y carvacrol $108\mu\text{M}$) a un tiempo de 48h, teniendo presente que a esta concentración y a ese tiempo se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 72%, un efecto sinérgico moderado y los valores más altos de DRI.

3.1 Acción de la mezcla entre el carvacrol y la doxorubicina sobre la respiración mitocondrial en las células HeLa.

A partir de ensayos de respiración mitocondrial, se evaluó el efecto de la mezcla doxorubicina-carvacrol sobre la fosforilación oxidativa, a una concentración de $0,25CC_{50}$ en un tiempo de tratamiento de 48h.

Para llevar a cabo estos ensayos, se midió la respiración celular a partir de cuatro estados, el basal que representa el consumo de oxígeno de las células bajo condiciones normales; el estado leak, que representa el cambio en la concentración de oxígeno al inhibir el complejo V o la ATPasa con oligomicina, donde se bloquea el paso de los protones a la matriz mitocondrial, generando una disminución en el consumo de oxígeno causada por el gran aumento en el potencial de membrana mitocondrial (Divakaruni et al., 2014); el estado

desacoplado, que representa la respuesta generada por las células cuando estas se exponen a el FCCP, el cual es un desacoplador que permite el paso de los protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, generando un consumo máximo de oxígeno por el complejo IV (Underwood et al., 2020). Y finalmente, el estado no-mitocondrial, que refleja el consumo de oxígeno de oxidasas no mitocondriales, a partir de la inhibición de la cadena de transporte de electrones mediante la rotenona (complejo I) y la antimicina A (complejo III) (Divakaruni et al., 2014).

Como se puede observar en la **figura 10**, al evaluar el efecto en el consumo de oxígeno generado por la mezcla doxorubicina-carvacrol a una concentración del $0,25CC_{50}$, se encontró que dicha mezcla generó una disminución significativa en el consumo de oxígeno del estado basal (27%), indicando una posible inhibición en el transporte de electrones en algún punto a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial. A su vez, estos resultados concuerdan con lo observado al evaluar el consumo de oxígeno en el estado desacoplado, debido a que se generó una disminución del 40% (**Figura 10C**), indicando esto que la mezcla disminuyó la capacidad de la cadena de electrones para operar en su máxima potencia como respuesta ante una la alta demanda energética. Demostrando que hay una falla en la fosforilación oxidativa.

Por otro lado, en el estado no mitocondrial no se presentó una disminución significativa en la tasa de consumo de oxígeno, indicando esto que la mezcla no afecta las oxidasas no mitocondriales, lo que confirma que la inhibición de la mezcla es hacia la respiración mitocondrial.

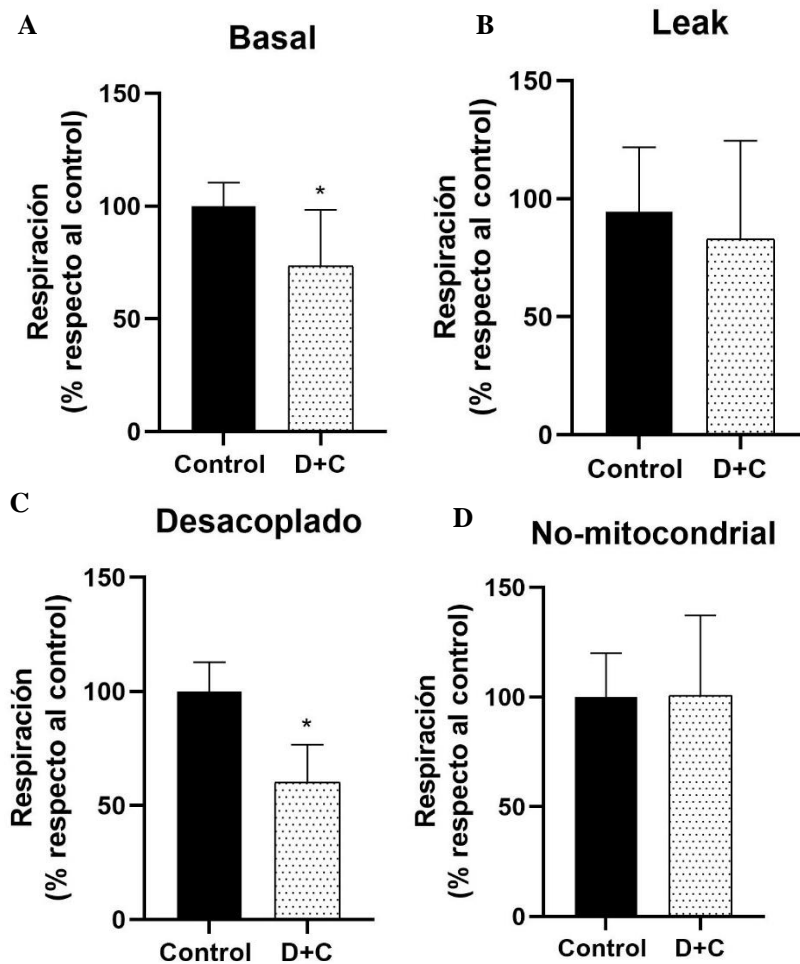


Figura 10. Efecto de la mezcla doxorubicina-carvacrol sobre las células HeLa luego de 48 horas de tratamiento. Los resultados corresponden a cuatro ensayos independientes con dos réplicas, están expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante la prueba de Student, $*p < 0,05$. El 100% de la respiración de cada estado corresponde a: basal, $73,420 \text{ pmolO}_2/\text{seg} \cdot 1 \times 10^6 \text{ células}$; Leak, $90,8 \text{ pmolO}_2/\text{seg} \cdot 1 \times 10^6 \text{ células}$; Desacoplado, $60,1 \text{ pmolO}_2/\text{seg} \cdot 1 \times 10^6 \text{ células}$; respiración no mitocondrial, $100,8 \text{ pmolO}_2/\text{seg} \cdot 1 \times 10^6 \text{ células}$.

A partir de lo anterior, se puede inferir que la razón por la cual la mezcla doxorubicina-carvacrol disminuye la viabilidad de las células HeLa es producto de la inhibición de esta sobre la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Conclusiones

- A partir de los resultados de acoplamiento molecular se identificaron los metabolitos quercetina, ácido gálico, carvacrol y timol como posibles inhibidores del complejo IV la cadena de transporte de electrones mitocondrial, debido a criterios como la energía de afinidad y a las interacciones con residuos de la subunidad 1 y 4 identificados como importantes en el sitio de unión del inhibidor clorpromazina.
- Se identificó efecto sinérgico fuerte entre la mezcla doxorubicina y carvacrol a concentraciones de 1,55 y 432 μM respectivamente.
- A partir de los ensayos de citotoxicidad realizados sobre las células HeLa, se demostró que la combinación de más de dos compuestos no es efectiva, debido a que el efecto citotóxico producido es bajo y no se presenta un efecto sinérgico ni aditivo.
- La mezcla doxorubicina/carvacrol afecta la viabilidad de las células HeLa, debido a la disminución de dos estados (basal y desacoplado) de la respiración celular, posiblemente como consecuencia de una inhibición sobre uno de los complejos de la cadena de transporte mitocondrial.

Recomendaciones

Con el objetivo de continuar en la búsqueda y estudio del mecanismo de acción de la mezcla doxorubicina-carvacrol, se plantean las siguientes recomendaciones:

- Evaluar el efecto citotóxico de la mezcla sobre una línea no tumoral, con el fin de determinar si la mezcla presenta algún tipo de selectividad entre los dos tipos de células.
- Realizar ensayos de respiración celular en la línea HeLa, permeabilizando la membrana con digitonina, para así estudiar la actividad compleja por complejo y determinar en qué parte de la ETC se genera la inhibición o el daño producido por la mezcla.
- De igual forma se recomienda evaluar el efecto en la respiración celular de la mezcla doxorubicina-ácido gálico, debido al efecto citotóxico y sinérgico generado.

Agradecimientos

- Agradecimientos a la vicerrectoría de investigación y extensión (VIE-UIS). Proyecto de investigación "Búsqueda de compuestos de origen natural con efecto sinérgico para el tratamiento de cáncer de mama, cérvix e hígado, usando la mitocondria como diana farmacológica", con código 3705
- Agradecimientos a Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50, proyecto 11: "Desarrollo de nuevos productos con actividades antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas".

Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo de grado fueron presentados en modalidad poster el año 2021 en el Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular (C2B2) (Apéndice C).

Apéndices

Apéndice A. Base de datos de los metabolitos secundarios con actividad anticancerosa y algunos de los resultados de las propiedades ADME.

Pubchem ID	Nombre	Reglas de Lipinski				Caco-2 [nm/sec]	MDCK [nm/sec]
		PM [g/mol]	Log P O/A	DH	AH		
12306056	Δ -Amorfeno	204,36	5,55	0	0	9906	5899
442831	1-Acetoxipinoresinol	416,43	2,65	2	8	541	254
6429274	2-epi-trans- β -Cariofileno	204,36	-0,24	0	0	9906	5899
6429376	4,5-di-epi-Aristolecheno	204,36	5,41	0	0	9906	5899
527113	6,9-guayadieno	204,36	5,26	0	0	9906	5899
5280442	Acetina	284,27	0,09	2	6	615	292
158003	Acalifina	360,32	-2,45	5	16	19	6
80792	Acetato de carvacrilo	192,26	2,84	0	3	4238	2356
1549026	Acetato de geranilo	196,29	2,01	0	3	4841	2720
64971	Ácido betulínico	456,71	6,24	2	4	274	155
689043	Ácido cafeico	180,16	-0,67	3	3	184	79
1794427	Ácido clorogénico	354,31	-1,88	6	10	50	19
5281855	Ácido elágico	302,20	-1,81	0	6	33	12
370	Ácido gálico	170,12	-0,55	1	2	106	43
10494	Ácido oleanólico	456,71	6,30	2	4	327	187
382831	Ácido pomólico	472,71	5,69	3	4	247	139
72	Ácido protocatequico	154,12	-0,45	1	2	246	108
5281792	Ácido rosmarínico	360,32	1,21	5	7	1	0
8742	Ácido shikímico	174,15	-1,21	3	5	141	59
10742	Ácido siríngico	198,18	0,45	2	4	725	349
64945	Ácido ursólico	456,71	6,20	2	4	320	184
9215	Acridina	179,22	2,06	0	1	8015	4692
5386591	Ajoene	234,39	1,92	2	3	218	5791
2537	Alcanfor	152,24	1,94	0	2	3958	2188
65036	Alicina	162,26	1,66	1	1	5668	4607

42608158	Alo-Aromadendreno	204,36	5,01	0	0	9906	5899
10207	Aloe-emodina	270,24	0,14	2	6	430	199
5281600	Amentoflavona	538,47	2,78	4	8	2	0
5318517	Andrografólido	350,45	1,49	3	8	245	108
5280443	Apigenina	270,24	0,10	1	4	210	91
440936	Arbutina	272,25	-1,05	5	10	69	27
91354	Aromadendreno	204,36	5,18	0	0	9906	5899
6917864	Artesunato	384,43	2,60	1	8	65	33
1550607	Aurapteno	298,38	2,55	0	4	1677	865
5281303	Azadiractina	720,72	1,27	3	19	259	115
12308714	Azadiradiona	450,57	4,17	0	7	734	354
10906239	Azadirona	436,59	5,41	0	5	1924	1003
5281605	Baicaleína	270,24	0,54	1	3	194	84
10337211	Bavachinina	338,40	2,77	1	4	1412	718
21159022	Biciclogermacreno	204,36	5,23	0	0	9906	5899
5280373	Biocanina A	284,27	0,45	2	6	1370	695
73384	Brasilín	286,28	1,30	4	4	137	57
24360	Camptotecina	348,36	1,74	1	8	446	206
6616	Canfeno	136,24	3,35	0	0	9906	5899
1548943	Capsaicina	305,42	3,76	2	2	1860	967
10364	Carvacrol	150,22	3,30	1	1	3687	2027
73160	Catequina	290,27	1,39	2	2	107	44
122724	Celastrol	450,62	5,06	2	5	73	37
119093	Cinaropicrina	346,38	1,88	1	7	224	98
188323	Cirsimaritina	314,29	0,04	3	6	322	145
5284371	Codeína	299,37	1,15	1	5	885	479
6167	Colchicina	399,44	1,02	7	8	1801	934
5351344	Combretastatina	316,35	4,05	1	4	3663	2012
5281437	Costunolida	232,32	2,71	0	3	2412	1281
5281607	Crisina	254,24	0,24	1	4	615	292
5281232	Crocetina	328,41	2,71	2	5	279	124
117443	Cubebina	356,37	-0,08	2	6	9906	5899
5281321	Curcubitacina	514,66	2,94	4	10	74	29
969516	Curcumina	368,39	1,28	2	6	529	249
107935	Deguelin	394,42	4,15	0	6	4881	2745
5281708	Diadzeína	254,24	0,11	2	6	842	410
101300	Dicentrina	339,39	1,51	6	4	7805	4559
456410	Dihidroartemisinina	284,35	2,01	1	6	2743	1472
3213	Elipticina	246,31	2,93	1	2	3619	1986
3220	Emodina	270,24	0,13	1	4	340	154

1203	Epicatequina	290,27	1,39	2	2	107	44
637122	Epigallocatequina	592,51	-0,37	10	12	0	0
163263	Esclareol	308,50	5,01	2	2	3034	1642
522266	Espatulenol	220,35	3,95	1	1	5320	3013
8815	Estragol	148,20	1,43	1	1	9906	5899
36462	Etoposido	588,56	0,61	3	17	200	87
5281614	Fisetina	286,24	0,52	1	4	152	64
5459219	Flavopiridol	401,85	2,54	2	7	87	74
5280378	Formonetol	268,27	0,49	2	6	2463	1311
5281616	Galangin	270,24	0,58	1	4	398	182
65064	Galato de epigallocatequina	458,38	2,72	1	2	13	4
3458	Gedunín	482,57	2,78	0	10	745	360
5280961	Genisteína	270,24	0,05	2	5	468	218
5373727	Germacreno D	204,36	5,14	0	0	9906	5899
442793	Gingerol	294,39	2,66	2	4	1430	728
16754	Glaucina	355,43	3,76	0	5	2244	1311
3495	Glicirricina	822,94	1,94	6	21	0	0
45382232	Gnetol	244,25	0,45	4	3	289	129
5280953	Harmine	212,25	1,60	2	3	5309	3006
72343	Hernandezina	652,79	6,25	0	9	514	295
72281	Hesperetina	302,28	0,50	2	4	313	141
82755	Hidroxitirosol	154,17	-0,08	3	3	533	250
10177	Indirrubina	262,27	1,60	1	1	1766	914
3712	Indol-3-Carbinol	147,18	0,96	2	2	2557	1368
442042	Ingenol	348,44	1,48	4	8	338	153
60838	Irinotecan	586,69	3,42	1	13	59	25
8405	Isoquinolina	129,16	1,18	0	1	6055	3465
5281654	Isorhamnetin	316,27	0,63	2	5	211	92
10098	Jervina	425,61	4,15	2	6	344	172
3806	Juglone	174,16	-0,41	0	4	1217	612
5280863	Kaempferol	286,24	0,41	1	4	136	57
22311	Limoneno	136,24	4,00	0	0	9906	5899
6549	Linalool	154,25	3,14	1	1	5250	2970
5281243	Luteína	568,88	10,67	2	3	1129	564
5280445	Luteolina	286,24	0,02	1	4	90	37
375151	Mahanine	347,46	5,50	2	2	2034	1066
16666	Mentol	156,27	2,77	1	2	4139	2297
31253	Mirceno	136,24	4,23	0	0	9906	5899
5281672	Miricetina	318,24	0,58	1	4	39	15

5288826	Morfina	285,34	0,90	2	5	280	138
439246	Naringenina	272,26	0,62	1	3	283	126
5284507	Nerolidol	222,37	4,91	1	1	5263	2978
14865499	Niazirina	279,29	0,05	3	9	166	71
100017	Nimbolida	466,53	2,26	0	9	708	340
72344	Nobiletina	402,40	3,62	0	7	3793	2090
275196	Noscapina	413,43	0,50	7	8	3891	2148
5320315	Oroxilina A	284,27	0,30	2	5	664	318
1742210	Óxido de cariofileno	220,35	2,49	0	2	9906	5899
16760674	Paclitaxel	853,92	4,72	3	18	57	22
110745	Palustrol	222,37	3,85	1	1	5098	2877
94378	Parodol	278,39	3,38	1	3	1984	1037
7463	<i>p</i> -Cimeno	134,22	3,67	0	0	9906	5899
667639	Piceatannol	244,25	-0,28	4	3	170	73
130796	Picrocrocina	330,38	-0,61	4	12	97	40
638024	Piperina	285,34	1,26	1	4	5419	3073
6987	Piperitona	152,24	2,18	0	2	4036	2235
10205	Plumbagina	188,18	0,14	0	3	1434	730
6430773	<i>p-ment-3-en-8-ol</i>	168,28	2,71	1	2	3914	2162
5281727	Pterostilbeno	256,30	1,41	3	3	3386	1848
5281807	Puerarin	416,38	-1,37	6	11	113	46
92793	Pulegol	154,25	2,39	1	2	4774	2680
442495	Pulegona	152,24	2,23	0	2	4304	2396
442985	Purapuridina (Solasodina)	413,64	5,31	2	3	734	391
5280343	Quercetina	302,24	0,41	1	4	58	23
7047	Quinolina	129,16	1,25	0	1	6966	4032
160355	Roscovitina	354,45	3,18	6	2	2777	1492
18818	Sabineno	136,24	3,81	0	0	9906	5899
10359290	Salvicina	330,42	2,88	2	6	787	382
128563	Salvinorina A	432,47	2,10	0	10	439	203
198016	Saponina	1223,3 6	5,497 M	15	45	0	0
5281697	Scutellarein	286,24	-0,10	2	4	66	26
479503	Shikonin	288,30	1,01	1	5	581	275
5281794	Shogaol	276,38	2,96	1	3	1992	1042
11787114	Silvestrol	654,67	3,55	3	15	249	110
656568	Sinalbina	425,43	-1,56	6	15	0	0
6911854	Sinigrina	359,37	-1,40	5	14	5	2
73611	Solamargina	868,07	0,46	9	26	2	1
5477212	Solanesol	631,08	12,18	2	2	3605	1978

5350	Sulforafano	177,28	0,44	4	5	52	1928
1548887	Sulindac	356,41	3,42	1	6	5	180
68077	Tangeretina	372,37	3,58	0	6	3811	2101
114917	Tanshinone I	276,29	1,19	0	6	3866	2134
10094536 7	Tearubigina	902,73	0,41	12	19	0	0
34698	Teniposido	656,66	1,97	3	17	207	154
73078	Tetrandrina	622,76	6,33	0	8	520	299
6989	Timol	150,22	3,30	1	1	3816	2104
10281	Timoquinona	164,20	0,75	0	4	1020	505
5513	Tomatina	1034,2 0	- 3,006 M	13	36	0	0
60700	Topotecan	421,45	1,88	2	9	57	25
5284507	<i>trans</i> -Nerolidol	222,37	4,91	1	1	5263	2978
13342	Vinblastina	810,99	5,94	2	12	10	4
5978	Vincristina	824,97	4,94	2	14	13	5
10629256	Vinflunina	816,94	6,53	1	12	13	14
5311497	Vinorelbina	778,94	6,14	1	12	13	6
5281703	Wogonina	284,27	0,55	2	5	604	287
639665	Xantohumol	354,40	2,84	2	3	752	363
31211	Zingerona	194,23	1,03	1	3	1691	873
12306048	α -Cadineno	204,36	5,60	0	0	9906	5899
10398656	α -Cadinol	222,37	4,03	1	1	4542	2539
19725	α -Copaeno	204,36	5,97	0	0	9906	5899
16213731	α -Gurjuneno	204,36	5,24	0	0	9906	5899
24798693	α -Humuleno	204,36	5,48	0	0	9906	5899
6654	α -pineno	136,24	5,28	0	0	9906	5899
7462	α -Terpineno	136,24	4,03	0	0	9906	5899
17868	α -Tujeno	136,24	3,89	0	0	9906	5899
62566	β -Borboneno	204,36	5,22	0	0	9906	5899
91754007	β -Citronelol	302,28	5,20	0	2	4123	10000
6918391	β -Elemeno	204,36	5,71	0	0	9906	5899
91457	β -Eudesmol	222,37	4,01	1	1	4881	2745
11142	β -Felandreno	136,24	3,97	0	0	9906	5899
15560252	β -Guaieno	204,36	5,80	0	0	9906	5899
31411	β -Narcotina	413,43	0,50	7	8	3891	2148
14896	β -pineno	136,24	4,42	0	0	9906	5899
442393	β -Selineno	204,36	5,38	0	0	9906	5899
222284	β -Sitosterol	414,71	7,62	1	2	3381	1846
6432005	γ -Eudesmol	222,37	4,06	1	1	5087	2870

12313020	γ -Muuroleno	204,36	5,60	0	0	9906	5899
7461	γ -Terpineno	136,24	4,10	0	0	9906	5899
441005	Δ -Cadineno	204,36	5,55	0	0	9906	5899
26049	Δ -careno	136,24	3,90	0	0	9906	5899

Apéndice B. Resultados de índice de combinación a las 12 y 24 horas de tratamiento con las mezclas de doxorubicina con los metabolitos carvacrol, ácido gálico y timol.

Concentración (μ M)	% viabilidad celular	IC	Tipo de sinergismo	DRI fármaco	DRI metabolito
Mezcla doxorubicina-carvacrol					
Tiempo: 12h					
0,25CC ₅₀	98,5	5,020	Antagonismo	1,1	0,24
0,5CC ₅₀	81,6	2,011	Antagonismo	1,37	0,72
CC ₅₀	44	1,071	Casi aditivo	1,21	1,13
Tiempo: 24h					
0,25CC ₅₀	89,4	1,550	Antagonismo	1,76	2,34
0,5CC ₅₀	82	2,130	Antagonismo	1,35	0,71
CC ₅₀	21	0,990	Casi aditivo	1,76	2,3
Mezcla doxorubicina-ácido gálico					
Tiempo: 12h					
0,25CC ₅₀	90,6	0,98	Casi aditivo	2,11	1,97
0,5CC ₅₀	81,1	14,98	Antagonismo	1,38	1,28
CC ₅₀	56,4	2,01	Antagonismo	1,03	0,95
Tiempo: 24h					
0,25CC ₅₀	82,3	0,77	Casi aditivo	2,69	2,5
0,5CC ₅₀	79,2	1,44	Antagonismo	1,44	1,33
CC ₅₀	28	1,36	Antagonismo	1,54	1,41
Mezcla doxorubicina-timol					
Tiempo: 12h					
0,25CC ₅₀	99	10,97	Antagonismo	0,89	0,7
0,5CC ₅₀	98	5,33	Antagonismo	0,61	0,27
CC ₅₀	66,6	2,54	Antagonismo	0,45	0,11
Tiempo: 24h					
0,25CC ₅₀	88	1,57	Antagonismo	1,29	1,23
0,5CC ₅₀	89	2,35	Antagonismo	1,12	0,68

CC ₅₀	39,8	1,16	Antagonismo	2,26	1,38
------------------	------	------	-------------	------	------

Apéndice B. Certificado de participación en el 34° Congreso latinoamericano de Química



El comité científico del 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2.

Certifican que el trabajo titulado:

“IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN PLANTAS MEDICINALES COMO ADYUVANTES EN EL TRATAMIENTO CONTRA EL ADENOCARCINOMA DE CÉRVIX MEDIANTE ESTUDIOS IN SILICO EMPLEANDO COMO DIANA FARMACOLÓGICA LA MITOCONDRIA.”

Fue presentado por: Andrea Otero Mojica, Luis Carlos Vesga Gamboa, Stelia Carolina Mendez Sanchez

Presentado en modalidad póster

En el marco del 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020. Llevado a cabo en la ciudad de Cartagena, Colombia del 11 al 15 de octubre de 2021.


 Dr. Harold Ardila
 Presidente Comité organizador


 Dra. Elena Stashenko
 Presidente Comité Científico
 CLAQ 2020, XVIII COLACRO, X COCOCRO, II SPAE


 Dra. Maricela Viola
 Presidente Comité Científico IV C2B2

Referencias bibliográficas

- Aborehab, N. M., & Osama, N. (2019). *Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells*.
<https://doi.org/10.1186/s12935-019-0868-0>
- Ahmad, A., & Ansari, I. A. (2021). Carvacrol Exhibits Chemopreventive Potential against Cervical Cancer Cells via Caspase-Dependent Apoptosis and Abrogation of Cell Cycle Progression. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(16), 2224–2235.
<https://doi.org/10.2174/1871520621999201230201258>
- Ahmad, W., Ansari, M. A., Alsayari, A., Almaghaslah, D., Wahab, S., Alomary, M. N., Jamal, Q. M. S., Khan, F. A., Ali, A., Alam, P., & Elderderly, A. Y. (2022). In Vitro, Molecular Docking and In Silico ADME/Tox Studies of Emodin and Chrysophanol against Human Colorectal and Cervical Carcinoma. *Pharmaceuticals 2022, Vol. 15, Page 1348*, 15(11), 1348. <https://doi.org/10.3390/PH15111348>
- American Cancer Society. (2021). *Causas, factores de riesgo y prevención*.
- Aparoy, P., Kumar Reddy, K., & Reddanna, P. (2012). Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5- LOX Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 19(22), 3763–3778. <https://doi.org/10.2174/092986712801661112>
- Banerjee, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., Lillard, J. W., & Singh, R. (2017). Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 9(2), 235–245.
<https://doi.org/10.2741/E798/PDF>

- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a019505.
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019505>
- Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2021). Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 155(S1), 28–44. <https://doi.org/10.1002/IJGO.13865>
- Cai, G., Lin, F., Wu, D., Lin, C., Chen, H., Wei, Y., Weng, H., Chen, Z., Wu, M., Huang, E., Ye, Z., & Ye, Q. (2022). Rosmarinic Acid Inhibits Mitochondrial Damage by Alleviating Unfolded Protein Response. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1529.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.859978/BIBTEX>
- Cardol, P., Figueroa, F., Remacle, C., Franzén, L. G., & González-Halphen, D. (2009). Oxidative Phosphorylation: Building Blocks and Related Components. *The Chlamydomonas Sourcebook 3-Vol Set*, 2, 469–502. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00021-6>
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.10>
- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*, 25(Suppl. 2), 41–59. <https://doi.org/10.1159/000443404>

Dai, Z., Ramesh, V., & Locasale, J. W. (2020). *The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0270-8>

de Salud, M. (1993). *Hoja 1 de 1*.

del Rio, A., & Varchi, G. (2016). Molecular Design of Compounds Targeting Histone Methyltransferases. *Epi-Informatics: Discovery and Development of Small Molecule Epigenetic Drugs and Probes*, 257–272. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802808-7.00009-5>

Divakaruni, A. S., Rogers, G. W., & Murphy, A. N. (2014). Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Current Protocols in Toxicology*, 60(1), 25.2.1-25.2.16. <https://doi.org/10.1002/0471140856.TX2502S60>

Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy*. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>

GLOBOCAN. (2020). *Cervical cancer elimination | UICC*. <https://www.uicc.org/what-we-do/thematic-areas-work/cervical-cancer-elimination>

Gonzalo, V., Castellví-Bel, S., Balaguer, F., Pellisé, M., Ocaña, T., & Castells, A. (2008). Epigenética del cáncer. *Gastroenterología y Hepatología*, 31(1), 37–45. <https://doi.org/10.1157/13114573>

GraphPad. (2008). *GraphPad*. www.graphpad.com

Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. In *Proteins: Structure, Function and Genetics* (Vol. 47, Issue 4, pp. 409–443).
<https://doi.org/10.1002/prot.10115>

Han, Y., Ma, L., Zhao, L., Feng, W., & Zheng, X. (2019). Rosmarinic inhibits cell proliferation, invasion and migration via up-regulating miR-506 and suppressing MMP2/16 expression in pancreatic cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *115*, 108878. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108878>

He, C., Lu, X., Li, J., Shen, K., Bai, Y., Li, Y., Luan, H., & Tuo, S. (2021). The effect of quercetin on cervical cancer cells as determined by inducing tumor endoplasmic reticulum stress and apoptosis and its mechanism of action. *Am J Transl Res*, *13*(5), 5240–5247. www.ajtr.org

Huang, M., Lu, J. J., & Ding, J. (2021). Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Natural Products and Bioprospecting*, *11*(1), 5–13.
<https://doi.org/10.1007/S13659-020-00293-7/FIGURES/4>

Huang, R. Y., Pei, L., Liu, Q., Chen, S., Dou, H., Shu, G., Yuan, Z. X., Lin, J., Peng, G., Zhang, W., & Fu, H. (2019). Isobologram analysis: A comprehensive review of methodology and current research. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(OCT), 1222.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.01222/BIBTEX>

- Islam, M. T., Khalipha, A. B. R., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S. Z., Uddin, S. J., Shilpi, J. A., & Rouf, R. (2019). Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life*, *71*(1), 9–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.1935>
- Jaudan, A., Sharma, S., Abd Malek, S. N., & Dixit, A. (2018). Induction of apoptosis by pinostrobin in human cervical cancer cells: Possible mechanism of action. *PLoS ONE*, *13*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191523>
- Jeena, M. T., Kim, S., Jin, S., & Ryu, J.-H. (2019). *cancers Recent Progress in Mitochondria-Targeted Drug and Drug-Free Agents for Cancer Therapy*. <https://doi.org/10.3390/cancers12010004>
- la Protección Social, M. de, Isabel Rodríguez Serrano, C., Cecilia Rodríguez Ramírez, M., Graciela Criado Aussant Subdirectora de Alimentos Bebidas Alcohólicas Laura Pasculli Henao Secretaria General, A., Oficina Asesora Jurídica Aura Yineth Correa Niño, J., Carolina Sierra Arias, A., Constanza García Ramírez, N., Tobos Otálora Paola Vitery Ortíz Adriana Vanegas Sánchez, J., & Huertas Molina Silvia Blanco Díaz Diseño diagramación Bernardo Arias Blanco, T. (2009). *Buenas Prácticas Clínicas*. www.digitosydisenos.com
- Li, Y., Park, J.-S., Deng, J.-H., & Bai, Y. (2006). *Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex*.
- LigPrep, Schrödinger, & LLC, N. Y. N. (2021). *Schrödinger Release 2022-4:*

- Lin, S. R., Chang, C. H., Hsu, C. F., Tsai, M. J., Cheng, H., Leong, M. K., Sung, P. J., Chen, J. C., & Weng, C. F. (2020). Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British Journal of Pharmacology*, *177*(6), 1409–1423. <https://doi.org/10.1111/BPH.14816>
- Liu, Y., Chen, C., Wang, X., Sun, Y., Zhang, J., Chen, J., & Shi, Y. (2022). An Epigenetic Role of Mitochondria in Cancer. *Cells* *2022*, Vol. 11, Page 2518, *11*(16), 2518. <https://doi.org/10.3390/CELLS11162518>
- Lu, Y., Chan, Y. T., Tan, H. Y., Li, S., Wang, N., & Feng, Y. (2020). Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Molecular Cancer* *2020* *19:1*, *19*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12943-020-01197-3>
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *27*(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/S10822-013-9644-8/TABLES/9>
- Marth, C., Landoni, F., Mahner, S., McCormack, M., Gonzalez-Martin, A., & Colombo, N. (2017). Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *28*, iv72–iv83. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX220>
- Meira, W. V., Heinrich, T. A., Cadena, S. M. S. C., & Martinez, G. R. (2017). Melanogenesis inhibits respiration in B16-F10 melanoma cells whereas enhances

mitochondrial cell content. *Experimental Cell Research*, 350(1), 62–72.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.006>

Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2012). *Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery*.

Mosmann, T. (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)

Nakamura, H., & Maeda, H. (2022). Cancer Chemotherapy. *Fundamentals of*

Pharmaceutical Nanoscience, 401–427. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9164-4_15

O2 consumption - Oroboros Instruments. (2021). <https://www.orooboros.at/index.php/o2-consumption/>

Oliva, C. R., Zhang, W., Langford, C., Suto, M. J., & Griguer, C. E. (2017). Oncotarget 37568 www.impactjournals.com/oncotarget Repositioning chlorpromazine for treating chemoresistant glioma through the inhibition of cytochrome c oxidase bearing the COX4-1 regulatory subunit. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 23).

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oliver, A. M., & Teniente, L. (2016). Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent. *Molecules* 2016, Vol. 21, Page 931, 21(8), 931.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES21080931>

PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389493>

Prieto-Martínez, F. D., López-López, E., Eurídice Juárez-Mercado, K., & Medina-Franco, J. L. (2019). Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. In *Silico Drug Design: Repurposing Techniques and Methodologies*, 19–44.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00002-X>

QikProp. (2015). *Schrödinger Press QikProp 4.4 User Manual*.

RCSB PDB. (2023). *RCSB PDB - 5Z62: Structure of human cytochrome c oxidase*.

<https://www.rcsb.org/structure/5z62>

Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., Dahlgren, M. K., Mondal, S., Chen, W., Wang, L., Abel, R., Friesner, R. A., & Harder, E. D. (2019).

OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(3), 1863–1874.

https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.8B01026/SUPPL_FILE/CT8B01026_SI_002.ZIP

Salib, M. Y., Russell, J. H. B., Stewart, V. R., Sudderuddin, S. A., Barwick, T. D., Rockall, A. G., & Bharwani, N. (2020). 2018 figo staging classification for cervical cancer: Added benefits of imaging. *Radiographics*, 40(6), 1807–1822.

<https://doi.org/10.1148/RG.2020200013/ASSET/IMAGES/LARGE/RG.2020200013.FIG13C.JPEG>

FIG13C.JPEG

- Schaduangrat, N., Lampa, S., Simeon, S., Gleeson, M. P., Spjuth, O., & Nantasenamat, C. (2020). Towards reproducible computational drug discovery. *Journal of Cheminformatics* 2020 12:1, 12(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/S13321-020-0408-X>
- Schrodinger. (2015). *Schrödinger Press Glide User Manual Glide 6.7 User Manual Glide User Manual*.
- Schrödinger. (2020). *Maestro | Schrödinger*.
<https://www.schrodinger.com/products/maestro>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 60, pp. 273–343). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Tomar, V., Mazumder, M., Chandra, R., Yang, J., & Sakharkar, M. K. (2019). Small Molecule Drug Design. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3, 741–760. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20157-X>
- Underwood, E., Redell, J. B., Zhao, J., Moore, A. N., & Dash, P. K. (2020). A method for assessing tissue respiration in anatomically defined brain regions. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69867-2>
- United Kingdom National Health Service. (2021). *Cáncer de cuello uterino - Tratamiento - NHS*. <https://www.nhs.uk/conditions/cervical-cancer/treatment/>

- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 10, pp. 685–698). <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J. Z. H., & Hou, T. (2019). *End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>
- Wang, X., Wang, H., Mou, X., Xu, Y., Han, W., Huang, A., Li, Y., Jiang, H., Yang, X., & Hu, Z. (2022). Lysophosphatidic acid protects cervical cancer HeLa cells from apoptosis induced by doxorubicin hydrochloride. *Oncology Letters*, *24*(2), 1–8. <https://doi.org/10.3892/OL.2022.13387/HTML>
- Xiong, W., Jiao, Y., Huang, W., Ma, M., Yu, M., Cui, Q., & Tan, D. (2012). *Regulation of the cell cycle via mitochondrial gene expression and energy metabolism in HeLa cells*. *Human cervical cancer HeLa cells have functional mitochondria*. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms006>
- Zhang, L., Lu, Q., & Chang, C. (2020). Epigenetics in Health and Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1253*, 3–55. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1/COVER
- Zhao, J. L., Zhao, J., & Jiao, H. J. (2014). Synergistic growth-suppressive effects of quercetin and cisplatin on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(2), 784–791. <https://doi.org/10.1007/S12010-013-0561-Z/FIGURES/4>

Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X., & Zhu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 1885. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S106412>

Zong, S., Wu, M., Gu, J., Liu, T., Guo, R., & Yang, M. (2018). Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Research*, *28*(10), 1026–1034. <https://doi.org/10.1038/S41422-018-0071-1>