

**Identificación de compuestos adyuvantes en el tratamiento del carcinoma
hepatocelular con doxorrubicina y oxaliplatino en células de hepatocarcinoma humano
(HepG2)**

Liseth Paola Tatiana Bohórquez Calderón

Trabajo de Grado para Optar a el título de química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez
Doctora en ciencias-Bioquímicas

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa
Doctor en química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

*Le dedicó este trabajo de grado a Olid, Norelys, Karina, Yeily, Oscar, Liliana y Alejo,
quienes fueron mis compañeros en el camino de la batalla contra el cancer.*

*Porque fueron unos guerreros, y una de las razones por las cuales quise realizar este
trabajo de grado, espero algún día la ciencia logre salvar la vida de todos los pacientes con
cáncer y nadie más pierda la batalla contra esta enfermedad.*

Agradecimientos

La culminación de este trabajo de grado representa un gran logro para mí, ya que desde que empecé la carrera de química me enamoré de todo el conocimiento que fui adquiriendo en el camino, hasta llegar al punto de convertir esta ciencia en una parte fundamental de mi vida.

Razón por la cual me di cuenta de que uno de los mayores retos que se me han presentado en la vida, fue posponer mi carrera para dedicarme a cuidar de mi salud, por tal motivo, en este documento tan importante para mí, quiero agradecer a todas aquellas personas que me apoyaron en esta etapa de mi vida.

Entre esos, primero que todo a mi papá, mi mamá y mis hermanos, en quienes siempre he encontrado apoyo incondicional en todo el gran número de situaciones en las que he estado. A mi familia, entre ellos, mis tías Carolina, Ana, Nelly y Mariela, y mis primos Gabriel, Susi y Gina, por sacar siempre de su tiempo para acompañarme en la clínica.

A mis mejores amigas Silvia y Yuliana, y a Sebastián, porque estuvieron acompañándome en el momento que más los necesite y demostraron ser unos amigos incondicionales.

A la Dra. Ana Maria Castellanos, porque día tras día me cuidó, y me hizo sentir que más que cumplir con su trabajo, se preocupaba de verdad porque estuviera bien y por verme sana volviendo a lo que más me gustaba que es mi carrera.

También quiero agradecer a la profesora Stelia por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado enfocado en este tema de investigación, ya que me permitió aprender y entender más esta enfermedad. A Luis Carlos por ser un excelente codirector, por tener mucha paciencia, por apoyarme y darme ánimos cuando sentía que las cosas no salían bien, todas las personas deberían tener un codirector como el que yo tuve.

Y finalmente a Mayra y Andrea, por acompañarme en la realización de este proyecto, agradezco haberlas encontrado en el camino, porque sin su compañía el trabajo en el laboratorio no habría sido igual de divertido.

Me siento muy agradecida, porque sin toda la ayuda que recibí de todos ellos habría sido más difícil para mí retomar mi carrera y llegar a convertirme en una Química.

Tabla de contenido

Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
1. Marco de referencia y antecedentes.....	13
1.1. Epigenética del cáncer y metabolismo de las células cancerígenas	13
1.2. Contribución de la mitocondria y la fosforilación oxidativa en la dinámica del cáncer	14
1.3. Cáncer de hígado, tratamiento actual y factores de riesgo	15
1.4. Metabolitos secundarios como alternativa para el tratamiento del carcinoma hepatocelular e inhibidores de la bioenergética mitocondrial.....	17
1.5. Docking molecular y descubrimiento de fármacos	18
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo General.....	20
2.2. Objetivos Específicos	20
 CAPITULO 1. DETERMINACIÓN <i>IN SILICO</i> DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS MEDICINALES INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....	
1. Metodología fase <i>in silico</i>	21
1.1. Construcción de base de datos y preparación de ligandos.....	22
1.2. Preparación de proteínas.....	23
1.3. Docking molecular	24
1.4. Cálculo de la energía de afinidad	26
1.5. Diseño de Figuras	26
2. Resultados y discusión.....	26
2.1. Complejo I, Sitio de unión del NADH	26
2.2. Complejo III, Sitios Q _o y Q _i	35
3. Conclusión	42
 CAPITULO 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA Y SINERGISMO 43	
1. Metodología fase <i>in vitro</i>	43
1.1. Cultivo celular	44
1.2. Evaluación de citotoxicidad.....	44
1.3. Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármacos de referencia para el tratamiento del CHC	45
1.4. Efecto de la mejor mezcla seleccionada sobre la respiración de las células HepG2	46
1.5. Análisis estadístico	46
2. Consideraciones éticas.....	47
2.1. Disposición adecuada de los residuos o desechos químicos	47

2.2. Ensayos con células	48
3. Resultados y discusión	49
3.1. Determinación de CC ₅₀	49
3.2. Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármacos de referencia	51
3.3. Acción de la mezcla entre carvacrol y sorafenib sobre la respiración celular de HepG2	62
4. Conclusiones	65
5. Recomendaciones	66
Divulgación de resultados	66
Agradecimientos	67
Anexos	68
Anexo A	68
Anexo B	73
Anexo C	77
Anexo D	77
Anexo E	78
Anexo F.....	79
Anexo G.....	80
Referencias Bibliográficas	81

Lista de tablas

Tabla 1. Compuestos y fármacos de referencia seleccionados para los complejos I y III	23
Tabla 2. Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del complejo I	27
Tabla 3. Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del sitio Q _o del complejo III.....	36
Tabla 4. Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del sitio Q _i del complejo III.....	37
Tabla 5. CC ₅₀ a las 48 horas sobre las células HepG2 de cada metabolito seleccionado y fármaco de referencia.....	50
Tabla 6. Mezclas realizadas entre los metabolitos ácido gálico y carvacrol y los fármacos doxorubicina y sorafenib	51
Tabla 7. Valores de porcentaje de viabilidad celular, Índice de combinación, tipo de interacción e índice de reducción de dosis obtenido al exponer las células HepG2 durante 48 horas a cada mezcla	53
Tabla 8. Valores de porcentaje de viabilidad celular, Índice de combinación, tipo de sinergismo e índice de reducción de dosis, obtenido al exponer las células HepG2 durante 48 horas a la mezcla entre ácido gálico y carvacrol	57

Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema metodológico *in silico* para seleccionar metabolitos con posible interacción con complejos de la cadena respiratoria mitocondrial 22
- Figura 2. A: Estructura cristalina del complejo I de la especie homo sapiens tomada y adaptada de la PDB (5XTD), B: Subunidad A, codificada por el gen NDUFV1, donde se encuentra el sitio de unión del NADH, C: Estructura del complejo III de la especie homo sapiens tomada y adaptada de la PDB (5XTE), D: Cadenas J, H, P, U y V, encerrado en rojo se encuentran los sitios de oxidación de quinol (Q_o) y en azul los sitios de reducción de quinona (Q_i). 24
- Figura 3. Estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de los complejos I de la cadena respiratoria mitocondrial. 28
- Figura 4. Poses de acoplamiento representativas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo I y compuestos inhibidores de referencia, obtenidas con el programa Pymol. A: carvacrol, B: timol, C: ácido gálico, D: NADH y E: resveratrol. Los residuos de la cadena A están coloreados de acuerdo con el tipo de átomo de los residuos de aminoácidos que interactúan (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; azufre, naranja; hierro, marrón). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas de la siguiente manera: las interacciones de los puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo y las interacciones π - π están coloreadas en verde. 29
- Figura 5. A: Residuos importantes en el sitio de unión del NADH en las estructuras proteicas del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, 3IAM de la especie *Thermus thermophilus* (Rosa) y 5XTD de la especie *Homo sapiens* (Gris); B: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las estructuras 3IAM y 5XTD, los aminoácidos dentro de los recuadros son los aminoácidos importantes en la unión del NADH. 32
- Figura 6. Poses de acoplamiento representativas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo III y la rapanona, obtenidos con el programa Pymol. A: carvacrol sitio Q_o , B: carvacrol sitio Q_i , C: timol sitio Q_o , D: timol sitio Q_i y E: rapanona sitio Q_o . En la imagen los residuos de las cadenas están coloreados de acuerdo con el tipo de átomo de los residuos de aminoácidos que interactúan (carbono de la cadena J, cian pálido; carbono de la cadena H, verde pálido; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; azufre, naranja; hierro, marrón). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas de la siguiente manera: las interacciones de los puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo. 39
- Figura 7. Diagrama metodológico de la fase *in vitro*. 43
- Figura 8. Porcentaje de viabilidad sobre células HepG2 luego de 48 horas Vs. Concentración de los fármacos de referencia a la izquierda, y de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial a la derecha. 50
- Figura 9. Índice de combinación a las 48 horas sobre células HepG2 Vs. Concentración de las mezclas realizadas para determinación de interacción farmacológica. C: carvacrol, G: ácido gálico, D: doxorrubicina y S: sorafenib. 52
- Figura 10. Porcentaje de viabilidad celular sobre las células HepG2 de tres concentraciones de las mezclas binarias, 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. A: sorafenib-carvacrol, B: sorafenib-ácido gálico y C: doxorrubicina-ácido gálico. Los resultados están 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 post hoc de Tukey, *P <0,05. 58

Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular sobre las células HepG2 de tres concentraciones de las mezclas terciarias, 0,17CC₅₀, 0,33CC₅₀ y 0,67CC₅₀, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. A: carvacrol-ácido gálico-doxorrubicina, B: carvacrol-ácido gálico-sorafenib y C: ácido gálico-sorafenib-doxorrubicina. Los resultados están 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. 59

Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular sobre las células HepG2 de tres concentraciones de la mezcla entre el ácido gálico y el carvacrol, 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Los resultados están 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. 61

Figura 13. Efecto de la mezcla sorafenib-carvacrol sobre las células HepG2 luego de 12 horas de tratamiento, a una concentración del 0,25CC₅₀ (carvacrol: 86 μ M y sorafenib: 0,725 μ M). Los resultados corresponden a un ensayo independiente 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, 90,8 pmolO₂/seg*1x10⁶células; Leak, 54,8 pmolO₂/seg*1x10⁶células; Desacoplado, 108,5 pmolO₂/seg*1x10⁶células; respiración no mitocondrial, 52,0 pmolO₂/seg*1x10⁶células. 63

Resumen

Título: Identificación de compuestos adyuvantes en el tratamiento del carcinoma hepatocelular con doxorubicina y oxaliplatino en células de hepatocarcinoma humano (HepG2)

Autor: Liseth T. Bohórquez-Calderón, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez.

Palabras Clave: Cáncer de hígado, citotoxicidad, HepG2, metabolitos secundarios, mitocondria, sinergismo.

Descripción:

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, entre los tipos de cáncer con peores estadísticas se encuentra el cáncer de hígado, por tal motivo, es necesario potencializar los efectos de sus terapias convencionales. Con base en esto, el objetivo de este trabajo de grado fue, identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencialicen el efecto anticanceroso de la doxorubicina, el oxaliplatino y el sorafenib en células de hepatocarcinoma humano, teniendo como diana terapéutica la mitocondria.

Primero, se realizó un cribado de una base de datos con 187 metabolitos mediante docking molecular, utilizando la interfaz Maestro de la suite Schrödinger Drug Discovery (2020-4), a partir del cual se identificó las posibles interacciones de los metabolitos con el sitio de unión del NADH en el complejo I (PDBID:5XTD, resolución de 3,70 Å), y los sitios Q_o y Q_i en el complejo III (PDBID:5XTE, resolución de 3,40 Å) de la cadena respiratoria mitocondrial.

El timol, carvacrol y ácido gálico fueron seleccionados como los posibles mejores inhibidores del complejo I, por sus propiedades ADME, docking score (DS), energías de afinidad (EA) (timol: DS:-2,4/EA:-29,0 Kcal/mol, carvacrol: DS:-2,31/EA:18,8 Kcal/mol, ácido gálico: DS:-4,57/EA:-17,1 Kcal/mol) e interacciones que podrían tener con residuos importantes en el sitio de unión del NADH (Phe101, Phe229, Phe93 y Glu209). Por otro lado, fueron seleccionados el timol y carvacrol como posibles inhibidores del complejo III, de igual forma, por sus propiedades ADME, DS, EA (Sito Q_o: timol: DS:-3,41/EA:-43,6 Kcal/mol, carvacrol: DS:-4,03/EA:-16,3 Kcal/mol; Sitio Q_i: timol: DS:-5,01/EA:-28,7 Kcal/mol, carvacrol: DS:-5,22/EA:-34,1 Kcal/mol) e interacciones que podrían tener con residuos presentes en los sitios Q_o y Q_i (Asp252, Tyr256, Tyr131, Leu250, Trp272, Tyr273, Ala84, Glu271, Arg80).

Luego, se determinó la concentración citotóxica al 50% (CC₅₀) a las 48 horas de tratamiento, de los metabolitos seleccionados (carvacrol: 344, ácido gálico: 143 y timol: 478 μM), sobre células de hepatocarcinoma humano (HepG2) empleando MTT (Mossmann, 1983) y de los fármacos sorafenib, doxorubicina y oxaliplatino cuyos valores fueron 2,9, 0,2 y 13 μM, respectivamente. También, se realizaron ensayos de citotoxicidad, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento, con tres concentraciones diferentes, de mezclas entre carvacrol, ácido gálico, sorafenib y doxorubicina, con el objetivo de identificar el índice de combinación (IC) y el índice de reducción de dosis (DRI por sus siglas en inglés “*Dose-Reduction Index*”).

La mezcla carvacrol-sorafenib se seleccionó como la mejor, cuyos IC a las 48 horas fueron 0,52, 0,67 y 0,44, y DRI fueron, sorafenib: 3,87/carvacrol: 3,83; sorafenib: 3,00/carvacrol: 2,98, sorafenib: 4,60/carvacrol: 4,57, para concentraciones del 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, respectivamente, además, produjo un cambio significativo en la viabilidad con sus tres concentraciones evaluadas, desde 12 horas de tratamiento. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de respiración celular, durante 12 horas de tratamiento en una concentración del 0,25CC₅₀ de esta mezcla (carvacrol: 86 μM y sorafenib: 0,725 μM), donde se identificó que disminuyó la velocidad de consumo de oxígeno en un 32% en un estado desacoplado, indicando que la capacidad máxima respiratoria de las células se vio afectada.

Abstract

Title: Identification of adjuvant compounds in the treatment of hepatocellular carcinoma with doxorubicin and oxaliplatin in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2)

Author: Liseth T. Bohórquez-Calderón, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez

Key Words: Liver cancer, cytotoxicity, HepG2, secondary metabolites, mitochondria, synergism.

Description:

Cancer is the second cause of death in the world, among the types of cancer with the worst statistics is liver cancer, for this reason, it is necessary to potentiate the effects of its conventional therapies. Based on this, the objective of this degree work was to identify secondary metabolites of medicinal plants that potentiate the anticancer effect of doxorubicin, oxaliplatin and sorafenib in human hepatocarcinoma cells, having the mitochondria as therapeutic target.

First, a database with 187 metabolites was screened by molecular docking, using the Maestro interface of the Schrödinger Drug Discovery suite (2020-4), from which the possible interactions of the metabolites with the target site were identified. NADH binding in complex I (PDBID:5XTD, 3.70 Å resolution), and Q_o and Q_i sites in complex III (PDBID:5XTE, 3.40 Å resolution) of the mitochondrial respiratory chain.

Thymol, carvacrol and gallic acid were selected as the possible best inhibitors of complex I, due to their ADME properties, docking score (DS), affinity energies (EA) (thymol: DS:-2.4/EA:-29,0 Kcal/mol, carvacrol: DS:-2.31/EA:18.8 Kcal/mol, gallic acid: DS:-4.57/EA:-17.1 Kcal/mol) and interactions they could have with residues important in the NADH binding site (Phe101, Phe229, Phe93 and Glu209). On the other hand, thymol and carvacrol were selected as possible inhibitors of complex III, in the same way, due to their ADME, DS, EA properties (Site Q_o: thymol: DS:-3.41/EA:-43.6 Kcal/mol, carvacrol: DS:-4.03/EA:-16.3 Kcal/mol, Q_i site: thymol: DS:-5.01/EA:-28.7 Kcal/mol, carvacrol: DS:-5, 22/EA:-34.1 Kcal/mol) and interactions they could have with residues present in the Q_o and Q_i sites (Asp252, Tyr256, Tyr131, Leu250, Trp272, Tyr273, Ala84, Glu271, Arg80).

Then, the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined at 48 hours of treatment of the selected metabolites (carvacrol: 344, gallic acid: 143 and thymol: 478 μM), on human hepatocarcinoma cells (HepG2) using MTT (Mossmann, 1983) and of the drugs sorafenib, doxorubicin and oxaliplatin whose values were 2.9, 0.2 and 13 μM, respectively. Also, cytotoxicity tests were carried out, during 12, 24 and 48 hours of treatment, with three different concentrations, of mixtures between carvacrol, gallic acid, sorafenib and doxorubicin, with the objective of identifying the combination index (CI) and the index Dose-Reduction Index (DRI).

The carvacrol-sorafenib mixture was selected as the best, whose CI at 48 hours were 0.52, 0.67 and 0.44, and DRI were, sorafenib: 3.87/carcacrol: 3.83; sorafenib: 3.00/carcacrol: 2.98, sorafenib: 4.60/carcacrol: 4.57, for concentrations of 0.25CC₅₀, 0.5CC₅₀ and CC₅₀, respectively, also produced a significant change in viability with its three concentrations evaluated, from 12 hours of treatment. Finally, cellular respiration tests were carried out during 12 hours of treatment at a concentration of 0.25 CC₅₀ of this mixture (carvacrol: 86 μM and sorafenib: 0.725 μM), where it was identified that the rate of oxygen consumption decreased in 32% in an uncoupled state, indicating that the maximum respiratory capacity of the cells was affected.

Introducción

El cáncer es la segunda enfermedad no transmitible que mayor número de muertes produce en el mundo, después de las enfermedades cardiovasculares (Roser & Ritchie, 2019). A medida que la población mundial crece, aumenta también la tasa de mortalidad por cáncer, desde 1990 ésta ha aumentado en un 17% (Roser, 2020). Según los datos publicados en el GLOBOCAN, en el 2020 hubo 19,3 millones de nuevos casos de cancer, y 10 millones de muertes provocadas por esta enfermedad, siendo los factores de riesgo socioeconómicos los que impulsan este aumento y dejan en vulnerabilidad a los países de bajo y medio Índice de Desarrollo Humano (IDH), por lo que se espera un mayor aumento de incidencia en estos países para el año 2040 (GLOBOCAN, 2021).

Uno de los tipos de cáncer con estadísticas más alarmantes es el de hígado, ya que, según los datos publicados en el GLOBOCAN en el 2020, ocupó el tercer puesto con mayor número de muertes (830.180) y el sexto puesto en número de incidencias (905.677) (GLOBOCAN, 2021). Cabe resaltar que entre los diferentes tipos de cancer de hígado, el carcinoma hepatocelular (CHC) representa el 90% de los casos de este tipo de cancer, además, que el 50% de los pacientes son diagnosticados en etapas intermedia y avanzada, donde la mediana de supervivencia es de tan solo aproximadamente 30 y 6 meses, respectivamente (Llovet et al., 2021; Tang et al., 2020). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de identificar nuevas alternativas o tratamientos para el CHC, así como mejorar los tratamientos ya existentes, los cuales tienen baja eficacia y se ven afectados por la generación de resistencia y efectos secundarios (Li et al., 2021).

Esta investigación se realizó con el objetivo de identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales, que tengan como diana terapéutica el metabolismo energético mitocondrial, y potencialicen sinérgicamente el efecto de la doxorubicina, el oxaliplatino y el sorafenib,

fármacos implementados en el tratamiento contra el CHC intermedio y avanzado (Li et al., 2021; Samant et al., 2021). El uso de compuestos naturales podrían tener efectos similares al de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, además de disminuir efectos secundarios y la resistencia (Lin et al., 2020a).

Con el fin de cumplir el objetivo de este trabajo de grado, se realizó un cribado *in silico* por medio de acoplamiento molecular, donde se identificó al ácido gálico, carvacrol y timol, como metabolitos secundarios de plantas medicinales, que podrían tener un alto potencial inhibitorio de la cadena respiratoria mitocondrial. Luego, se evaluó su actividad citotóxica y la de los fármacos doxorubicina, oxaliplatino y sorafenib, a partir de estos resultados, se encontró la concentración a la cual se reduce la viabilidad de las células HepG2 a un 50% (carvacrol: 344 μM ; ácido gálico: 143 μM ; timol: 478 μM ; doxorubicina: 0,2 μM ; sorafenib: 2,9 μM y oxaliplatino: 13,0 μM).

A continuación, mediante ensayos de citotoxicidad se identificó el carvacrol, como un metabolito capaz de potenciar el efecto del sorafenib sobre las células HepG2, y por último por medio de ensayos de respiración celular, se demostró que esta mezcla disminuyó significativamente la respiración celular a un 32% en el estado desacoplado, lo cual demuestra que el carvacrol potencializa el efecto del sorafenib probablemente al inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Para facilitar la presentación de los resultados obtenidos, se expone el conocimiento necesario acerca de la epigenética del cáncer y el metabolismo de las células cancerígenas, la contribución de la mitocondria en la dinámica del cancer, las características del cáncer de hígado, tratamientos y un nuevo enfoque para el tratamiento del cáncer de hígado, usando metabolitos de plantas como inhibidores de la bioenergética mitocondrial y el docking molecular en el descubrimiento de fármacos. Además, la metodología, los resultados, el análisis y las conclusiones

obtenidas en cada uno de los estudios anteriormente mencionados se exponen en dos capítulos, uno para los ensayos *in silico* y otro para los resultados de los ensayos *in vitro*.

1. Marco de referencia y antecedentes

En primer lugar, es necesario conocer los avances en las investigaciones científicas actuales, sobre la epigenética del cancer, la forma en que se desarrolla y las características de las células cancerígenas que las diferencian a las demás.

1.1. Epigenética del cáncer y metabolismo de las células cancerígenas.

El cáncer es una enfermedad que puede desarrollarse en cualquier tipo de órgano cuando se presenta una acumulación de alteraciones que incluyen cambios genéticos, citogénicos, y epigenéticos en las células y el ambiente extracelular (Sandoval & Esteller, 2012). Se ha comprobado que las células cancerígenas cooperan entre sí para su supervivencia y replicación, causando cambios e influenciando las células vecinas, además, que sus mutaciones les dan la capacidad de permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la metástasis, mantener activas las señales proliferativas y evadir los supresores del crecimiento y los diferentes procesos que normalmente inducirían muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Se ha identificado como una más de las señales del cancer la reprogramación del metabolismo energético mediante mutaciones en el ADN mitocondrial, ya que para evadir condiciones como falta de nutrientes o hipoxia y cumplir con las cualidades anteriormente mencionadas, las células cancerígenas necesitan aumentar y adaptar sus procesos metabólicos, por lo tanto, su metabolismo celular se caracteriza por ser heterogéneo y muy activo (Dhanasekaran et al., 2020; Grasso et al., 2020).

Está demostrado que la mitocondria tiene un rol importante en la supervivencia de células cancerígenas, debido a que está involucrada en el control de la muerte celular, la proliferación y la señalización (Grasso 2020). Por lo tanto, es indispensable entender su contribución en el desarrollo y progresión del cáncer.

1.2. Contribución de la mitocondria y la fosforilación oxidativa en la dinámica del cáncer.

Las mitocondrias son las centrales eléctricas de la célula, son reguladoras dinámicas de la vida y organelos importantes para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Dhanasekaran et al., 2020). La mayoría de las células cancerígenas tienen la respiración mitocondrial disminuida con respecto a la actividad de la vía de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno, esta es una alteración metabólica llamada “efecto Warburg”, que ocurre por el aumento en la producción del factor inducible de hipoxia (HIF-1), proteína encargada de modular la relación entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa, por lo tanto, las células cancerígenas obtienen su energía principalmente por medio de la oxidación de la glucosa (Gogvadze et al., 2008).

Sin embargo, esta condición permite que a través de dosis moderadas de compuestos inhibidores de la fosforilación oxidativa, se reduzca la producción energética mitocondrial de las células cancerígenas, por debajo de un nivel umbral crítico para la supervivencia celular y se afecte poco a las células normales, las cuales aún serían capaces de producir suficiente ATP (Gogvadze et al., 2008). Estos compuestos pueden estar dirigidos a la inhibición de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, los cuales son la principal fuente de producción de ROS (ROS, del inglés “Reactive oxygen species”) en la mayoría de los tejidos, de esta manera, además de afectar el metabolismo energético, es posible inducir muerte celular por daños producidos sobre

biomoléculas vitales como el ADN mitocondrial (mtADN) (Grasso et al., 2020; Hayes et al., 2020).

Las células HepG2 (células de hepatocarcinoma) presentan una actividad disminuida en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y sobreproducción de ROS, por una mutación del gen codificante de la subunidad ND6 de este complejo (Gao et al., 2011). Además, se ha encontrado que el número de copias de mtADN y el contenido de proteínas respiratorias mitocondriales se reducen significativamente en el CHC (P. H. Yin et al., 2004). Por lo tanto, una manera de inducir la muerte en células de cancer de hígado puede ser a través de la vía mitocondrial. Sin embargo, además de un conocimiento general sobre el cancer y el rol de la mitocondria en su proliferación y mantenimiento, también es necesario profundizar en el conocimiento de los tratamientos actuales para el cancer de hígado.

1.3. Cáncer de hígado, tratamiento actual y factores de riesgo.

El cáncer de hígado se desarrolla principalmente en un contexto de hígado graso, cirrótico y fibroso debido al daño continuo de los hepatocitos, los cuales a pesar de su capacidad reparadora, son alterados por causas genéticas, ambientales, infecciosas y autoinmunes (Wyatt & Haugk, 2019).

Los principales factores predictores del desarrollo de este cancer son la infección por los virus de hepatitis B y C, el consumo de alcohol, tener una edad avanzada y pertenecer al sexo masculino (Balogh et al., 2016). Existen cuatro formas de cáncer de hígado, los cuales se pueden distinguir por su apariencia histológica y por su variación genética, estos son, el colangio carcinoma intrahepático (iCCA), el hepatoblastoma, el carcinoma fibrolamelar, y el más frecuente el CHC, el cual representa el 90% de los casos de este tipo de cancer (Gingold et al., 2018).

El CHC puede ser diagnosticado en cinco etapas diferentes, según el estado clínico del paciente, las cuales son muy precoz, precoz, intermedia, avanzada y terminal, desafortunadamente, el diagnóstico suele hacerse la mayoría de las veces en etapas avanzadas donde no se brindan tratamientos curativos (Antonio Díaz et al., 2015).

El tratamiento para el CHC se suministra dependiendo de la etapa donde se encuentran los pacientes. En las etapas muy precoz y precoz se realiza resección quirúrgica y trasplante hepático, respectivamente; en la intermedia y avanzada, se lleva a cabo quimioembolización transarterial (TACE por sus siglas en inglés “Transcatheter Arterial Chemoembolization”) y la administración de terapias sistémicas, donde el sorafenib es implementado como uno de los fármacos de primera línea, respectivamente; y en la terminal, solo se ofrecen medidas de soporte paliativas (Antonio Díaz et al., 2015; Llovet et al., 2012).

TACE es el tratamiento inicial más utilizado para el cáncer de hígado intermedio, con tumores que exceden los criterios para tratamientos curativos, se usa con el objetivo de inducir la necrosis tumoral como terapia puente, hasta lograr la posibilidad de realización de trasplante hepático, esta técnica se basa en la oclusión selectiva de las arterias hepáticas que nutren el tumor junto con la perfusión de agentes anticancerosos (Balogh et al., 2016; Muros-Ortega et al., 2011). Entre estos agentes se encuentra la doxorubicina, un compuesto que induce muerte celular al intercalarse en el ADN, y el oxaliplatino, el cual produce autofagia en las células de CHC, sin embargo, el uso clínico de estos fármacos es muy limitado debido a su toxicidad (Ding et al., 2011).

Dado que el tratamiento administrado actualmente para el CHC, suele producir efectos secundarios, generar resistencia y tener bajas tasas de supervivencia, se han propuesto diferentes alternativas para potencializar sus efectos, una de ellas es la combinación de los fármacos

implementados en el tratamiento con metabolitos secundarios de plantas medicinales (Lin et al., 2020a). Por lo tanto, vale la pena profundizar en los resultados que se han obtenido en la investigación para implementar esta alternativa.

1.4. Metabolitos secundarios como alternativa para el tratamiento del carcinoma hepatocelular e inhibidores de la bioenergética mitocondrial.

Con el objetivo de mejorar el tratamiento contra el CHC, se ha evaluado la actividad citotóxica de varios compuestos naturales sobre las células HepG2, entre esos, el carvacrol, la quercetina, el timol y el ácido gálico.

El carvacrol se ha reportado como un compuesto con actividad antitumoral que inhibe el crecimiento de las células HepG2, induciendo la apoptosis mediante la activación de la vía mitocondrial, con un CC_{50} de 400 μ M a 24 horas; también se ha demostrado mediante ensayos *in vivo* realizados en ratones, que la quercetina puede inhibir significativamente la proliferación de células HepG2 al inducir apoptosis a través de la regulación de la ciclina D1, en concentraciones superiores a 10 μ M; además, se ha identificado que el timol induce apoptosis sobre las células HepG2 mediante el aumento de la producción de ROS, con un CC_{50} de 289,5 mg/L a 24 horas, al igual que el ácido gálico, cuyo CC_{50} reportado a las 48 horas fue 550 μ M (Elshafie et al., 2017; Lima et al., 2016; Zhou et al., 2017)

Además de evaluar el efecto de diferentes metabolitos secundarios sobre las células HepG2, también se ha identificado que la combinación de ellos con fármacos como la doxorubicina ha potencializado el efecto citotóxico de este fármaco, un ejemplo de esto, fue reportado por Zhong y colaboradores en el año 2019, quienes a partir de ensayos de citotoxicidad realizados sobre células HepG2 durante 48 horas, demostraron un efecto sinérgico al combinar el

ácido elálgico en concentraciones entre 20 μM y 60 μM , con doxorubicina en una concentración de 1,15 μM (Lin et al., 2020a; Zhong et al., 2019).

En base a la capacidad anticancerígena y potencializadora que se ha reportado de los metabolitos secundarios de plantas medicinales en la terapia contra el CHC, y al rol de la mitocondria en la proliferación y supervivencia de las células cancerígenas, en este trabajo de grado se propone identificar metabolitos secundarios que tengan como diana terapéutica la mitocondria, empleando docking molecular. Por tal motivo es indispensable conocer las ventajas de utilizar esta herramienta en el descubrimiento de nuevas alternativas en la terapia contra el cancer.

1.5. Docking molecular y descubrimiento de fármacos.

El docking molecular es una herramienta computacional que permite predecir el modo de unión de millones de compuestos a una proteína en poco tiempo, a diferencia de si se realizaran ensayos *in vivo* o *in vitro* con cada uno de estos compuestos (Fernanda Saldívar-González, 2017). Desde 1980 ha venido creciendo su uso para el descubriendo de fármacos, ya que permite disminuir el costo y el tiempo invertido en este proceso (Stanzione et al., 2021).

En la terapia contra el cancer, se han descubierto gran variedad de fármacos utilizando esta técnica, entre esos: el imatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa implementado en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica; el erlotinib, un inhibidor de la quinasa del EGFR, utilizado en la terapia contra el cancer de páncreas; y el sorafenib un inhibidor de la quinasa VEGFR, utilizado en la terapia contra el cancer de hígado y de tiroides (Prada-Gracia et al., 2016).

Además de implementar el docking molecular en el descubrimiento de nuevos fármacos, se está utilizando esta técnica para identificar compuestos de origen natural que se dirijan a dianas terapéuticas específicas como lo es la mitocondria, y actúen de forma sinérgica con los fármacos

ya implementados en la terapia contra el cancer, un ejemplo de esto es el antraquinona Rhein obtenida de la planta *Polygonum multiflorum*, a la cual por medio de docking molecular se le identificó la capacidad de dirigirse a la mitocondria, producir citotoxicidad en células de cancer de hígado y potencializar el efecto de la doxorubicina (Wu et al., 2019). Con base en esto, en este trabajo de grado se plantearon los siguientes objetivos:

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencialicen el efecto anticanceroso de la doxorubicina y el oxaliplatino en células de hepatocarcinoma humano, teniendo como diana terapéutica la mitocondria.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar por medio de docking molecular metabolitos de plantas medicinales que inhiban los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Evaluar la actividad citotóxica y el sinergismo entre los metabolitos previamente identificados y la doxorubicina o el oxaliplatino sobre la línea celular HepG2 (hepatocarcinoma).
- Determinar el efecto sobre la respiración de las células HepG2, de la mezcla sinérgica seleccionada por tener los mejores resultados de viabilidad celular.

La metodología que se implementó en este trabajo de grado para cumplir con los objetivos establecidos abarcó una parte *in silico* y otra *in vitro*, por lo tanto, para facilitar su presentación, cada fase metodológica con sus respectivos resultados y discusión comprenderá un capítulo de este documento. De esta forma, en el primer capítulo, se expondrá la parte *in silico* y en el segundo la parte *in vitro*.

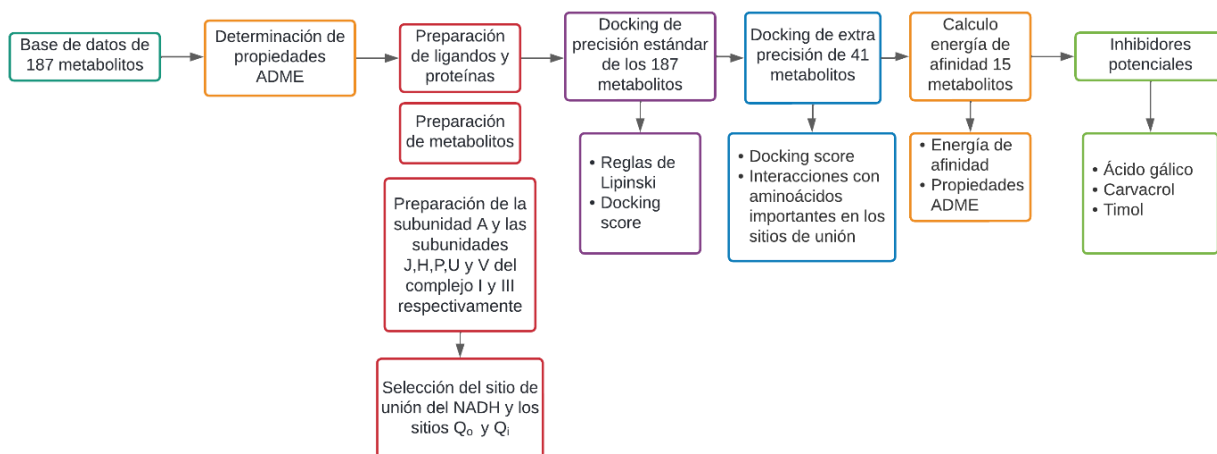
CAPITULO 1. DETERMINACIÓN *IN SILICO* DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS MEDICINALES INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

1. Metodología fase *in silico*

El análisis *in silico* se realizó siguiendo el diagrama metodológico de la **figura 1**. Primero se creó una base de datos de metabolitos de plantas medicinales con actividad anticancerosa reportada en la literatura, y se preparó sus estructuras químicas para el docking, junto con las estructuras cristalinas de las subunidades del complejo I (subunidad A) y III (subunidades J,H,P,U y V). Seguido de esto, se seleccionó el sitio de unión del NADH en el complejo I, el sitio de reducción de quinona (Q_i) y el sitio de oxidación de quinol (Q_o), en el complejo III, para finalmente, llevar a cabo un docking molecular con dos diferentes grados de precisión, uno de precisión estándar (docking SP) y otro de extra precisión (docking XP). Para la selección de los posibles mejores inhibidores se tuvo en cuenta diferentes parámetros, como, por ejemplo, el docking score, la energía de afinidad, interacciones con aminoácidos relevantes, y las propiedades ADME.

Figura 1.

Esquema metodológico in silico para seleccionar metabolitos con posible interacción con complejos de la cadena respiratoria mitocondrial



1.1. Construcción de base de datos y preparación de ligandos.

En primer lugar, se creó una base de datos con 187 metabolitos y sus estructuras químicas en formato sdf, junto con las estructuras de 3 compuestos y 2 fármacos de referencia, los cuales se ilustran en la **tabla 1**. Posteriormente, estos compuestos fueron visualizados y preparados usando la herramienta Ligprep (LigPrep, versión 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015), para generar la conformación en tres dimensiones, con la menor energía, y que mantuviera la quiralidad y estereoisomería de cada molécula, se calculó su carga atómica parcial y se ajustó su estado de protonación a $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ usando un campo de fuerza OPLS3e (Harder et al., 2016; Shelley et al., 2007).

Tabla 1.*Compuestos y fármacos de referencia seleccionados para los complejos I y III*

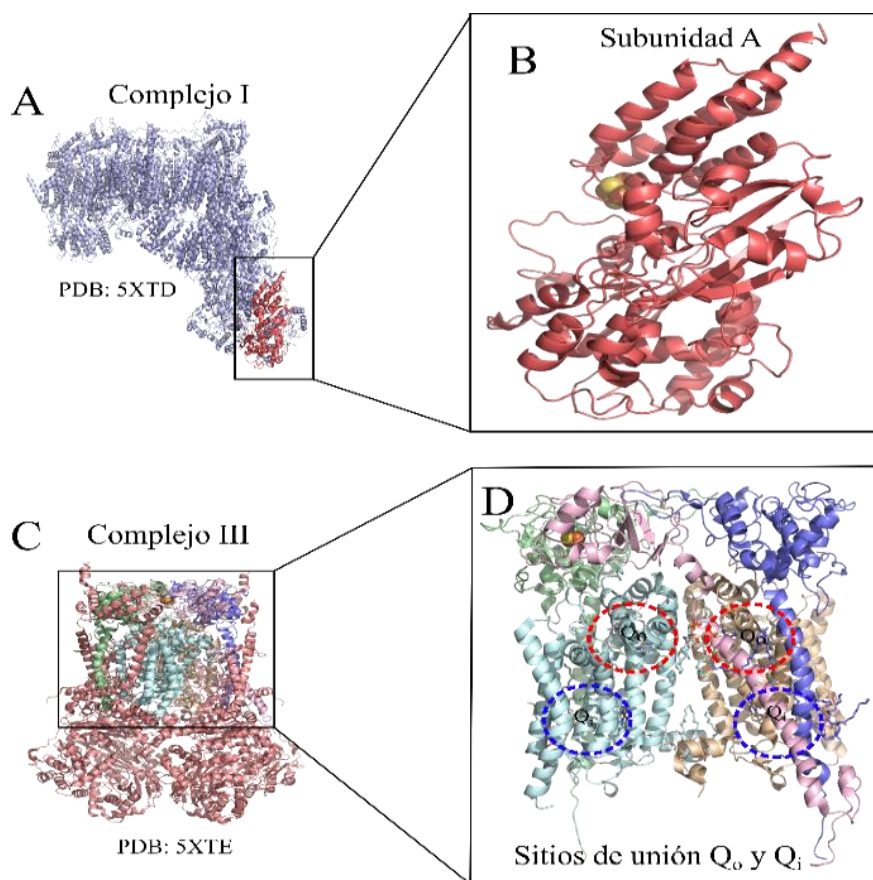
Complejo	Compuestos de referencia	Fármaco de referencia
I	NADH Resveratrol	Doxorrubicina Sorafenib
III	Rapanona	

1.2. Preparación de proteínas.

La preparación de las estructuras cristalinas de proteínas y los cálculos del docking, fueron realizados utilizando la interfaz Maestro del paquete de Schrödinger Drug Discovery suite for molecular modeling (2020-4). Primero, las estructuras cristalinas del complejo I (ID: 5XTD, resolución 3,70 Å (Guo et al., 2017)) y del complejo III (PDBID: 5XTE, resolución 3,40 Å (Guo et al., 2017) fueron obtenidas de la Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), luego, usando el módulo Protein Preparation wizard, se preparó la subunidad A del complejo I, debido a que es allí donde ocurre la oxidación del NADH, y las subunidades J, H, P, U y V, del complejo III, que contienen los sitios Q_o y Q_i , en los cuales ocurre la oxidación del ubiquinol, en un ciclo llamado ciclo Q, estas estructuras se presentan en la **figura 2** (Gueguen et al., 2015; Pardo Andreu et al., 2020). Además, usando Prime, se fijaron los estados protonados de los aminoácidos, a un pH $7,2 \pm 0,2$, se agregaron hidrógenos polares, átomos y residuos faltantes, se optimizaron las estructuras y se aplicó un campo de fuerza OPLS3e para minimizar su energía (Jacobson et al., 2004; Sastry et al., 2013).

Figura 2.

A: Estructura cristalina del complejo I de la especie *homo sapiens* tomada y adaptada de la PDB (5XTD),
B: Subunidad A, codificada por el gen *NDUFV1*, donde se encuentra el sitio de unión del NADH, **C:**
 Estructura del complejo III de la especie *homo sapiens* tomada y adaptada de la PDB (5XTE), **D:** Cadenas
 J, H, P, U y V, encerrado en rojo se encuentran los sitios de oxidación de quinol (Q_o) y en azul los sitios de
 reducción de quinona (Q_i).



1.3. Docking molecular.

A continuación, con la herramienta Receptor grid generation de Glide se configuraron las coordenadas y dimensiones de las cajas de docking, es decir el espacio dentro del cual se

posicionaron los metabolitos. En el caso del complejo I, se siguió el protocolo utilizado por N. Guenguen y colaboradores en el año 2015, donde se creó una caja de 20 Å en cada arista y se centró en los residuos Phe 101, Glu 209 y Phe 229, los cuales fueron identificados como importantes en este sitio de unión, por sus interacciones con el NADH (Gueguen et al., 2015). Por otro lado, fueron creadas dos cajas en el complejo III, siguiendo el protocolo implementado por G. Pardo Andreu y colaboradores en el año 2020, una caja para el sitio Q_o con coordenadas x:236,7Å, y:281,3Å y z:225,9Å y otra para el Q_i con coordenadas x:228,7 Å, y:269,3Å y z:239,9 Å, las dos cajas con dimensiones de 30 Å por arista (Pardo Andreu et al., 2020).

Luego, usando Glide se llevó a cabo el acoplamiento molecular con los dos diferentes grados de precisión, docking SP y docking XP considerando los ligandos como flexibles (Friesner et al., 2004, 2006; Halgren et al., 2004) (Glide 6.7).

En primer lugar, se realizó el docking SP con los 187 metabolitos pertenecientes a la base de datos creada, y los compuestos y fármacos de referencia, donde se obtuvo como resultado una pose por ligando, además, se calcularon las propiedades de Adsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME, por sus siglas en ingles), de los metabolitos usando la herramienta Qikprop (Qikprop, versión 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015).

Posteriormente se realizó un proceso de cribado, en el que se seleccionaron 41 de los metabolitos de la base de datos, teniendo como criterios de selección las reglas de Lipinski obtenidas dentro de las propiedades ADME y el docking score.

Finalmente, con estos metabolitos se realizó el docking XP, el cual arrojó como resultado mínimo 5 poses por ligando, seguido de esto, se llevó a cabo una inspección visual de las interacciones de las poses obtenidas de cada metabolito, con los residuos presentes en cada sitio de unión, en base a estos resultados y teniendo como criterios de selección el número de

interacciones con aminoácidos importantes y el docking score, se seleccionaron 15 metabolitos para el cálculo de su energía de afinidad con cada proteína.

1.4. Cálculo de la energía de afinidad.

Después de realizar el docking XP y seleccionar 15 metabolitos de la base de datos, se predijo la energía de afinidad de la pose con mayor docking score obtenida de cada metabolito con los respectivos sitios de unión, usando la herramienta Prime MM-GBSA de Schrödinger Drug Discovery suite, esta herramienta calcula la energía de los ligandos libres, las proteínas y el complejo proteína-ligando, además, calcula la energía de tensión al colocar los ligandos en una solución generada por VSGB 2.0 suit y el campo de fuerza OPLS3e (Sherman et al., 2006). Finalmente, se seleccionaron los mejores candidatos para llevar a cabo los posteriores análisis de citotoxicidad y sinergismo, teniendo en cuenta sus interacciones con los residuos presentes en los sitios de unión y su energía de afinidad, junto con el docking score obtenido en el docking XP.

1.5. Diseño de Figuras.

Las imágenes de docking fueron generadas usando Pymol 2.4.1 (*Schrödinger L. PyMol, The PyMOL Molecular Graphics System.*, n.d.) e Inkscape 1.0.

2. Resultados y discusión

2.1. Complejo I, Sitio de unión del NADH.

Se creó una base de datos con 187 metabolitos, cuyos nombres y propiedades ADME se presentan en el **anexo A**. Con esta base de datos, se llevó a cabo un proceso de selección de los posibles mejores inhibidores del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

En primer lugar, se realizó una discriminación de todos los metabolitos de la base de datos teniendo como parámetros de selección las reglas de Lipinski y el docking score del docking SP, con la cual se seleccionaron 41 metabolitos (**anexo B**). Seguido de esto, se realizó un docking XP y fueron seleccionados 15 de estos metabolitos para calcular su energía de afinidad con el sitio de unión del NADH, teniendo como parámetros de selección el docking score y sus interacciones con metabolitos presentes en el sitio de unión, las cuales fueron identificadas mediante una inspección visual (**Tabla 2**).

Tabla 2.

Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del complejo I

Compuesto	DS	EA [Kcal/mol]	NI	PM	Log P O/A	DH	AH	PSA	ER	Caco-2	MDCK
Timol	-2,40	-28,97	8	150,22	3,30	1	1	20,23	1	3816	2104
Carvacrol	-2,31	-18,84	8	150,22	3,30	1	1	20,23	1	3687	2027
Diadzeína	-3,42	-43,21	7	254,24	0,11	2	6	46,21	2	842	410
Acetina	-3,98	-36,03	12	284,27	0,09	2	6	45,01	2	615	292
Genisteína	-3,52	-43,93	7	270,24	0,05	2	5	58,73	3	468	218
Galangin	-3,40	-33,76	12	270,24	0,58	1	4	56,37	3	398	182
Baicaleína	-3,82	-38,83	10	270,24	0,54	1	3	68,35	3	194	84
Niazirin	-6,35	-34,56	13	279,29	0,05	3	9	102,94	3	166	71
Ácido gálico	-4,57	-17,12	8	170,12	-0,55	1	2	84,38	4	106	43
Picrocrocina	-6,43	-41,14	12	330,38	-0,61	4	12	116,45	4	97	40
Arbutina	-5,58	-32,83	12	272,25	-1,05	5	10	119,61	3	69	27
Scutellarein	-4,39	-43,77	8	286,24	-0,10	2	4	87,23	4	66	26
Ácido elágico	-4,15	-57,48	7	302,20	-1,81	0	6	111,52	4	33	12
Sinigrina	-7,90	-42,86	12	359,37	-1,40	5	14	185,98	13	5	2
Ácido rosmarínico	-5,09	-35,32	11	360,32	1,21	5	7	144,52	7	1	0
NADH	-6,61	-39,20	17	665,45	-3,02	8	25	327,96	16	0	0
Resveratrol	-2,76	-34,50	12	228,25	0,30	3	2	56,65	3	395	181
Doxorrubicina	-7,35	-56,00	17	543,53	-0,39	5	14	214,88	11	2	0
Sorafenib	-1,44	-69,34	20	464,83	2,27	4	6	47,17	0	2316	4665

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de **DS**: docking score del DE; **EA**: energía de afinidad, **NI**: número de interacciones; las reglas de Lipinski, las cuales son: **PM**: peso molecular, **Log P O/A**: coeficiente de octanol-agua, **DH**: número de donadores de puentes de hidrogeno y **AH**: número de aceptores de puentes de hidrogeno, **ASP**: área de superficie polar, **ER**: número de enlaces rotatorios, sus rangos recomendado son 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2 – 20, 7 – 200 y 0 - 15 respectivamente, los valores en rojo se encuentran fuera del rango recomendado; la permeabilidad de los compuestos sobre las células intestinales caco-2 y sobre las células renales MDCK, donde los valores significan, rojo (≤ 25): poca permeabilidad, amarillo: permeabilidad intermedia y verde (≥ 500): alta permeabilidad. Los

compuestos subrayados en rojo fueron seleccionados como los posibles mejores inhibidores del complejo I, los subrayados en naranja son los fármacos de referencia y el subrayado en verde es el inhibidor de referencia.

Como se observa en la **tabla 2**, a pesar de que varios compuestos, entre esos, la sinigrina (DS: -7,90 y EA: -42,86 Kcal/mol), picrocrocina (DS: -6,43 y EA: -41,14 Kcal/mol), niazirin (DS: -6,35 y EA: -34,56 Kcal/mol), arbutina (DS: -5,58 y EA: -32,83 Kcal/mol) y el ácido rosmarínico (DS: -5,09 y EA: -35,32 Kcal/mol), presentaron un mejor DS y EA, fueron seleccionados como los posibles mejores inhibidores del complejo I el timol, carvacrol y ácido gálico, cuyas estructuras químicas se presentan en la **figura 3**, con base en sus propiedades de adsorción (timol: permeabilidad Caco-2: 3816 y permeabilidad MDCK: 2104; carvacrol: permeabilidad Caco-2: 3687 y permeabilidad MDCK: 2027; ácido gálico: permeabilidad Caco-2: 106 y permeabilidad MDCK: 43) e interacciones con residuos importantes en el sitio de unión del NADH (**figura 4**).

Figura 3.

Estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de los complejos I de la cadena respiratoria mitocondrial.

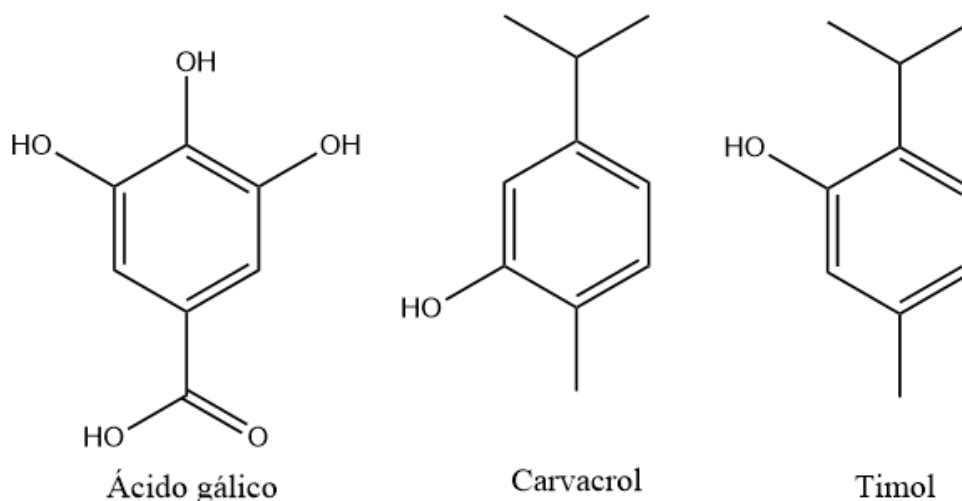
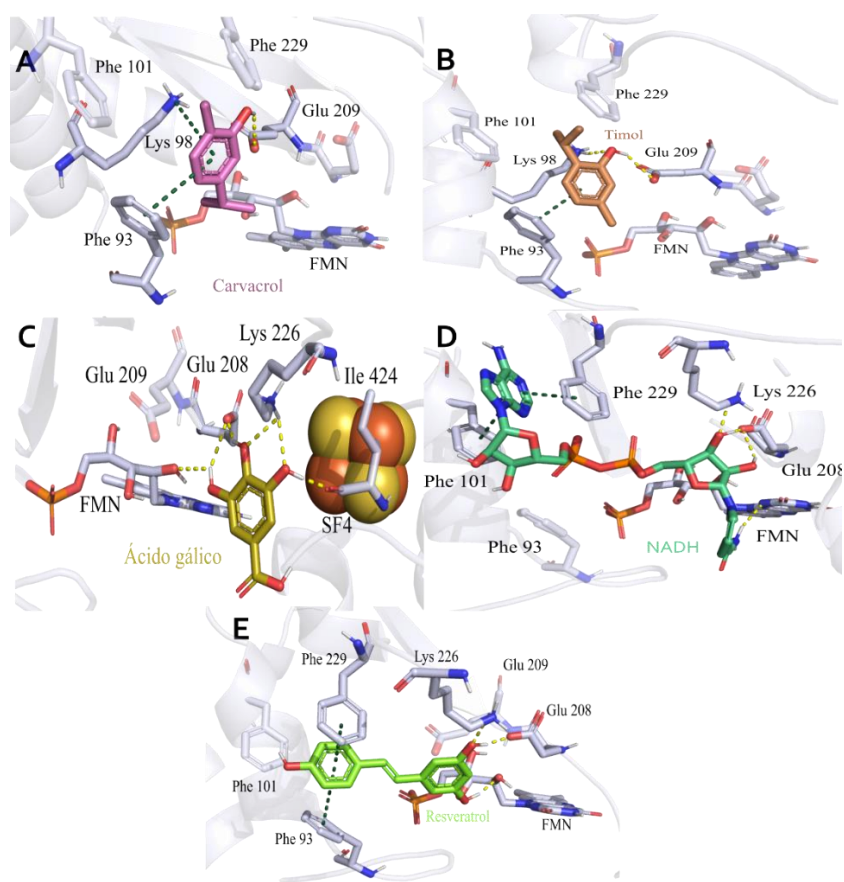


Figura 4.

Poses de acoplamiento representativas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo I y compuestos inhibidores de referencia, obtenidas con el programa Pymol. **A:** carvacrol, **B:** timol, **C:** ácido gálico, **D:** NADH y **E:** resveratrol. Los residuos de la cadena A están coloreados de acuerdo con el tipo de átomo de los residuos de aminoácidos que interactúan (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; azufre, naranja; hierro, marrón). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas de la siguiente manera: las interacciones de los puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo y las interacciones π - π están coloreadas en verde.



El carvacrol y el timol son fenoles monoterpénicos isoméricos, los cuales se les puede encontrar en muchas plantas aromáticas, principalmente en *Thymus vulgaris*, comúnmente

conocida como tomillo, y el ácido gálico es un ácido orgánico que se puede encontrar en *Phyllanthus A.* (Bai et al., 2021; Escobar et al., 2020; Suntres et al., 2015)

Entre los metabolitos seleccionados, el carvacrol (DS: -2,31 y EA: -18,84 Kcal/mol; **Tabla 2**) tuvo una alta permeabilidad sobre las células de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2), las cuales son un modelo de la barrera epitelial intestinal y sobre las células de riñón canino (MDCK), que se consideran un buen imitador de la barrera hematoencefálica, además, según los resultados de las propiedades ADME, este metabolito solo viola dos de las reglas de Lipinski, al tener una cantidad de átomos aceptores de puentes de hidrogeno y de enlaces rotatorios mayor al límite establecido. Las reglas de Lipinski sugieren que las moléculas cuyas propiedades violen más de dos de estas reglas, tendrían menos probabilidad de ser absorbidas por vía oral (Walters, 2012).

Las propiedades que se tienen en cuenta en las reglas de Lipinski son las siguientes: el peso molecular, ya que afecta el paso de los fármacos a través de las membranas celulares; el coeficiente de partición octanol-agua el cual indica la solubilidad en lípidos, y se encuentra altamente relacionado con la capacidad de absorción intestinal de un compuesto; el número de átomos donadores de puentes de hidrógenos y el número de átomos aceptores de puentes de hidrogeno, ya que se ha considerado como un factor importante que afecta la permeabilidad de los fármacos, el área superficial polar (PSA por sus siglas en ingles “*Polar Surface Area*”) y el número de enlaces rotatorios (Zhu et al., 2018).

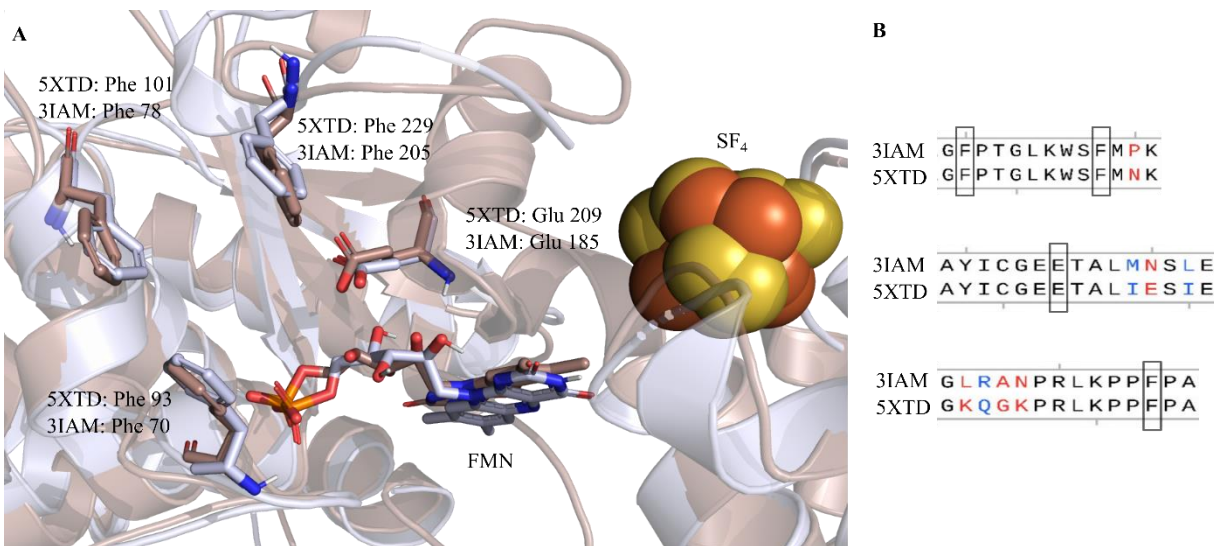
Se ha demostrado en estudios anteriores reportados en la literatura, que al administrar el carvacrol de forma oral a ratas y conejos, este se distribuye en el estómago, intestino y orina y en pequeñas cantidades en el hígado, los pulmones y los músculos (Suntres et al., 2015).

El carvacrol también fue seleccionado como un posible inhibidor del complejo I debido a que según los resultados del docking molecular, podría tener interacciones con residuos reportados como importantes en el sitio de unión del NADH por N. Guenguen y colaboradores en el año 2015 (Phe 93, Phe 101, Phe 229 y Glu 209) (**figura 4A**), estas interacción son las siguientes: una de tipo puente de hidrogeno con Glu 209, interacciones hidrofóbicas con Phe 93, Phe 229 y Phe 101 y una interacción de tipo π - π con Phe 93, además de estas interacciones, también podría tener interacciones hidrofóbicas con Ala 91 y Pro 230, y una interacción π -catión con Lys 98 (Gueguen et al., 2015).

Estos residuos, fueron identificados por N. Guenguen y colaboradores por medio de docking molecular utilizando la estructura cristalina del complejo I de la especie *Thermus thermophilus* (PDBID: 3IAM), y estan nombrados en esta estructura de la siguiente manera: Phe 70, Phe 78, Phe 205 y Glu 185 (Gueguen et al., 2015). En este proyecto de investigación, al hacer el alineamiento entre la estructura 3IAM y 5XTD (empleada en este trabajo) del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial humana, se encontró que los residuos están conservados en la estructura 5XTD como Phe 93, Phe 101, Phe 229 y Glu 209 respectivamente (**figura 5**) (Gueguen et al., 2015).

Figura 5.

A: Residuos importantes en el sitio de unión del NADH en las estructuras proteicas del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, 3IAM de la especie *Thermus thermophilus* (Rosa) y 5XTD de la especie *Homo sapiens* (Gris); **B:** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las estructuras 3IAM y 5XTD, los aminoácidos dentro de los recuadros son los aminoácidos importantes en la unión del NADH.



También cabe mencionar, que en ensayos realizados por Monzote y colaboradores en el año 2009 sobre partículas submitocondriales de corazón bovino, el carvacrol presentó un efecto inhibidor del complejo I, lo cual quiere decir que según los resultados de este proyecto de grado, probablemente esta inhibición se da por la interacción del metabolito con el sitio de unión del NADH (Monzote et al., 2009).

Al igual que el carvacrol, el timol (DS: -2,40 y EA: -28,97 Kcal/mol, **Tabla 2**) presentó una alta permeabilidad sobre las células Caco-2 y MDCK, dos violaciones a las reglas de Lipinski al exceder el número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno y enlaces rotatorios. Además, según la literatura, al administrarlo a conejos es bien adsorbido por su pared intestinal (Placha et al., 2022).

Por otro lado, a partir de los resultados observados en la **figura 4B**, el timol podría interactuar con todos los residuos identificados como importantes en el sitio de unión del NADH, de la misma manera que el carvacrol (puente de hidrógeno con el aminoácido Glu 209, interacciones hidrofóbicas con Phe 93, Phe 229 y Phe 101 y una interacción de tipo π - π con Phe 93), y presentar interacciones hidrofóbicas con Ala 231, Pro 230 y Ala 91.

En el caso del ácido gálico, este no presentó ninguna violación a las reglas de Lipinski, pero tuvo una permeabilidad intermedia sobre las células Caco-2 y MDCK, sin embargo, se obtuvo un docking score y una energía de afinidad para este metabolito igual a -4,57 y -17,12 Kcal/mol, respectivamente. Por otro lado, en ensayos previamente realizados sobre ratas, Bai y colaboradores demostraron que el ácido gálico se distribuye de forma rápida en todos los tejidos, con una mayor concentración en riñones, corazón, hígado, el bazo y los pulmones (Bai et al., 2021).

Los resultados de docking molecular mostrados en la **figura 4C**, sugieren que el ácido gálico podría interactuar por medio de una interacción hidrofóbica con el residuo Glu 209 identificado como importante, y con los residuos Ile 424, Cys 425, y Ala 426 e interactuar por medio de puentes de hidrogeno con Lys 226, Ile 424 y Glu 208 (Gueguen et al., 2015).

Cabe resaltar que, aunque ninguno de los metabolitos seleccionados tuvo un docking score y una energía de afinidad mayor que la obtenida para el NADH (-6,61 y -39,20 Kcal/mol; **Tabla 2**), estos si presentaron interacciones con los residuos Phe 93, Phe 101, Phe 229 y Glu 209, los cuales como ya se mencionó, fueron identificados como importantes en el sitio de unión de esta molécula, es importante mencionar que, en los resultados obtenidos en este trabajo de grado en la **figura 4D**, también se predijo que el NADH podría interactuar con estos residuos mediante las

siguientes interacciones: de tipo π - π con los residuos Phe 101 y Phe 229 e interacciones hidrofóbicas con Phe 101, Phe 229 y Phe 93.

Además, según el docking molecular, el NADH también podría tener interacciones hidrofóbicas con Leu 97, Pro 230, Ala 231, Ala 91, Ala 426 y Cys 425 y puentes de hidrogeno con Glu 208 y Cys 425, siendo el NADH la molécula que tiene mayor número de interacciones (Gueguen et al., 2015).

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en este trabajo de grado, con los obtenidos por N. Guenguen y colaboradores, se llevó a cabo un docking molecular utilizando el resveratrol, cuya molécula identificaron como inhibidora del complejo I, mediante docking molecular y ensayos sobre mitocondrias aisladas de cerebro de ratón (Gueguen et al., 2015).

En los resultados de este trabajo de grado presentados en la **figura 4E**, se obtuvo que el resveratrol (DS: -2,76, EA: -34,5 Kcal/mol; **Tabla 2**) podría presentar interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe 93, Phe 229 y Phe 101, un puente de hidrogeno con el residuo Glu 209 e interacciones π - π con Phe 229 y Phe 93, tal como fue identificado N. Guenguen y colaboradores (Gueguen et al., 2015).

También se llevó a cabo un docking molecular con los fármacos de referencia doxorubicina (DS: -7,35 y EA: -56 Kcal/mol) y sorafenib (DS: -1,44 y EA: -69,3 Kcal/mol; **Tabla 2**) como ligandos, para identificar si estas compuestos pudieran interactuar también con esta diana farmacológica. Cabe resaltar que, entre los resultados obtenidos, estos fármacos tuvieron una energía de afinidad con el sitio de unión del NADH mayor que la de los metabolitos seleccionados carvacrol, timol y ácido gálico.

Sobre estos fármacos, se ha reportado que el sorafenib además de ser un inhibidor de quinasas, puede inducir la apoptosis de las células HepG2 a través de un mecanismo de estrés

oxidativo, provocado por la producción de ROS principalmente en las mitocondrias, y que la doxorubicina además de intercalarse en el ADN, causa un aumento de ROS mitocondrial en cardiomiocitos (Chiou et al., 2009; Gorini et al., 2018). Cabe notar que hasta el momento no se ha reportado un efecto inhibitorio directo de estos fármacos sobre el complejo I, por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de grado, posiblemente estos fármacos podrían causar este efecto al inhibir el sitio de unión del NADH en este complejo.

Las propiedades ADME, los valores de docking score, energía de afinidad e interacciones con residuos en el sitio de unión del NADH obtenidas en este trabajo de grado, y la información reportada en la literatura sobre la biodisponibilidad del carvacrol, el timol y el ácido gálico, los vuelven moléculas atractivas para su implementación en aplicaciones clínicas como el tratamiento contra el cancer, ya que podrían ser absorbidos de forma eficiente por el ser humano, dirigirse a la mitocondria y causar la muerte celular de células cancerígenas (Tomar et al., 2018).

2.2. Complejo III, Sitios Q_o y Q_i .

Igual como se realizó el cribado virtual de la base de datos creada para determinar los posibles mejores inhibidores del complejo I, se llevó a cabo este mismo proceso para el complejo III para cada sitio de unión seleccionado (Q_o y Q_i).

Luego de llevar a cabo el docking molecular con los dos grados de precisión (**anexo B**), fueron seleccionados 15 metabolitos (**tabla 3 y 4**) según los resultados obtenidos de docking score, reglas de Lipinski y numero de interacciones con residuos presentes en cada sitio de unión, para seguido de esto determinar su energía de afinidad.

Tabla 3.

Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del sitio Q_o del complejo III

Compuesto	DS	EA [Kcal/mol]	NI	PM	Log P O/A	DH	AH	ASP	ER	Caco-2	MDCK
Timol	-3,41	-43,59	12	150,22	3,30	1	1	20,23	1	3816	2104
Carvacrol	-4,03	-16,29	16	150,22	3,30	1	1	20,23	1	3687	2027
Diadzeína	-4,78	-26,55	20	254,24	0,11	2	6	46,21	2	842	410
Crisina	-5,14	-44,84	17	254,24	0,24	1	4	70,67	1	615	292
Hidroxitirosol	-6,23	-26,66	15	154,16	1,28	3	3	60,69	2	533	250
Genisteína	-5,40	-27,02	19	270,24	0,05	2	5	58,73	3	468	218
Camptotecina	-4,80	-47,76	23	348,36	1,74	1	8	97,98	2	446	206
Ácido protocatequico	-3,34	-2,97	14	154,12	-0,45	1	2	77,76	1	246	108
Baicaleína	-6,54	-40,75	17	270,24	0,54	1	3	68,35	3	194	84
Piceatannol	-4,78	-33,94	15	244,25	-0,28	4	3	80,92	2	170	73
Brasilín	-6,02	-26,58	19	286,28	1,30	4	4	96,24	4	137	57
Arbutina	-6,04	-28,14	19	272,25	-1,05	5	10	119,61	3	69	27
Scutellarein	-4,15	-25,33	20	286,24	-0,10	2	4	87,23	4	66	26
Ácido elágico	-9,35	-55,7	17	302,20	-1,81	0	6	111,52	4	33	12
Sinigrina	-6,53	-36,44	19	359,37	-1,40	5	14	185,98	13	5	2
Rapanona	-0,82	-37,1	21	322,44	4,39	0	2	58,39	2	518	243
Doxorrubicina	-6,54	-81,56	19	543,53	-0,39	5	14	214,88	11	2	0
Sorafenib	1,07	-61,97	22	464,83	2,27	4	6	47,17	0	2316	4665

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de **DS**: docking score del DE; **EA**: energía de afinidad, **NI**: número de interacciones; las reglas de Lipinski, las cuales son: **PM**: peso molecular, **Log P O/A**: coeficiente de octanol-agua, **DH**: número de donadores de puentes de hidrogeno y **AH**: número de aceptores de puentes de hidrogeno, **ASP**: área de superficie polar, **ER**: número de enlaces rotatorios, sus rangos recomendado son 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20, 7 – 200 y 0 - 15 respectivamente, los valores en rojo se encuentran fuera del rango recomendado; la permeabilidad de los compuestos sobre las células intestinales caco-2 y sobre las células renales MDCK, donde los valores significan, rojo(≤ 25): poca permeabilidad, amarillo: permeabilidad intermedia y verde(≥ 500): alta permeabilidad. Los compuestos subrayados en rojo fueron seleccionados como los posibles mejores inhibidores del sitio Q_o del complejo III, los subrayados en naranja son los fármacos de referencia y el subrayado en verde es el inhibidor de referencia.

Tabla 4.

Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del sitio Qi del complejo III

Compuesto	DS	EA [Kcal/mol]	NI	PM	Log P O/A	DH	AH	ASP	ER	Caco-2	MDCK
Harmina	-4,03	-47,23	12	212,25	1,60	2	3	37,91	1	5309	3006
Acetato de carvacrilo	0,01	-30,11	17	192,26	2,84	0	3	26,30	3	4238	2356
Timol	-5,01	-28,73	8	150,22	3,30	1	1	20,23	1	3816	2104
Carvacrol	-5,22	-34,07	7	150,22	3,30	1	1	20,23	1	3687	2027
Indol-3-carbinol	-6,88	-29,28	15	147,18	0,96	2	2	36,02	1	2557	1368
Formonetol	-6,49	-31,47	13	268,27	0,49	2	6	59,67	2	2463	1311
Biocanina A	-5,82	-42,47	16	284,27	0,45	2	6	79,90	2	1370	695
Diadzeína	-6,69	-38,54	15	254,24	0,11	2	6	46,21	2	842	410
Genistéina	-7,59	-30,63	12	270,24	0,05	2	5	58,73	3	468	218
Aloe-emodina	-7,62	-33,95	14	270,24	0,14	2	6	94,83	1	430	199
Ácido protocatequico	-4,17	-4,78	10	154,12	-0,45	1	2	77,76	1	246	108
Apigenina	-6,81	-35,07	13	270,24	0,10	1	4	90,90	1	210	91
Niazirin	-8,42	-41,56	15	279,29	0,05	3	9	102,94	3	166	71
Kaempferol	-7,96	-39,14	13	286,24	0,41	1	4	111,13	1	136	57
Ácido gálico	1,62	11,02	8	170,12	-0,55	1	2	84,38	4	106	43

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de **DS**: docking score del DE; **EA**: energía de afinidad, **NI**: número de interacciones; las reglas de Lipinski, las cuales son: **PM**: peso molecular, **Log P O/A**: coeficiente de octanol-agua, **DH**: número de donadores de puentes de hidrogeno y **AH**: número de aceptores de puentes de hidrogeno, **ASP**: área de superficie polar, **ER**: número de enlaces rotatorios, sus rangos recomendado son 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2 – 20, 7 – 200 y 0 - 15 respectivamente, los valores en rojo se encuentran fuera del rango recomendado; la permeabilidad de los compuestos sobre las células intestinales caco-2 y sobre las células renales MDCK, donde los valores significan, rojo(≤ 25): poca permeabilidad, amarillo: permeabilidad intermedia y verde(≥ 500): alta permeabilidad. Los compuestos subrayados en rojo fueron seleccionados como los posibles mejores inhibidores del sitio Qi del complejo III

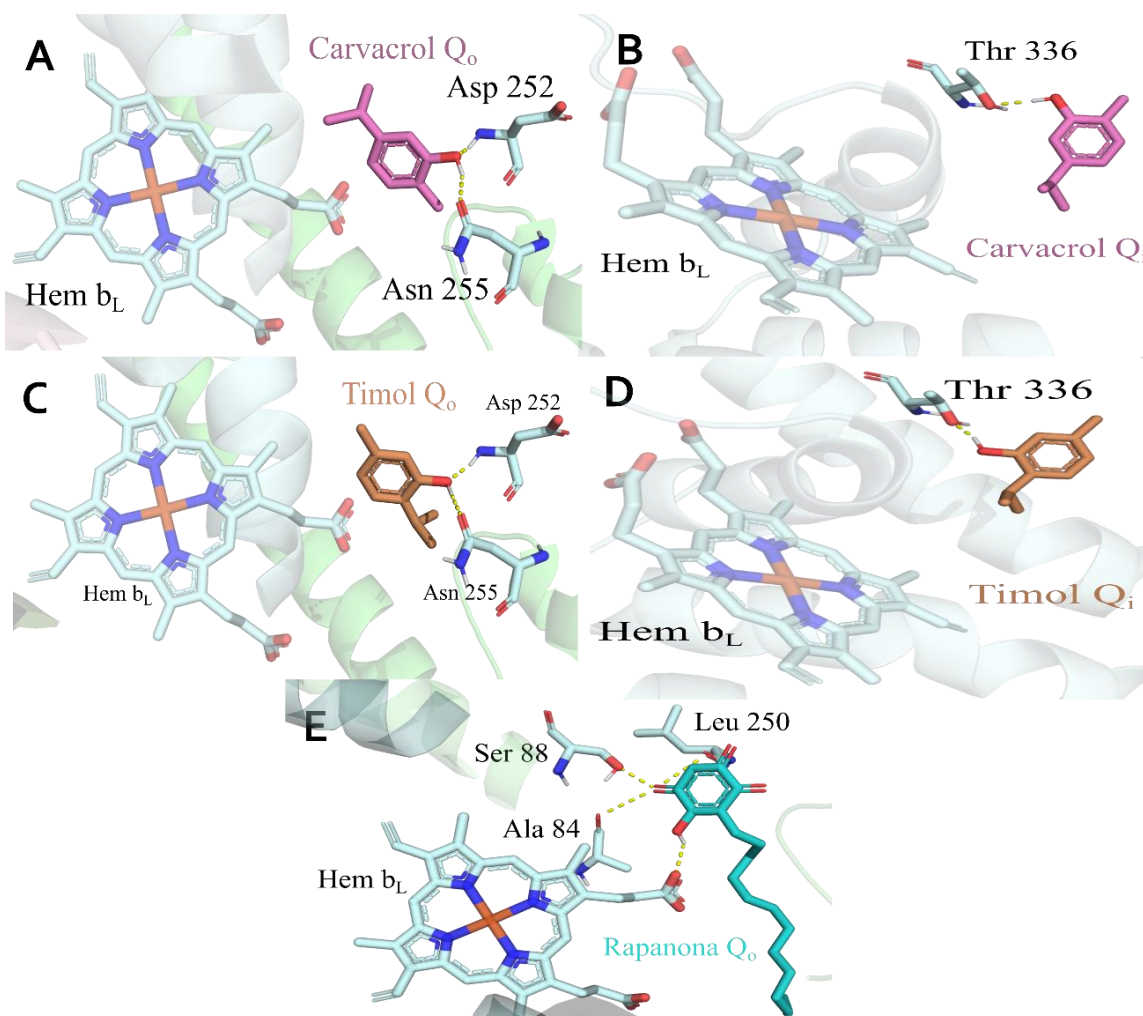
A pesar de que, entre estos metabolitos, el ácido elágico (DS: -9,35 y EA: -55,7 Kcal/mol), la baicaleína (DS: -6,54 y EA: -40,7 Kcal/mol) y la sinigrina (DS: -6,53 y EA: -36,4 Kcal/mol) fueron los que presentaron los mejores docking score o energía de afinidad, fueron seleccionados el carvacrol y el timol como los posibles mejores inhibidores del sitio Q_o del complejo III, ya que fueron los que obtuvieron la mejor absorción (**tabla 3**).

Asimismo, a pesar de que algunos metabolitos como por ejemplo el niazirin (DS: -8,42 y EA: -41,6 Kcal/mol), el kaempferol (DS: -7,96 y EA: -39,1 Kcal/mol) y la aloe-emodina (DS: -7,62 y EA: -33,9 Kcal/mol) obtuvieron mejores valores de docking score y energía de afinidad con el sitio Q_i, también fueron seleccionados el carvacrol y el timol como los posibles mejores inhibidores de este sitio, debido a que aparte de la harmina (DS: -4,03 y EA: -47,2 Kcal/mol) y el acetato de carvacrilo (DS: 0,01 y EA: -30,11 Kcal/mol), cuyos valores de docking fueron menores, obtuvieron la mejor absorción (**tabla 4**).

Además, estos metabolitos (carvacrol y timol) también fueron seleccionados como los posibles mejores inhibidores de los sitio Q_o y Q_i del complejo III, debido a las interacciones que según el docking podrían tener con residuos presentes en estos sitios de unión (**figura 6**).

Figura 6.

Poses de acoplamiento representativas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo III y la rapanona, obtenidos con el programa Pymol. **A:** carvacrol sitio Q_o , **B:** carvacrol sitio Q_i , **C:** timol sitio Q_o , **D:** timol sitio Q_i y **E:** rapanona sitio Q_o . En la imagen los residuos de las cadenas están coloreados de acuerdo con el tipo de átomo de los residuos de aminoácidos que interactúan (carbono de la cadena J, cian pálido; carbono de la cadena H, verde pálido; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; azufre, naranja; hierro, marrón). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas de la siguiente manera: las interacciones de los puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo.



Entre estos metabolitos, según las propiedades ADME el carvacrol (Sitio Q_o , DS: -4,03 y EA: -16,29 Kcal/mol ;sitio Q_i , DS: -5,22 y EA: -34,07 Kcal/mol) podría tener una buena absorción

por vía oral y ser capaz de penetrar hasta la mitocondria, además que según los resultados de docking molecular podría interactuar de la siguiente manera con residuos presentes en los sitios Q_o y Q_i del complejo III: sitio Q_o (**figura 6A**), puentes de hidrogeno con los residuo Asp 252 y Asp 255 e interacciones hidrofóbicas con: Tyr 256, Pro 253, Met 138, Tyr 131, Leu 250, Trp 272, Tyr 273, Ala 87 y Ala 84; sitio Q_i (**figura 6B**), un puente de hidrogeno con Thr 336 e interacciones hidrofóbicas con Leu 333, Leu 332, Ala 329, Phe 276, Tyr 273 y Phe 95.

Por otro lado, el timol (Sitio Q_o , DS: -3,41 y EA: -43,59 Kcal/mol ;sitio Q_i , DS: -5,01 y EA: -28,73 Kcal/mol) también podría ser capaz de penetrar hasta la mitocondria e interactuar con los sitios Q_o y Q_i del complejo III de la siguiente manera: sitio Q_o (**figura 6C**): puentes de hidrogeno con Asn 255 y Asp 252 e interacciones hidrofóbicas con Tyr 256, Tyr 131, Tyr 273 y Ala 84; sitio Q_i (**figura 6D**): un puente de hidrogeno con Thr 336 e interacciones hidrofóbicas con Leu 333, Leu 332, Ala 329, Phe 276, Tyr 273, Phe 95, Trp 272.

En el caso del complejo III, se seleccionó la Rapanona (Sitio Q_o , DS: -0,82 y EA: -37,10) como inhibidor de referencia de los sitios Q_o y Q_i , ya que fue identificada por G. Pardo Andreu y colaboradores por ensayos sobre mitocondrias aisladas de hígado de rata y mediante docking molecular, utilizando la estructura cristalina 5XTE obtenida de la PDB de la especie Homo Sapiens, la cual se utilizó también en el docking llevado a cabo en este trabajo de grado (Pardo Andreu et al., 2020).

Según los resultados la rapanona podría inhibir el complejo III, uniéndose principalmente al sitio Q_o , probablemente al presentar las siguientes interacciones con residuos presentes en la cadena J de este complejo (**figura 6E**): puentes de hidrogeno con: Ser 88, Asp 252, Ala 84, Leu 250 y el grupo Hem B_L e interacciones hidrofóbicas con: Ala 84, Tyr 273, Trp 272, Leu 250, Gly 251, Tyr 131, Tyr 256, Phe 63, Pro 134, Ile 66, Gly 136, Ala 67 y Tyr 199.

Entre los resultados obtenidos en este trabajo de grado para el sitio Q_o, tanto el carvacrol como el timol obtuvieron un docking score mayor que el de la rapanona, y el timol una energía de afinidad mayor, además al comparar los resultados obtenidos, estos metabolitos interactuaron al igual que la rapanona con los siguientes residuos: Asp 252, Tyr 256, Tyr 131, Leu 250, Trp 272, Tyr 272, Ala 84, Asp 252, Glu 271, Arg 80, Ser 88 y Asn 255.

A diferencia de los resultados obtenidos por G. Pardo Andreu y colaboradores, los resultados de este trabajo de grado sugieren que la rapanona tiene poca afinidad con el sitio Q_i, por tal motivo, no se obtuvo una pose de acoplamiento representativa para este sitio. Cabe resaltar que, aunque los metabolitos seleccionados como inhibidores de este complejo si presentaron afinidad con el sitio Q_o y Q_i, fue menor el número de interacciones con el sitio Q_i en comparación con el sitio Q_o, lo cual quiere decir que al igual que la rapanona tuvieron menor afinidad con los residuos presentes en este sitio de unión.

También se llevó a cabo el docking molecular con los fármacos de referencia doxorubicina (Sitio Q_o, DS: -6,54 y EA: -81,56) y sorafenib (Sitio Q_o, DS: 1,07 y EA: -61,97), donde solo se obtuvo resultados para el sitio Q_o. Cabe resaltar que el fármaco de referencia doxorubicina, obtuvo una energía de afinidad y docking score con el sitio Q_o mayor que la de los metabolitos seleccionados y la rapanona, además que el sorafenib fue el segundo compuesto con mejor energía de afinidad, a pesar de que obtuvo un docking score positivo, el cual fue 1,07 (**tabla 3**), esto es debido a que en el caso de la energía de afinidad, esta se calcula teniendo en cuenta la contribución energética del ligando, la proteína y el complejo proteína ligando, en cambio, el docking score es solo una aproximación de la energía de enlace proteína-ligando. Por lo tanto, según estos resultados, probablemente estos fármacos también podrían interactuar con el complejo III de la cadena respiratoria.

3. Conclusión

A partir de los resultados anteriormente mencionados de docking molecular, es posible que el carvacrol, el timol y el ácido gálico, puedan dirigirse a la mitocondria e inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por tal motivo, se seleccionaron estos compuestos, para realizar ensayos de citotoxicidad sobre las células HepG2.

CAPITULO 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA Y SINERGISMO

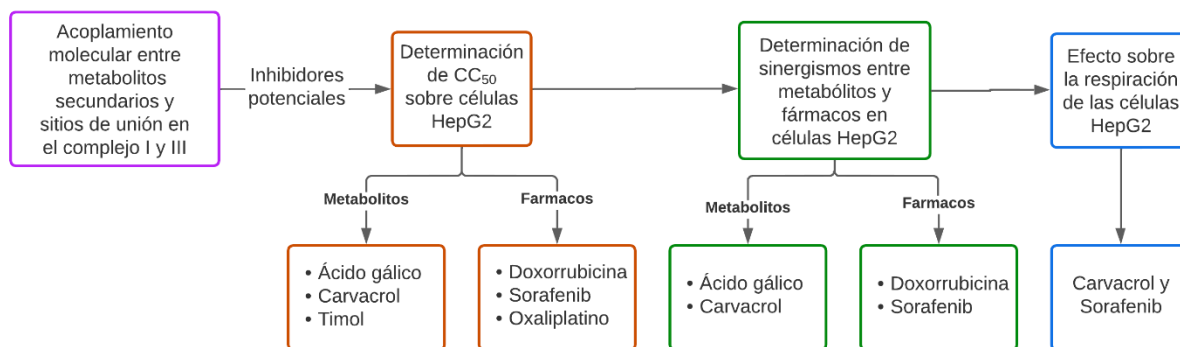
A partir de los resultados obtenidos en la fase *in silico*, se seleccionaron los metabolitos carvacrol, timol, y ácido gálico como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondria, los cuales fueron evaluados en la fase *in vitro*, mediante la siguiente metodología.

1. Metodología fase *in vitro*

Esta fase se desarrolló siguiendo el diagrama metodológico descrito en la **figura 7**. En primer lugar, se prosiguió a determinar el CC_{50} , a 48 horas de tratamiento sobre células HepG2, de los metabolitos seleccionados carvacrol, timol y ácido gálico y los fármacos, doxorubicina, oxaliplatino y sorafenib. Posteriormente, se evaluó el posible sinergismo entre estos compuestos al exponer las células HepG2 a diferentes mezclas entre ellos, y por último de determinó el efecto de la mejor mezcla obtenida sobre la respiración de esta línea celular.

Figura 7.

Diagrama metodológico de la fase in vitro



1.1.Cultivo celular.

Las células HepG2 se cultivaron en botellas de plástico con medio EMEM (pH 7,3) suplementado con gentamicina 100 µg/mL y 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, los cultivos se mantuvieron a 37°C y atmosfera de 5% de CO₂, además los subcultivos se realizaron usando una solución de tripsina-EDTA (pH 7,3).

1.2.Evaluación de citotoxicidad.

La viabilidad celular en HepG2 se evaluó por el método colorimétrico MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) descrito por Mossmann (Mossmann, 1983). Las células se sembraron en placas de 96 pozos (1,2*10⁴ células/pozo) y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de cada fármaco de referencia y metabolito seleccionado como posible inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial.

Después de 12, 24 y 48 horas de exposición a los compuestos, se descartó el sobrenadante de los pozos, se agregó 50 µL de MTT (0,5 mg/mL en solución salina de Hanks, HBSS) y se incubaron las placas durante 3 horas. Luego se retiró la solución de MTT y se agregó 100 µL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales formados por la células viables y metabólicamente activas, las cuales redujeron la sal de tetrazolio (amarilla) formando cristales de formazán (violeta) solubles en DMSO, que se cuantificaron a 570 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo.

Los resultados de viabilidad celular se expresaron como un porcentaje de viabilidad respecto al control, además, con estos resultados se calculó el CC₅₀ (concentración a la cual se

disminuye la viabilidad a un 50%) de cada metabolito o fármaco, a los diferentes tiempos de exposición. (Moo-Puc 2009).

1.3.Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármacos de referencia para el tratamiento del CHC.

Luego de conocer el CC_{50} a las 48 horas de tratamiento con cada uno de los compuestos, se determinó el efecto sobre la viabilidad de las células HepG2 al exponer las células a combinaciones entre metabolitos (carvacrol y ácido gálico) fármacos (doxorubicina y sorafenib), siguiendo el esquema metodológico de T. Chou (Chou, 2007).

Estas combinaciones se evaluaron en tres concentraciones distintas de los compuestos, manteniendo una relación de concentración equivalente entre ellos, las cuales fueron $0,25CC_{50}$, $0,5CC_{50}$ y CC_{50} , para combinaciones binarias; $0,17CC_{50}$, $0,33CC_{50}$ y $0,67CC_{50}$, para combinaciones terciarias; y $0,13CC_{50}$, $0,25CC_{50}$ y $0,5CC_{50}$, para combinaciones cuaternarias.

Finalmente, utilizando estos resultados y la herramienta CompuSyn, se determinó el índice de combinación (IC) y el índice de reducción de la dosis (DRI por sus siglas en ingles “*dose-reduction index*”) de cada concentración de cada mezcla. El IC indica el tipo de interacción que puede haber entre los constituyentes de una mezcla, cuando es menor que 1, igual a 1 o mayor que 1, nos indica, sinergismo, efecto aditivo o antagonismo, respectivamente. Por su parte, el DRI es una medida de cuantas veces se puede reducir la dosis de cada droga en una mezcla, para obtener un efecto comparado al obtenido para cada droga por separado (Chou, 2007).

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

HepG2.

Con el fin de evaluar el efecto en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, de la mezcla sinérgica seleccionada por tener los mejores resultados sobre la viabilidad de las células HepG2, se realizaron ensayos de determinación de respiración celular.

Para esto, las células fueron expuestas a una concentración igual al $0,25CC_{50}$ de la mezcla entre carvacrol y sorafenib (carvacrol: $86 \mu\text{M}$ y sorafenib: $0,725 \mu\text{M}$) por un periodo de 24 horas. Después, las células fueron aisladas con 1 mL de tripsina, y resuspendidas en medio de cultivo EMEM. El consumo de oxígeno fue determinado mediante un equipo Oxygraph-2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria) dotado con dos cámaras de oxígeno a 37°C bajo agitación constante, y se determinó el efecto de la mezcla en tres estados denominados: basal, respiración en ausencia de inhibidores y/o desacopladores; leak, respiración en presencia de oligomicina ($2,5 \text{ mg/mL}$); y desacoplado, el consumo de oxígeno en presencia del desacoplador FCCP ($4 \mu\text{M}$).

También se determinó el flujo de oxígeno de la respiración no mitocondrial, que se obtuvo con la adición de rotenona ($1 \mu\text{M}$) y antimicina ($5,5 \mu\text{g/mL}$) (Meira, Heinrich, Maria, Correia, & Martinez, 2017). Los resultados son expresados como la media del porcentaje del flujo de oxígeno por número de células ($\text{pmol/ (seg} * 1 \times 10^6 \text{ células)}$) \pm DS.

1.5.Análisis estadístico.

Para todos los experimentos se realizaron al menos tres ensayos independientes, por triplicado cada uno y se representaron por la media \pm su desviación estándar (DE). Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software GraphPad Prism 8 mediante un análisis de varianza

(ANOVA) en una vía, luego se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de las medidas. Los resultados con un valor $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos respecto al control. Las gráficas fueron generadas usando GraphPad versión 8 para Windows (San Diego, California USA, www.graphpad.com).

2. Consideraciones éticas

2.1. Disposición adecuada de los residuos o desechos químicos.

Teniendo en cuenta el principio de no maleficencia y con el objetivo de evitar cualquier impacto sobre el medio ambiente y los investigadores de este proyecto, los residuos biológicos y/o químicos que se generaron en el desarrollo de este trabajo de grado, 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) de la universidad industrial de Santander, órgano institucional que se encarga de velar por la aplicación de estrategias preventivas en cumplimiento con las normas legales para el manejo adecuado de los residuos peligrosos.

Los fármacos, metabolitos, reactivos, solventes y colorantes que se usaron en esta investigación se clasificaron como residuos químicos peligrosos debido a que pueden ser citotóxicos y causar daño a la salud humana y/o el medio ambiente. Asimismo, se consideraron peligrosos los envases, empaques o embalajes que estuvieron en contacto con ellos. Por tal razón, teniendo en cuenta el código de colores para el almacenamiento de sustancias, los residuos se dispusieron en bolsas de color rojo, se etiquetaron con el rotulo “riesgo químico” y se entregaron en la ruta de recolección y almacenamiento de residuos peligrosos organizada por el PGIR en el

parque tecnológico Guatiguara, diligenciando el formato FGA.06 para su disposición final a la empresa contratada para su neutralización e incineración. Por su parte, los residuos biosanitarios (p. ej. Botellas de cultivo, microplacas.) estuvieron clasificados como residuos infecciosos o de riesgo biológico de acuerdo con el Manual de gestión integral de residuos, por esta razón fueron dispuestos en bolsa de color rojo con el rotulo “riesgo biológico”.

Por otro lado, se implementaron insumos tales como guantes de látex y gafas de seguridad, con el objetivo de prevenir cualquier contacto con los compuestos que se utilizaron en este proyecto de investigación, además de los implementos necesarios obligatorios para trabajar en el laboratorio, entre esos zapatos cerrados y bata de laboratorio.

2.2.Ensayos con células.

De acuerdo con los principios establecidos en las normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC) (INVIMA, 2009), este trabajo de grado corresponde a un estudio no clínico y siguió orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC, además, según la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del ministerio de salud de la república de Colombia, se considera sin riesgo de acuerdo con el artículo 11 de esta última resolución (INVIMA, 1993).

Adicionalmente, mediante ensayos dosis respuesta en células cultivadas *in vitro*, y siguiendo con los objetivos propuestos, en este plan de trabajo de grado se logró identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencializaron el efecto anticanceroso de fármacos utilizados en el cancer de hígado, para de esta manera, impactar de forma favorable en el tratamiento contra este cancer. Estas células fueron donadas por la fundación cardiovascular de Colombia a la profesora de la escuela de química, Stelia Carolina Mendez Sánchez, cabe aclarar que la FCV las obtuvo de forma comercial de la ATCC (del inglés American Type Culture Collection).

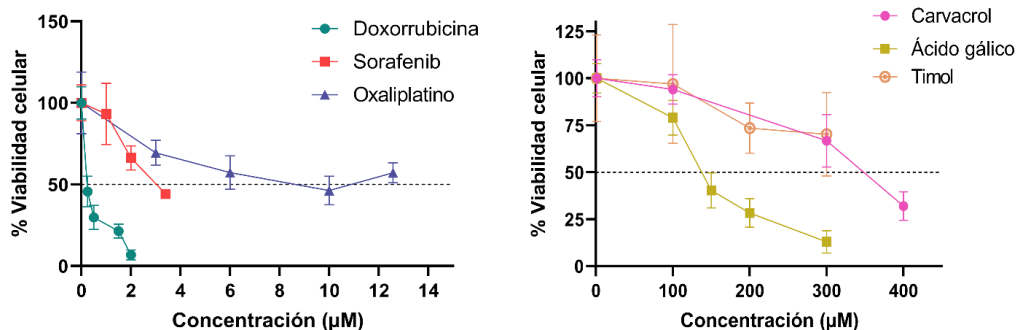
3. Resultados y discusión

3.1. Determinación de CC₅₀.

Luego de seleccionar el carvacrol, timol y ácido gálico como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad sobre células HepG2, las cuales fueron expuestas durante 48 horas de tratamiento a diferentes concentraciones entre 100 y 400 μM de estos metabolitos, y a concentraciones entre 0,25 y 13 μM de los fármacos de referencia doxorubicina, sorafenib y oxaliplatino, teniendo en cuenta concentraciones de citotoxicidad reportadas en la literatura de estos compuestos sobre células HepG2 (Di Sotto et al., 2020; Elshafie et al., 2017; Liao et al., 2018; Lima et al., 2016; Mansour et al., 2021). Como resultados, se obtuvo que la viabilidad de las células disminuyó de forma significativa en forma dosis dependiente, al ser expuestas al carvacrol, el ácido gálico y los fármacos de referencia doxorubicina y sorafenib, tal como se muestra en la (**figura 8**).

Figura 8.

Porcentaje de viabilidad sobre células HepG2 luego de 48 horas Vs. Concentración de los fármacos de referencia a la izquierda, y de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial a la derecha.



Con estos resultados se determinó el CC₅₀ a las 48 horas de los metabolitos carvacrol, ácido gálico y timol, los cuales fueron 344, 143 y 478 µM, respectivamente, y los fármacos, doxorubicina, sorafenib y oxaliplatino, cuyos valores fueron 0,2, 2,9 y 13,0 µM, respectivamente (tabla 5).

Tabla 5.

CC₅₀ a las 48 horas sobre las células HepG2 de cada metabolito seleccionado y fármaco de referencia

Metabolito/Fármaco	CC ₅₀ [µM]
Carvacrol	344
Ácido gálico	143
Timol	478
Doxorrubicina	0,2
Sorafenib	2,9
Oxaliplatino	13,0

Cabe notar que luego de evaluar los compuestos oxaliplatino y timol en concentraciones 3, 6, 10 y 12,6 μM y 100, 200 y 300 μM , respectivamente, estos no lograron disminuir la viabilidad celular por debajo del 50%, razón por la cual fueron descartados para los siguientes ensayos (**figura 8**).

Al igual que en los resultados de citotoxicidad obtenidos en este proyecto de grado, se ha reportado en la literatura que el carvacrol y el ácido gálico disminuyen la viabilidad de las células HepG2 en función de su concentración, y además que lo hacen mediante inducción de apoptosis (Lima et al., 2016; Q. H. Yin et al., 2012). A partir de estos resultados, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad, para determinar si al combinar estos metabolitos con los fármacos sorafenib y doxorrubicina, existe sinergismo entre ellos.

3.2. Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármacos de referencia.

En primer lugar, para determinar el tipo de interacción farmacológica que pudiera haber entre los metabolitos, ácido gálico y carvacrol, y los fármacos, doxorrubicina y sorafenib, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad exponiendo las células HepG2 durante 48 horas a mezclas entre los compuestos previamente mencionados, se realizaron cuatro mezclas binarias que incluían al menos un metabolito y un fármaco, cuatro mezclas terciarias y una mezcla cuaternaria (**tabla 6**).

Tabla 6.

Mezclas realizadas entre los metabolitos ácido gálico y carvacrol y los fármacos doxorrubicina y sorafenib

Constituyentes	Binaria				Terciaria				Cuaternaria
	D+C	S+C	D+G	S+G	C+S+D	G+S+D	C+G+S	C+G+D	C+G+D+S
Carvacrol	x	x			x		x	x	x
Ácido gálico			x	x		x	x	x	x
Doxorrubicina	x		x		x	x		x	x
Sorafenib		x		x	x	x	x		x

Nota: C: carvacrol, G: ácido gálico, D: doxorrubicina y S: sorafenib.

Tomando como referencia el esquema metodológico propuesto por T. Chou (**anexo C**), se evaluaron tres concentraciones distintas de cada mezcla manteniendo una relación de concentración equivalente entre sus constituyentes (Chou, 2007). Para las mezclas binarias, se evaluaron las concentraciones $0,25CC_{50}$, $0,5CC_{50}$ y CC_{50} , para las terciarias: $0,17CC_{50}$, $0,33CC_{50}$ y $0,67CC_{50}$ y para la cuaternaria $0,13CC_{50}$, $0,25CC_{50}$ y $0,5CC_{50}$ (**anexo D**). Estas concentraciones fueron seleccionadas previendo un posible efecto aditivo, por lo que, de ser así, la concentración más alta de estas mezclas disminuiría la viabilidad a un 0%. A partir de estos ensayos, se obtuvo un IC y un DRI de cada concentración evaluada para cada mezcla (**figura 9 y tabla 7**)

Figura 9.

Índice de combinación a las 48 horas sobre células HepG2 Vs. Concentración de las mezclas realizadas para determinación de interacción farmacológica. C: carvacrol, G: ácido gálico, D: doxorrubicina y S: sorafenib.

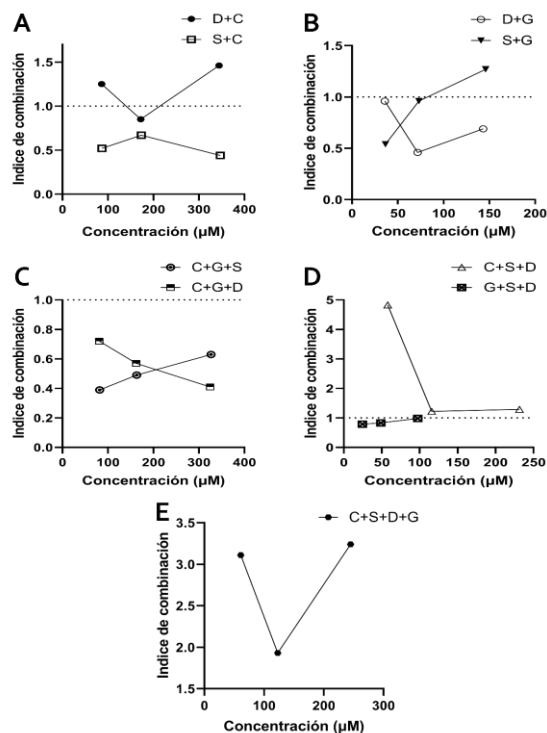


Tabla 7.

Valores de porcentaje de viabilidad celular, Índice de combinación, tipo de interacción e índice de reducción de dosis obtenido al exponer las células HepG2 durante 48 horas a cada mezcla

Mezcla	Metabolito/Fármaco	Concentración	%Viabilidad	IC	Tipo de sinergismo	DRI
Binarias						
D+C	D C	0,25CC ₅₀	77,36	1,25	Antagonismo	1,22 2,32
	D C	0,5CC ₅₀	45,12	0,85	sinergismo moderado	2,67 2,12
	D C	CC ₅₀	39,78	1,46	Antagonismo	1,67 1,16
S+C	S C	0,25CC ₅₀	51,22	0,52	Sinergismo	3,87 3,83
	S C	0,5CC ₅₀	26,99	0,67	Sinergismo	3,00 2,98
	S C	CC ₅₀	2,55	0,44	Sinergismo	4,60 4,57
D+G	D G	0,25CC ₅₀	72,19	0,96	Casi aditivo	1,62 2,95
	D G	0,5CC ₅₀	23,47	0,46	sinergismo	7,42 3,10
	D G	CC ₅₀	15,01	0,69	sinergismo	6,57 1,88
S+G	S G	0,25CC ₅₀	55,71	0,54	sinergismo	3,59 3,79
	S G	0,5CC ₅₀	48,07	0,96	Casi aditivo	2,04 2,11
	S G	CC ₅₀	23,67	1,27	Antagonismo	1,62 1,54
Terciarias						
C+S+D	C S D	0,17CC ₅₀	95,55	4,83	Antagonismo	1,60 1,63 0,28
	C S D	0,33CC ₅₀	58,77	1,22	Antagonismo	2,52 2,56 2,32
	C S D	0,67CC ₅₀	32,99	1,29	Antagonismo	1,98 2,00 3,49
G+S+D	G S D	0,17CC ₅₀	69,09	0,79	sinergismo moderado	4,66 4,23 2,91
	G S D	0,33CC ₅₀	43,87	0,83	sinergismo moderado	3,35 3,29 4,32

	G					2,37
	S	0,67CC ₅₀	22,37	0,98	Casi aditivo	2,51
	D					6,08
	C					7,65
	G	0,17CC ₅₀	34,79	0,39	sinergismo	7,66
	S					7,74
C+G+S	C					6,30
	G	0,33CC ₅₀	14,06	0,49	sinergismo	5,78
	S					6,37
	C					5,02
	G	0,67CC ₅₀	5,16	0,63	sinergismo	4,24
	S					5,07
	C					4,47
	G	0,17CC ₅₀	65,42	0,72	sinergismo moderado	4,93
	D					3,46
C+G+D	C					4,42
	G	0,33CC ₅₀	27,47	0,57	sinergismo	4,22
	D					9,16
	C					5,70
	G	0,67CC ₅₀	3,88	0,41	sinergismo	4,70
	D					46,73
Cuaternaria						
	C					2,44
	G	0,13CC ₅₀	93,96	3,11	Antagonismo	3,16
	D					0,50
	S					2,48
C+G+D+S	C					2,42
	G	0,25CC ₅₀	75,66	1,93	Antagonismo	2,77
	D					1,34
	S					2,45
	C					1,36
	G	0,5CC ₅₀	70,28	3,24	Antagonismo	1,52
	D					0,89
	S					1,37

Nota: IC: Índice de combinación, DRI: Índice de reducción de dosis. Los IC menores que 1, están coloreados de color verde y los mayores que 1, de color rojo. C: carvacrol, G: ácido gálico, D: doxorubicina y S: sorafenib.

Como se observa en la **figura 9A** y la **tabla 7**, al combinar el sorafenib con el carvacrol (S+C) se obtuvo un IC entre 0,3 y 0,7 en todas las concentraciones evaluadas, lo que nos indica un sinergismo entre ellos, además, según el DRI al combinar estos compuestos, su dosis se podría disminuir hasta 4 veces y mantener altos porcentajes de citotoxicidad en HepG2. Por otro lado, al combinar el sorafenib con el ácido gálico (S+G) (**figura 9B** y **tabla 7**) solo hubo sinergismo al

evaluar la concentración de $0,25CC_{50}$, donde se obtuvo un IC igual a 0,54; en las concentraciones del $0,5CC_{50}$ (IC: 0,96) e IC_{50} (IC:1,27) hubo un efecto casi aditivo y antagonismo, respectivamente, y según el DRI sus concentraciones podrían reducirse hasta tres veces.

En el caso de la doxorubicina, al combinarla con el carvacrol (D+C) (**figura 9A** y la **tabla 7**) solo tuvo sinergismo moderado en el $0,5CC_{50}$ con un IC igual a 0,85; en la concentración del $0,25CC_{50}$ (IC: 1,25) y CC_{50} (IC: 1,46) tuvieron un efecto antagonista, y según el DRI, las concentraciones de estos compuestos solo podrían disminuirse dos veces para obtener este efecto. Por otro lado, al combinar la doxorubicina con el ácido gálico (D+G) (**figura 9B** y **tabla 7**), se produjo un efecto sinérgico en las concentraciones del $0,5CC_{50}$ (IC: 0,46) y CC_{50} (IC: 0,69), y un efecto casi aditivo en la concentración del $0,25CC_{50}$ con un IC igual a 0,96. Además, según el DRI, la concentración de la doxorubicina y el ácido gálico en esta mezcla se podría disminuir hasta siete y tres veces, respectivamente, y, aun así, obtener un efecto sinérgico.

En el caso de las mezclas terciarias, solo la combinación de carvacrol, ácido gálico y sorafenib (C+G+S) (**figura 9C** y **tabla 7**) produjo sinergismo en las tres concentraciones evaluadas, cuyo IC se encontró entre 0,39 y 0,63, pudiéndose disminuir la dosis de estos compuestos hasta siete veces para seguir obteniendo un efecto sinérgico. Seguida de esta mezcla, la combinación de carvacrol, ácido gálico y doxorubicina (C+G+D) (**figura 9C** y **tabla 7**) produjo sinergismo en las concentraciones del $0,5CC_{50}$ (IC: 0,57) y CC_{50} (IC: 0,41), y sinergismo moderado en el $0,25CC_{50}$ con un IC igual a 0,72. Además, según los resultados, la dosis de la doxorubicina, el carvacrol y el ácido gálico se podría disminuir hasta 46, 5 y 4 veces, respectivamente.

De forma contraria, en las mezclas terciarias donde se combinaron los fármacos doxorubicina y sorafenib con alguno de los dos metabolitos seleccionados, solo se llegó a obtener

sinergismo moderado, posiblemente debido a un antagonismo en el modo de acción de cada uno de estos fármacos.

La combinación entre ácido gálico, sorafenib y doxorubicina (G+S+D) (**figura 9D** y **tabla 7**), presentó un efecto casi aditivo en la concentración CC_{50} con un IC igual a 0,98 y sinergismo moderado en las concentraciones del $0,25CC_{50}$ (IC: 0,79) y $0,5CC_{50}$ (IC: 0,83). Por otro lado, la mezcla entre carvacrol, sorafenib y doxorubicina (C+S+D) (**figura 9D** y **tabla 7**), presentó un efecto antagonista en todas las concentraciones ($0,25CC_{50}$, IC:4,83; $0,5CC_{50}$, IC:1,22 y CC_{50} , IC:1,29), lo cual concuerda con los resultados obtenidos de IC en la mezcla binaria entre doxorubicina y carvacrol, ya que existe un efecto antagonista al combinar estos compuestos.

Finalmente, en la mezcla cuaternaria (C+S+D+G) (**figura 9E** y **tabla 7**), se identificó un efecto antagonista en las tres concentraciones evaluadas ($0,25CC_{50}$, IC: 3,11; $0,5CC_{50}$, IC: 1,93 y CC_{50} , IC: 3,24), probablemente debido al efecto antagonista entre la doxorubicina y el carvacrol previamente descrito.

Para determinar si este efecto antagonista también está relacionado con una inhibición entre el ácido gálico y carvacrol, se evaluó la citotoxicidad de esta mezcla binaria. Los resultados obtenidos indican que efectivamente, según el IC determinado para las concentraciones de $0,5CC_{50}$ (2,37) y CC_{50} (1,79) hay un efecto antagonista, además, cabe resaltar que el porcentaje de viabilidad celular de las células al exponerlas a una concentración del $0,25CC_{50}$, fue mayor al 100% (**tabla 8**).

Tabla 8.

Valores de porcentaje de viabilidad celular, Índice de combinación, tipo de sinergismo e índice de reducción de dosis, obtenido al exponer las células HepG2 durante 48 horas a la mezcla entre ácido gálico y carvacrol

Metabolito/Fármaco	Concentración	% Viabilidad	IC	Tipo de sinergismo	DRI
C	0,25CC ₅₀	117,95	-	-	-
G					-
C	0,5CC ₅₀	90,25	2,37	Antagonismo	0,76
G					0,95
C	CC ₅₀	42,98	1,79	Antagonismo	1,1
G					1,13

Nota: IC: Índice de combinación, DRI: Índice de reducción de dosis. Los IC menores que 1, están coloreados de color verde y los mayores que 1, de color rojo. **C:** carvacrol y **G:** ácido gálico.

Una vez seleccionadas las mezclas binarias: sorafenib-carvacrol, sorafenib-ácido gálico, y doxorubicina-ácido gálico; las mezclas terciarias: carvacrol-ácido gálico-sorafenib, ácido gálico-sorafenib-doxorrubicina, y carvacrol-ácido gálico-doxorrubicina, como las mejores debido a los resultados de índice de combinación presentados anteriormente, se decidió evaluar el efecto de estas mezclas en la viabilidad celular a un tiempo de tratamiento menor a las 48 horas, por lo que se realizaron ensayos de citotoxicidad a las 12 y 24 horas. Los resultados obtenidos de estos ensayos para las mezclas binarias se exponen en la **figura 10**, y los obtenidos para las mezclas terciarias en la **figura 11**.

Figura 10.

Porcentaje de viabilidad celular sobre las células HepG2 de tres concentraciones de las mezclas binarias, 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. **A:** sorafenib-carvacrol, **B:** sorafenib-ácido gálico y **C:** doxorrubicina-ácido gálico. Los resultados están expresados como el promedio ± la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba post hoc de Tukey, *P <0,05.

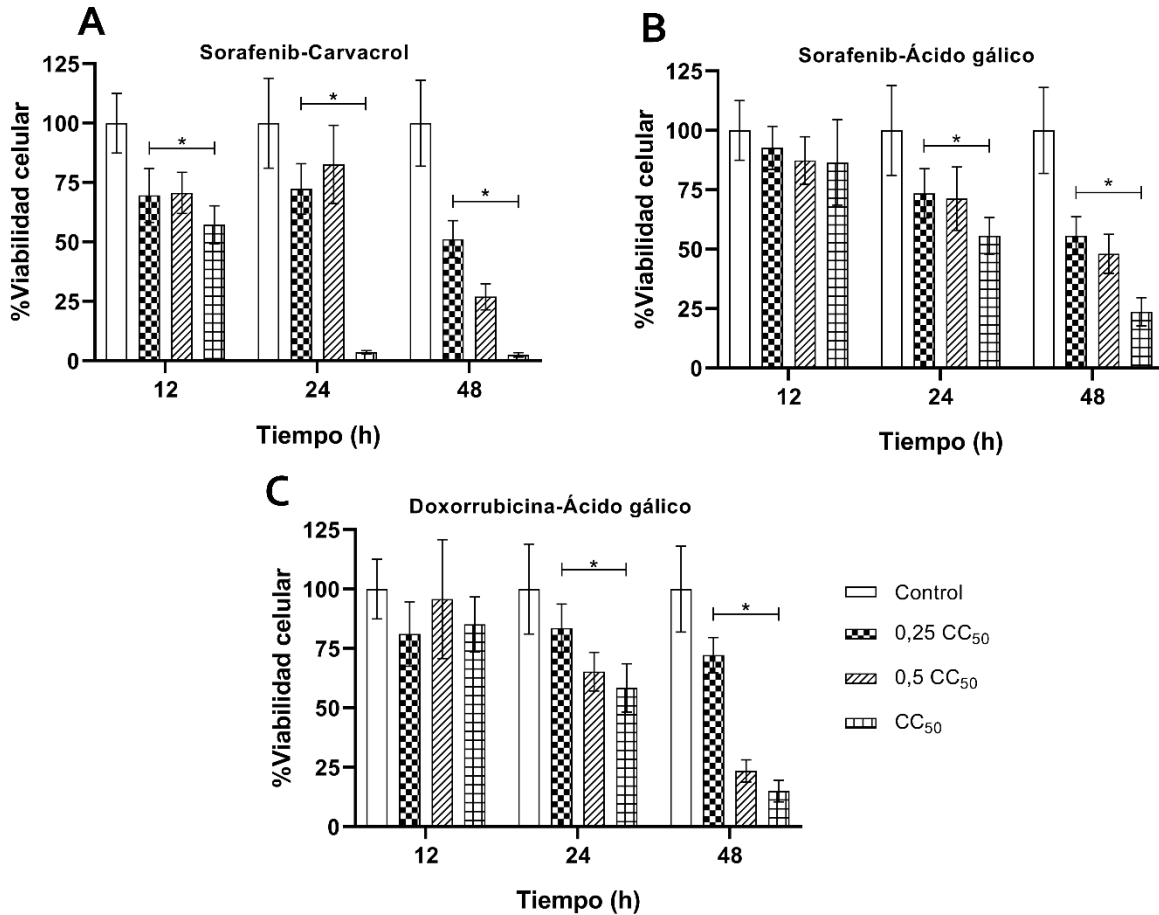
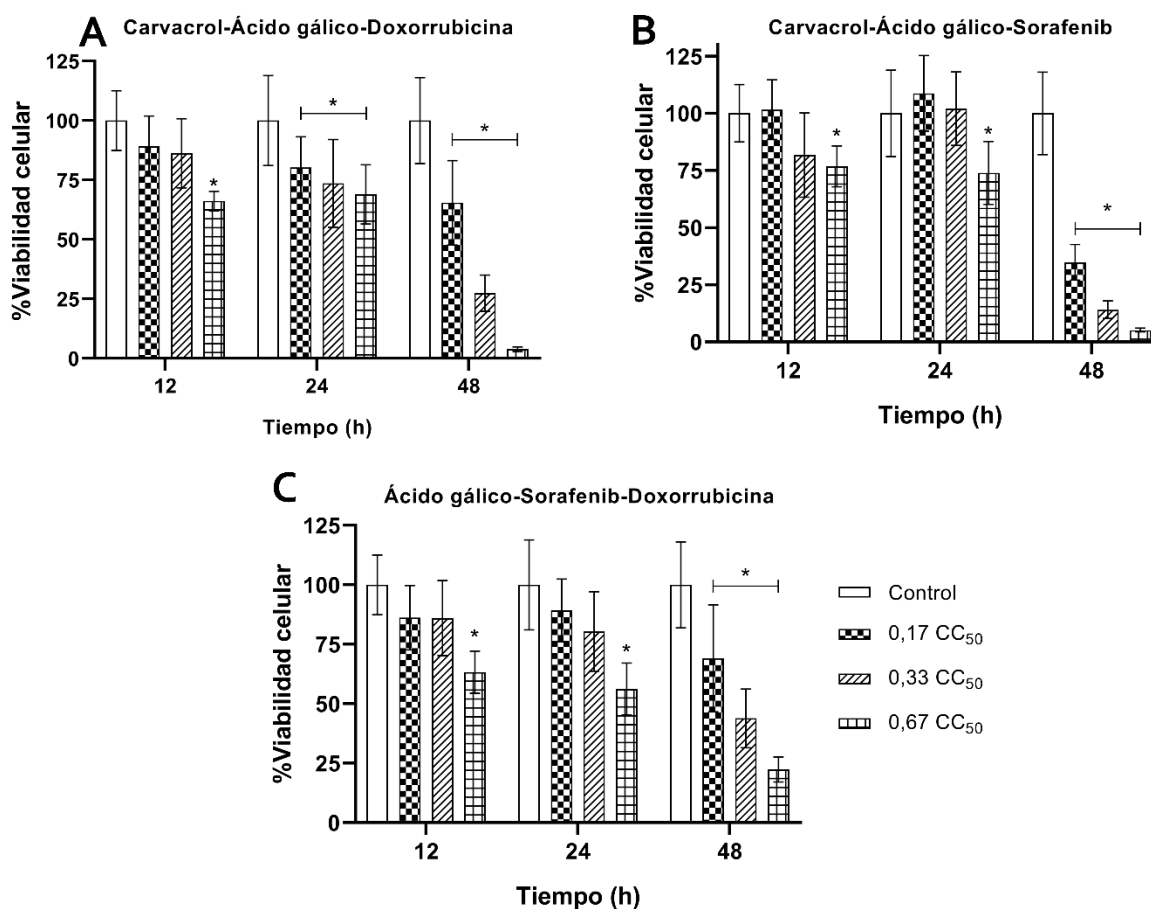


Figura 11.

Porcentaje de viabilidad celular sobre las células HepG2 de tres concentraciones de las mezclas terciarias, $0,17CC_{50}$, $0,33CC_{50}$ y $0,67CC_{50}$, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. **A:** carvacrol-ácido gálico-doxorrubicina, **B:** carvacrol-ácido gálico-sorafenib y **C:** ácido gálico-sorafenib-doxorrubicina. Los resultados están 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, $*P < 0,05$.



En base a estos resultados, la mezcla entre el sorafenib y el carvacrol fue seleccionada como la mejor, ya que produjo un efecto citotóxico significativo a partir de las 12 horas (**figura 10A**). Por otro lado, las mezclas entre el sorafenib y el ácido gálico (**figura 10B**), y la

doxorubicina y el ácido gálico (**figura 10C**) solo presentaron efecto citotóxico significativo con las tres concentraciones después de las 24 horas de tratamiento.

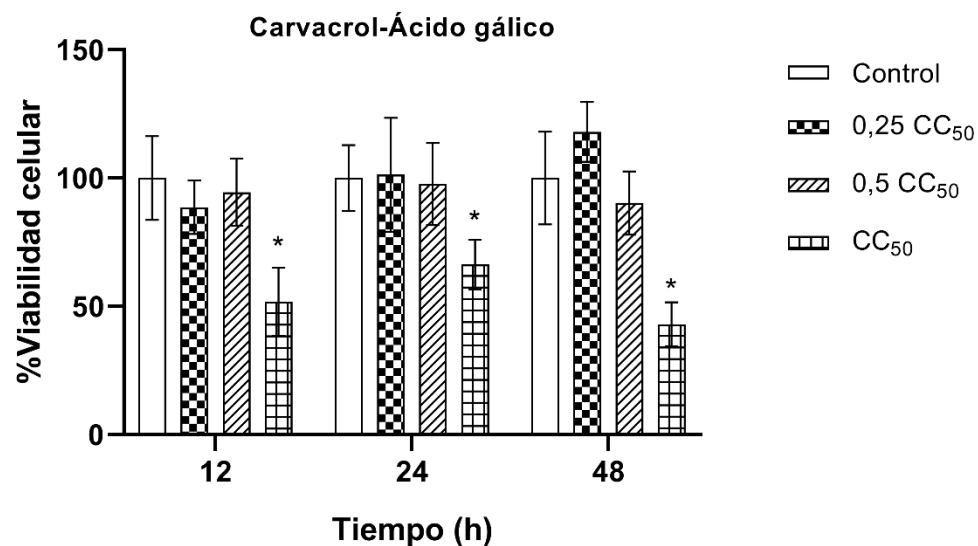
Por lo tanto, es importante resaltar que, al mezclar el sorafenib con el carvacrol, se obtiene un mayor efecto citotóxico en las células HepG2, que, al mezclarlo con el ácido gálico, a pesar de que este metabolito posee una menor CC_{50} sobre estas células (**tabla 5**), es decir que el carvacrol es capaz de potencializar el efecto del sorafenib, más que el ácido gálico.

A diferencia de las mezclas binarias, en las mezclas terciarias solo la mezcla entre carvacrol, ácido gálico y doxorubicina (**figura 11A**), produjo efecto citotóxico significativo a las 24 y 48 horas en las tres concentraciones evaluadas ($0,17CC_{50}$, $0,33CC_{50}$ y $0,67CC_{50}$), y un efecto significativo con la máxima concentración evaluada ($0,67CC_{50}$) a las 12 horas. Además, las mezclas terciarias carvacrol, ácido gálico y sorafenib (**figura 11B**) y ácido gálico, sorafenib y doxorubicina (**figura 11C**), solo produjeron un efecto significativo en las células a las 12 y 24 horas con la máxima concentración ($0,67CC_{50}$) y efecto significativo a las 48 horas con las tres concentraciones ($0,17CC_{50}$, $0,33CC_{50}$ y $0,67CC_{50}$). Razón por la cual se plantea la hipótesis de que no es conveniente mezclar más de dos compuesto en el tratamiento contra el CHC.

Por otro lado, con el objetivo de determinar si existía un efecto significativo sobre la viabilidad de las células HepG2, al exponerlas a la mezcla entre carvacrol y ácido gálico a diferentes horas de tratamiento, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en tres concentraciones diferentes de esta mezcla durante 12, 24 y 48 horas, al igual que los demás ensayos realizados, cuyos resultados se exponen en la **figura 12**.

Figura 12.

Porcentaje de viabilidad celular sobre las células HepG2 de tres concentraciones de la mezcla entre el ácido gálico y el carvacrol, 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, durante 12, 24 y 48 horas de tratamiento. Los resultados están 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.



En estos resultados (**figura 12**) se pudo evidenciar que, a diferencia de las demás mezclas binarias realizadas, al exponer las células HepG2 a la combinación entre ácido gálico y carvacrol, solo se produce un efecto significativo sobre la viabilidad celular a las 12, 24 y 48 horas en la mayor concentración evaluada, confirmando nuevamente el efecto antagonista que existe entre estos metabolitos.

En resumen, es importante mencionar que según la literatura, ya se ha llevado a cabo un gran número de ensayos clínicos donde implementan la combinación entre fármacos quimioterapéuticos y compuestos naturales en la terapia para el cancer, debido a que tal como se expone en los resultados obtenidos en este trabajo de grado, se ha demostrado que al realizar estas mezclas se puede disminuir la dosis de los fármacos administrados, para con esto prevenir la

resistencia adquirida, los efectos secundarios y potencializar su eficacia por un efecto sinérgico (Man et al., 2021).

Por ejemplo, ya se ha llevado a cabo dos ensayos clínicos de fase III, donde combinan el compuesto natural curcumina con los fármacos gemcitabina y celebrex, para el tratamiento contra el cancer de páncreas y colon, también se ha realizado un ensayo clínico de fase III combinando una formula herbal china llamada Yiqi-yangyin-jiedu (YYJD) con gefitinib en el tratamiento contra el cancer de pulmón, en el caso del cancer de hígado, han hecho un estudio de fase III combinando una formula herbal china llamada PHY906 con tosilato de sorafenib (Lin et al., 2020b)

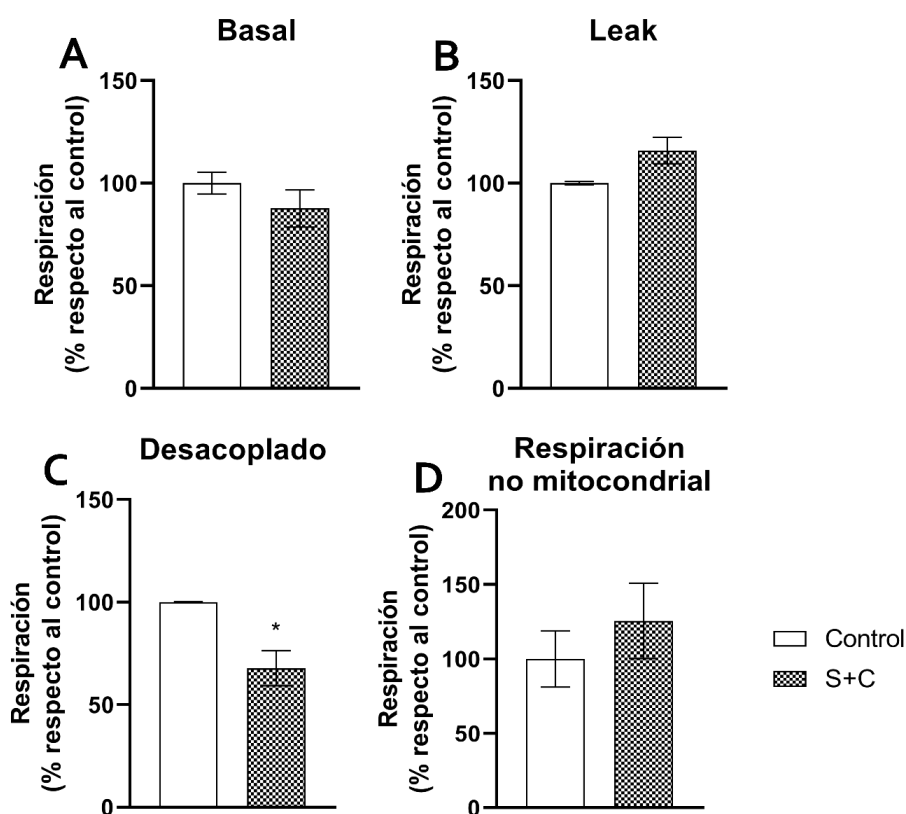
Finalmente, según los resultados obtenidos, se seleccionó la mezcla entre el carvacrol y el sorafenib como la mejor, por lo que se decidió evaluar su efecto sobre la bioenergética mitocondrial en una concentración igual al $0,25CC_{50}$ (carvacrol: $86 \mu\text{M}$ y sorafenib: $0,725 \mu\text{M}$) luego de 12 horas de tratamiento, teniendo en cuenta que el carvacrol fue uno de los metabolitos identificados como posible inhibidor del transporte de electros sobre la cadena respiratoria mitocondrial.

3.3. Acción de la mezcla entre carvacrol y sorafenib sobre la respiración celular de HepG2.

Mediante ensayos de respiración mitocondrial, se evaluó el efecto de la mezcla sorafenib-carvacrol a una concentración de $0,25CC_{50}$ (carvacrol: $86 \mu\text{M}$ y sorafenib: $0,725 \mu\text{M}$) a las 12 horas de tratamiento, cuyos resultados se muestran en la **figura 13**.

Figura 13.

Efecto de la mezcla sorafenib-carvacrol sobre las células HepG2 luego de 12 horas de tratamiento, a una concentración del 0,25CC₅₀ (carvacrol: 86 μ M y sorafenib: 0,725 μ M). Los resultados corresponden a un ensayo independiente 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, 90,8 pmolO₂/seg*1x10⁶células; Leak, 54,8 pmolO₂/seg*1x10⁶células; Desacoplado, 108,5 pmolO₂/seg*1x10⁶células; respiración no mitocondrial, 52,0 pmolO₂/seg*1x10⁶células.



En primer lugar, el estado basal se puede interpretar como la demanda energética de la célula bajo condiciones normales, luego, el estado leak representa el mecanismo que adopta la célula al inhibir la ATPasa con oligomicina, el cual es disminuir su consumo de oxígeno, ya que esta inhibición genera un aumento de potencial de membrana mitocondrial; seguido de esto, en el

estado desacoplado, el FCCP al permitir el transporte de protones del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial provoca un daño de potencial de membrana, por lo tanto, ocurre un desacople entre la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa, este estado puede ser tomado como un indicador de la flexibilidad de la célula para responder a una alta demanda energética; finalmente, la respiración no mitocondrial refleja el consumo de oxígeno de las oxidasas no mitocondriales, debido a que la cadena de transporte de electrones se ve inhibida por la rotenona (inhibidor complejo I) y la antimicina A (inhibidor complejo III) (Divakaruni et al., 2014; Doerrier C, 2015).

Según los resultados, no hay diferencias significativas en 3 estados, el basal (**figura 13A**), leak (**figura 13B**) y en la respiración no mitocondrial (**figura 13 D**), por otro lado, en el estado desacoplado (**figura 13C**), el tratamiento con sorafenib y carvacrol disminuyó la velocidad de consumo de oxígeno en un 32%. Esta inhibición podría ser debida a la inhibición en el transporte de electrones a través del complejo I y/o III, evidenciadas en los resultados de docking molecular (**tabla 2, 3 y 4**).

En base a esto, la razón por la cual se disminuye la viabilidad de las células HepG2 al exponerlas a la combinación entre sorafenib y carvacrol, puede ser debido a que como se ha demostrado en la literatura, estos compuestos inducen estrés celular y por consiguiente una alta demanda energética que no es posible suplir, ya que según estos resultados, se ve disminuida su capacidad máxima respiratoria, probablemente debido a que estos compuestos inhiben la cadena de transporte de electrones, tal como se predijo en el docking molecular llevado a cabo en este trabajo de grado (Chiou et al., 2009; Gogvadze et al., 2008; Q. H. Yin et al., 2012).

4. Conclusiones

- El docking molecular llevado a cabo sugiere que los compuestos ácido gálico, carvacrol, y timol podrían inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, a partir de interacciones con el sitio de unión del NADH en el complejo I, e interacciones con el sitio Q_i de reducción de quinona y el sitio Q_o de oxidación de quinol en el complejo III.
- A partir de los ensayos de citotoxicidad sobre las células HepG2 se demostró que no es conveniente mezclar el ácido gálico y el carvacrol, ya que presentan un efecto antagonista entre ellos, y que tampoco es adecuado realizar mezclas de más de dos compuestos citotóxicos, ya que se obtuvieron mejores resultados de porcentaje de viabilidad celular con mezclas binarias y con los compuestos individuales.
- Se identificó un efecto sinérgico entre el carvacrol y el sorafenib, ya que al combinarlos se obtuvo mejores resultados en la reducción del porcentaje de viabilidad de las células HepG2, además, se demostró que el carvacrol puede potenciar el efecto del fármaco hasta cuatro veces.
- La mezcla sorafenib carvacrol afecta la viabilidad de las células HepG2 debido a que disminuye su capacidad máxima respiratoria, posiblemente como consecuencia de un bloqueo en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial.

5. Recomendaciones

Con el fin de continuar en la búsqueda del conocimiento del mecanismo de acción de la mezcla entre carvacrol y sorafenib, se plantean las siguientes recomendaciones:

- Implementar biomarcadores específicos para apoptosis (Caspasa 8, caspasa 9, BCL-2) para determinar si el tipo de muerte inducida sobre las células HepG2 es por vía extrínseca o vía mitocondrial. Además, de biomarcadores para procesos necróticos como RIP1 y RIP3.
- Evaluar el efecto citotóxico de la mezcla sobre la línea no tumoral HepaRG (hepatocitos normales). Lo anterior con el fin de determinar si existe algún tipo de selectividad entre estas dos líneas.
- Realizar ensayos de respiración celular en células HepG2 permeadas con digitonina para estudiar la actividad complejo a complejo, y confirmar donde se encuentra el bloqueo de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial generado por esta mezcla.
- Realizar ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno, así como ensayos de peroxidación lipídica para corroborar la producción de estas especies como producto de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial y de las enzimas antioxidantes por acción de esta mezcla.

Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo de grado fueron presentados en modalidad poster en el año 2021 en los siguientes eventos:

- Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) (**anexo E**)
- I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias, Pandemias Persistentes y Emergentes (**anexo F**)
- VII jornada de investigación en cáncer (**anexo G**)

Agradecimientos

- 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”.
- 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

Anexos

Anexo A

Pubchem ID	Nombre	Reglas de Lipinski				Caco-2 [nm/sec]	MDCK [nm/sec]
		PM [g/mol]	Log P O/A	DH	AH		
12306056	Δ -Amorfenol	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-Aristolechono	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 elálgico	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 sirínico	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	Eliptica	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	Epigalocatequina	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	1223,36	5,497M	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
100945367	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	1034,20	-3,006M	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

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de: las reglas de Lipinski, las cuales son: peso molecular (PM), coeficiente de octanol-agua (Log P O/A), numero de donadores de enlaces de hidrogeno (DH) y numero de aceptores de enlaces de hidrogeno (AH), sus rangos recomendado son 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20, respectivamente, los valores en rojo se encuentran fuera del rango recomendado; la permeabilidad de los compuestos sobre las células intestinales caco-2 y

sobre las células renales MDCK, donde los valores significan, rojo(≤ 25): poca permeabilidad, amarillo: permeabilidad intermedia y verde(≥ 500): alta permeabilidad.

Anexo B

Compuesto	Complejo I		Complejo III			
	DS SP	DS XP	Q _o		Q _i	
			DS SP	DS XP	DS SP	DS XP
Δ -Amorfeno	-	-	-5,486	-	-	-
1-Acetoxipinoresinol	-3,347	-	-	-	-	-
2-epi-trans- β -Cariofileno	-3,035	-	-5,242	-	-	-
4,5-di-epi-Aristolecheno	-2,961	-	-4,198	-	-	-
6,9-Guayadieno	-3,431	-	-5,845	-	-	-
Acacetina	-4,302	-3,980	-5,18	-	-	-
Acalifina	-5,242	-	-5,249	-	-	-
Acetato de carvacrilo	-3,921	-	-6,083	-4,606	-5,17	0,006
Acetato de geranilo	-	-	-4,118	-	-	-
Ácido betulínico	-1,908	-	-	-	-	-
Ácido cafeico	-3,499	-	-4,791	-	-	-
Ácido clorogénico	-3,641	-	-5,571	-	-	-
Ácido elágico	-4,882	-4,148	-6,656	-9,348	-	-
Ácido gálico	-4,837	-4,572	-4,607	-	-5,565	1,621
Ácido oleánico	-2,555	-	-	-	-	-
Ácido pomólico	-2,152	-	-	-	-	-
Ácido protocatequico	-4,609	-3,842	-5,176	-3,336	-5,921	-4,165
Ácido rosmarínico	-5,081	-5,088	-3,654	-	-	-
Ácido shikímico	-5,051	-	-5,837	-	-5,714	-
Ácido siríngico	-4,021	-	-4,704	-	-	-
Ácido ursólico	-3,684	-	-	-	-	-
Acridina	-3,537	-	-5,696	-3,571	-	-
Ajoene	0,584	-	-1,91	-	0,059	-
Alcanfor	-3,101	-	-4,756	-	-5,989	-4,36
Alicina	-1,504	-	-2,644	-	-3,31	-
Alo-Aromadendreno	-3,755	-	-4,832	-	-	-
Aloe-emodina	-4,927	-3,838	-5,464	-4,065	-5,269	-7,616
Amentoflavona	-3,501	-	-5,156	-	-	-
Andrografólido	-4,324	-4,802	-	-	-	-
Apigenina	-4,978	-3,541	-4,804	-	-5,909	-6,812
Arbutina	-4,838	-5,575	-4,908	-6,039	-	-
Aromadendreno	-3,795	-	-5,496	-	-	-
Artesunato	-3,076	-	-	-	-	-
Aurapteno	-3,316	-	-3,832	-	-	-

Azadiractina	-2,616	-	-	-	-	-
Azadiradiona	-3,433	-	-	-	-	-
Azadirona	-2,563	-	-	-	-	-
Baicaleína	-4,398	-3,824	-5,353	-6,538	-	-
Bavachinina	-4,35	-4,246	-4,304	-	-	-
Biclogermacreno	-3,640	-	-5,408	-	-	-
Biocanina A	-4,591	-4,077	-6,287	-5,374	-5,957	-5,823
Brasilín	-5,069	-	-6,035	-6,023	-	-
Camptotecina	-3,935	-	-5,03	-4,802	-	-
Canfeno	-3	-	-4,65	-	-6,589	-5,583
Capsaicina	-3,359	-	-4,691	-	-	-
Carvacrol	-4,718	-2,314	-6,569	-4,034	-5,808	-5,22
Catequina	-5,957	-	-5,502	-	-	-
Celastrol	-3,011	-	-	-	-	-
Cinaropicrina	-2,962	-	-	-	-	-
Cirsimaritina	-4,63	-	-4,392	-	-	-
Codeína	-4,565	-	-5,19	-	-	-
Colchicina	-3,319	-	-	-	-	-
Combretastatina	-3,248	-	-5,6	-2,977	-	-
Costunolida	-3,449	-	-5,419	-4,221	-	-
Crisina	-4,232	-3,941	-5,313	-5,14	-	-
Crocetina	-2,851	-	-2,786	-	-	-
Cubebina	-4,328	-	-5,111	-	-	-
Curcubitacina	-4,116	-	-	-	-	-
Curcumina	-3,643	-	-4,321	-	-	-
Deguelin	-3,831	-	-	-	-	-
Diadzeína	-4,562	-3,424	-5,897	-4,784	-6,35	-6,694
Dicentrina	-3,883	-	-	-	-	-
Dihidroartemisina	-3,642	-	-4,393	-	-	-
Elipticina	-3,851	-	-4,387	-	-6,008	-5,43
Emodina	-5,073	-4,806	-4,718	-	-6,314	-5,995
Epicatequina	-5,957	-	-7,161	-	-5,741	-
Epigallocatequina	-5,176	-	-	-	-	-
Esclareol	-3,648	-	-	-	-	-
Espatulenol	-4,117	-	-5,916	-4,244	-	-
Estragol	-2,212	-	-4,002	-	-4,831	-
Etoposido	-3,972	-	-	-	-	-
Fisetina	-5,151	-6,379	-4,354	-	-	-
Flavopiridol	-4,307	-3,583	-	-	-	-
Formonetol	-3,629	-	-6,305	-4,304	-6,383	-6,488
Galangin	-4,379	-3,398	-5,197	-	-	-
Galato de epigallocatequina	-5,403	-	-	-	-	-
Gedunín	-3,654	-	-	-	-	-
Genisteína	-4,271	-3,522	-5,87	-5,398	-6,287	-7,586
Germacreno D	-3,950	-	-5,491	-	-	-
Gingerol	-1,354	-	-3,335	-	-	-
Glaucina	-4,459	-	-	-	-	-
Glicirricina	-4,692	-	-	-	-	-
Gnetol	-5,338	-	-4,69	-	-	-

Harmine	-4,319	-	-5,695	-3,245	-7,235	-4,028
Hernandezina	-4,267	-	-	-	-	-
Hesperetina	-4,588	-	-5,723	-	-	-
Hidroxitirosol	-3,922	-	-5,885	-6,234	-5,096	-
Indirrubina	-3,688	-	-3,941	-	-	-
Indol-3-Carbinol	-4,832	-3,210	-6,648	-5,218	-6,552	-6,879
Ingenol	-5,801	-	-	-	-	-
Irinotecan	-2,942	-	-4,469	-	-	-
Isoquinolina	-3,796	-	-5,144	-	-5,678	-4,553
Isorhamnetin	-5,052	-	-4,188	-	-	-
Jervina	-3,009	-	-	-	-	-
Juglone	-4,35	-2,287	-5,774	-3,755	-5,309	-5,762
Kaempferol	-4,996	-3,056	-4,834	-	-6,979	-7,955
Limoneno	-2,737	-	-4,648	-	-5,632	-4,948
Linalool	-2,622	-	-3,918	-	-3,231	-
Luteína	-5,774	-	-	-	-	-
Luteolina	-5,774	-3,671	-3,95	-	-5,937	-7,295
Mahanine	-4,166	-	-3,23	-	-	-
Mentol	-3,040	-	-6,139	-4,513	-6,482	-4,673
Mirceno	-1,058	-	-1,942	-	-3,055	-
Miricetina	-5,408	-	-4,068	-	-	-
Morfina	-4,48	-	-5,337	-	-	-
Naringenina	-4,273	-3,620	-4,731	-	-	-
Nerolidol	-0,455	-	-2,306	-	-	-
Niazirina	-5,849	-6,347	-6,236	-4,199	-6,489	-8,418
Nimbolida	-4,446	-	-	-	-	-
Nobiletina	-4,139	-3,074	-4,689	-	-	-
Noscapina	-3,324	-	-	-	-	-
Oroxilina A	-3,881	-	-4,371	-	-	-
Óxido de cariofileno	-2,757	-	-6,043	-4,479	-	-
Paclitaxel	-5,069	-	-4,951	-	-	-
Palustrol	-3,741	-	-5,459	-3,99	-	-
Parodol	-1,319	-	-2,803	-	-	-
<i>p</i> -Cimeno	-3,847	-	-5,408	-2,977	-6,062	-4,751
Piceatannol	-4,120	-2,842	-5,001	-4,778	-	-
Picrocrocina	-4,59	-6,433	-4,889	-	-	-
Piperina	-4,193	-1,904	-5,102	-	-5,909	-7,417
Piperitona	-3,842	-	-5,885	-3,505	-6,266	-5,131
Plumbagina	-4,294	-2,642	-6,003	-4,788	-	-
<i>p-ment-3-en-8-ol</i>	-3,934	-	-5,167	-3,418	-4,931	-
Pterostilbeno	-3,545	-	-4,604	-	-	-
Puerarin	-4,318	-	-	-	-	-
Pulegol	-4,694	-	-5,687	-3,597	-6,018	-4,709
Pulegona	-4,245	-2,866	-5,411	-3,112	-5,612	-3,714
Purapuridina (Solasodina)	-3,431	-	-	-	-	-
Quercetina	-4,996	-6,571	-4,235	-	-	-
Quinolina	-3,507	-	-5,125	-	-5,981	-5,149
Roscovitina	-4,479	-	-3,309	-	-6,871	-
Sabineno	-4,145	-	-5,035	-	-6,25	-5,112

Salvicina	-4,401	-5,047	-5,045	-	-7,608	-7,941
Salvinorina A	-2,658	-	-	-	-	-
Saponina	-5,845	-	-	-	-	-
Scutellarein	-4,497	-4,393	-4,934	-4,148	-	-
Shikonin	-4,673	-	-6,19	-5,095	-4,701	-
Shogaol	-1,584	-	-3,562	-	-	-
Silvestrol	-3,809	-	-4,729	-	-	-
Sinalbina	-4,074	-	-3,812	-	-	-
Sinigrina	-4,738	-7,901	-5,119	-6,533	-4,518	-
Solamargina	-4,279	-	-	-	-	-
Solanesol	-4,065	-	-	-	-	-
Sulforafano	-2,807	-	-3,833	-	-3,877	-
Sulindac	-4,057	-	-5,681	-2,581	-5,695	-3,694
Tangeretina	-3,948	-	-5,164	-	-	-
Tanshinone I	-3,998	-	-3,576	-	-	-
Tearubigina	-5,705	-	-	-	-	-
Teniposido	-3,976	-	-	-	-	-
Tetrandrina	-3,139	-	-	-	-	-
Timol	-4,564	-2,401	-6,451	-3,409	-5,544	-5,009
Timoquinona	-4,66	-2,483	-5,984	-3,55	-5,599	-5,525
Tomatina	-6,629	-	-5,775	-	-	-
Topotecan	-3,191	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Nerolidol	-0,455	-	-2,306	-	-	-
Vinblastina	-3,393	-	-	-	-	-
Vincristina	-3,510	-	-	-	-	-
Vinflunina	-3,760	-	-	-	-	-
Vinorelbina	-4,423	-	-	-	-	-
Wogonina	-3,973	-	-4,499	-	-	-
Xanthohumol	-3,897	-	-4,713	-	-5,166	-6,048
Zingerona	-4,059	-	-4,713	-	-5,445	-5,566
α -Cadineno	-3,566	-	-5,018	-	-	-
α -Cadinol	-4,220	-2,390	-5,711	-4,545	-	-
α -Copaeno	-3,650	-	-4,849	-	-	-
α -Gurjuneno	-3,452	-	-	-	-	-
α -Humuleno	-2,893	-	-5,429	-	-	-
α -pineno	-3,328	-	-5,026	-	-6,523	-
α -Terpineno	-3,951	-	-	-	-5,878	-4,668
α -Tujeno	-4,162	-2,237	-4,833	-	-6,226	-5,147
β -Borboneno	-3,186	-	-4,275	-	-	-
β -Citronelol	-2,453	-	-5,175	-	-	-
β -Elemeno	-2,660	-	-3,847	-	-	-
β -Eudesmol	-3,510	-	-5,124	-	-	-
β -Felandreno	-4,31	-2,386	-5,371	-2,741	-6,175	-5,141
β -Guaieno	-2,934	-	-5,416	-	-	-
β -Narcotina	-4,183	-	-	-	-	-
β -pineno	-3,104	-	-5,067	-	-6,659	-5,59
β -Selineno	-2,952	-	-4,294	-	-	-
β -Sitosterol	-3,073	-	-	-	-	-
γ -Eudesmol	-3,744	-	-5,202	-	-	-
γ -Muuroleno	-3,405	-	-5,442	-	-	-

γ -Terpineno	-3,812	-	-5,488	-	-5,788	-
Δ -Cadineno	-3,274	-	-5,212	-	-	-
Δ -careno	-3,414	-	-5,03	-	-6,149	-5,137

Nota: DS SP: docking score del docking de precisión estándar: DS XP: : docking score del docking

de extra precisión

Anexo C

Metabolito	Fármaco		
	0,25CC ₅₀	0,5CC ₅₀	CC ₅₀
0,25 CC50	E1		
0,5 CC50		E2	
CC50			E3

Metabolito	Fármaco 1 y 2			Fármaco	Metabolito 1 y 2		
	0,17CC ₅₀	0,33CC ₅₀	0,67CC ₅₀		0,17CC ₅₀	0,33CC ₅₀	0,67CC ₅₀
0,17 CC50	E1			0,17 CC50	E1		
0,33 CC50		E2		0,33 CC50		E2	
0,67 CC50			E3	0,67 CC50			E3

Metabolito 1 y 2	Fármaco 1 y 2		
	0,13 CC50	0,25 CC50	0,5 CC50
0,13 CC50	E1		
0,25 CC50		E2	
0,5 CC50			E3

Anexo D

Compuesto	Concentraciones								
	Binarias			Terciarias			Cuaternaria		
	0,25CC ₅₀	0,5CC ₅₀	CC ₅₀	0,17CC ₅₀	0,33CC ₅₀	0,67CC ₅₀	0,13CC ₅₀	0,25CC ₅₀	0,5CC ₅₀
Carvacrol	86	172	344	57,3	114,7	229,3	43	86	172
Ácido gálico	35,75	71,5	143	23,8	47,67	95,3	18	36	72
Doxorrubicina	0,05	0,1	0,2	0,03	0,07	0,1	0,025	0,05	0,1

Sorafenib	0,725	1,45	2,9	0,48	0,97	1,9	0,36	0,73	1,5
-----------	-------	------	-----	------	------	-----	------	------	-----

Anexo E



El comité científico del 34º 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 de plantas medicinales como adyuvantes en la terapia del hepatocarcinoma celular mediante análisis *in silico* empleando como diana terapéutica la mitocondria”

Fue presentado por: Liseth Paola T. Bohórquez, Luis C. Vesga, Stelia C. Mendez-Sanchez

Presentado en modalidad póster

En el marco del 34º 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

Anexo F

LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Certifica que:

LISETH PAOLA TATIANA BOHÓRQUEZ CALDERÓN

Participó como ponente del trabajo titulado:

Identificación de metabolitos adyuvantes en el tratamiento del hepatocarcinoma celular, teniendo como diana terapéutica la cadena respiratoria mitocondrial.

Por: Liseth Paola Tatiana Bohórquez Calderón, Luis C. Vesga & Stelia C. Méndez-Sánchez.

En la modalidad **PÓSTER VIRTUAL**, en el **I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias y Pandemias Persistentes y Emergentes**, organizado por el Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, que se realizó del 11 al 13 de noviembre de 2021, en Bucaramanga, Colombia.


Maria Carolina Velásquez Martínez
Directora Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina


Mario Felipe Negrette Guzmán
Coordinador de Posgrado - Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina



Anexo G

VII JORNADAS DE INVESTIGACIÓN EN CÁNCER · 2021

11-12

NOVIEMBRE
2021

El Instituto Nacional de Cancerología y
la Red Nacional de Investigación en Cáncer

Certifican que el trabajo de Investigación titulado:

**Identificación de metabolitos secundarios adyuvantes en la terapia del
hepatocarcinoma celular avanzado mediante un análisis de acoplamiento
molecular, empleando como diana terapéutica la cadena respiratoria
mitocondrial**

De los autores:

**Liseth Paola T. Bohórquez
Luis C. Vesga
Stella C. Méndez**

Fue presentado en la modalidad:

Póster

**En la VII Jornada de Investigación en Cáncer,
llevada a cabo en Bogotá, los días 11 y 12 de noviembre de 2021.**

Como constancia se firma en la ciudad de Bogotá, el 12 de noviembre de 2021.



Carolina Wlosnor Cobalios
Directora General
Instituto Nacional de Cancerología ESE



Maria Morcodos Bravo Hernández
Comisión Facilitadora para la Organización
de Eventos Científicos y Académicos
Red Nacional de Investigación en Cáncer



Red Nacional
de Investigación
en Cáncer



Instituto Nacional
de Cancerología-ESE
Red Nacional de Investigación en Cáncer

Referencias Bibliográficas

- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., & Goya, L. (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, 45(1), 19–28. <https://doi.org/10.1007/s00394-005-0558-7>
- Antonio Díaz, L., Antonio Díaz, L. P., & Barrera, F. M. (2015). Clasificaciones en Gastroenterología Clasificación Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) de carcinoma hepatocelular. *Gastroenterol. latinoam*, 26, 63-68.
- Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., & Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133(November 2020), 110985. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>
- Balogh, J., Iii, D. V., Gordon, S., Li, X., Ghobrial, R. M., & Jr, H. P. M. (2016). Jhc-3-041. *Journal of Hepatocellular Carcinoma, Volume 3*, 41–53. <https://www.dovepress.com/hepatocellular-carcinoma-a-review-peer-reviewed-article-JHC>
- Chiou, J. F., Tai, C. J., Wang, Y. H., Liu, T. Z., Jen, Y. M., & Shiau, C. Y. (2009). Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Biology and Therapy*, 8(20), 1904–1913. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.20.9436>
- Chou, T. (2007). *Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies* □. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.
- Dhanasekaran, S., Venugopal, D., Al-Dayyan, N., Ravinayagam, V., & Mohammed, A. A. (2020). Emerging insights into mitochondria-specific targeting and drug delivering strategies: Recent milestones and therapeutic implications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3581-3592. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.030>
- Di Sotto, A., Irannejad, H., Eufemi, M., Mancinelli, R., Abete, L., Loredana Mammola, C., Altieri, F., Mazzanti, G., & Di Giacomo, S. (2020). Potentiation of Low-Dose Doxorubicin Cytotoxicity by Affecting P-Glycoprotein through Caryophyllane Sesquiterpenes in HepG2 Cells: An In Vitro and In Silico Study. *Int. J. Mol. Sci*, 2020, 633. www.mdpi.com/journal/ijms

- Ding, Z. Bin, Hui, B., Shi, Y. H., Zhou, J., Peng, Y. F., Gu, C. Y., Yang, H., Shi, G. M., Ke, A. W., Wang, X. Y., Song, K., Dai, Z., Shen, Y. H., & Fan, J. (2011). Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clinical Cancer Research*, 17(19), 6229–6238. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0816>
- Divakaruni, A. S., Paradyse, A., Ferrick, D. A., Murphy, A. N., & Jastroch, M. (2014). Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. In *Methods in Enzymology* (Vol. 547, Issue C). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3>
- Doerrier C, G. E. (2015). *An experiment with respirometry: coupling control in cell respiration* (Vol. 04, Issue 08).
- Du, J., Sun, H., Xi, L., Li, J., Yang, Y., Liu, H., & Yao, X. (2011). Molecular modeling study of checkpoint kinase 1 inhibitors by multiple docking strategies and prime/MM-GBSA calculation. *Journal of Computational Chemistry*, 32(13), 2800–2809. <https://doi.org/10.1002/jcc.21859>
- Elshafie, H. S., Armentano, M. F., Carmosino, M., Bufo, S. A., De Feo, V., & Camele, I. (2017). Cytotoxic activity of *origanum vulgare* L. on Hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091435>
- Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9243–9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
- Fernanda Saldívar-González, F. D. P.-M. y J. L. M.-F. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educacion Química*, 28, 51–58.
- 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. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177–6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
- Gao, W., Xu, K., Li, P., & Tang, B. (2011). Functional roles of superoxide and hydrogen peroxide generated by mitochondrial DNA mutation in regulating tumorigenicity of HepG2 cells. *Cell Biochemistry and Function*, 29(5), 400–407. <https://doi.org/10.1002/cbf.1764>

- Gingold, J. A., Zhu, D., Lee, D. F., Kaseb, A., & Chen, J. (2018). Genomic Profiling and Metabolic Homeostasis in Primary Liver Cancers. *Trends in Molecular Medicine*, 24(4), 395–411. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.006>
- GLOBOCAN. (2021). *GLOBOCAN 2020: Nuevos datos mundiales sobre el cáncer*. <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>
- Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in Cell Biology*, 18(4), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.006>
- Gorini, S., De Angelis, A., Berrino, L., Malara, N., Rosano, G., & Ferraro, E. (2018). Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: Focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7582730>
- Grasso, D., Zampieri, L. X., Capelôa, T., Van De Velde, J. A., & Sonveaux, P. (2020). Mitochondria in cancer. *Cell Stress*, 4(6), 114–146. <https://doi.org/10.15698/cst2020.06.221>
- Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Leman, G., Chupin, S., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Vessières, E., Ayer, A., Henrion, D., Lenaers, G., Reynier, P., & Procaccio, V. (2015). Resveratrol directly binds to mitochondrial complex i and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice. *PLoS ONE*, 10(12), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144290>
- Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., & Yang, M. (2017). Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell*, 170(6), 1247–1257.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harder, E., Damm, W., Maple, J., Wu, C., Reboul, M., Xiang, J. Y., Wang, L., Lupyan, D., Dahlgren, M. K., Knight, J. L., Kaus, J. W., Cerutti, D. S., Krilov, G., Jorgensen, W. L., Abel, R., & Friesner, R. A. (2016). OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 281–296. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00864>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>

- Huang, C. Y., Chang, Y. J., Wei, P. L., Hung, C. S., & Wang, W. (2021). Methyl gallate, gallic acid-derived compound, inhibit cell proliferation through increasing ROS production and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE*, *16*(3 March), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248521>
- 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/10.1002/iub.1935>
- Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J. F., Honig, B., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2004). A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins*, *55*(2), 351–367. <https://doi.org/10.1002/prot.10613>
- Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., & Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins*, *79*(10), 2794–2812. <https://doi.org/10.1002/prot.23106>
- Li, S., Xu, J., Zhang, H., Hong, J., Si, Y., Yang, T., He, Y., Ng, D. M., & Zheng, D. (2021). The Role of Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chemotherapy*, *66*(4), 124–133. <https://doi.org/10.1159/000518257>
- Liao, B., Zhang, Y., Sun, Q., & Jiang, P. (2018). Vorinostat enhances the anticancer effect of oxaliplatin on hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Medicine*, *7*(1), 196–207. <https://doi.org/10.1002/cam4.1278>
- Lima, K. G., Krause, G. C., Schuster, A. D., Catarina, A. V., Basso, B. S., De Mesquita, F. C., Pedrazza, L., Marczak, E. S., Martha, B. A., Nunes, F. B., Chiela, E. C. F., Jaeger, N., Thomé, M. P., Haute, G. V., Dias, H. B., Donadio, M. V. F., & De Oliveira, J. R. (2016). Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *84*, 1282–1290. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.048>
- 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>
- Lin, S., Hsu, C. C. C., Tsai, M., Cheng, H., Leong, M. K., Chen, P. S. J., & Weng, C. (2020). *Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. July 2019*, 1409–1423. <https://doi.org/10.1111/bph.14816>
- Llovet, J. M., Ducreux, M., Lencioni, R., Di Bisceglie, A. M., Galle, P. R., Dufour, J. F., Greten, T. F., Raymond, E., Roskams, T., De Baere, T., Ducreux, M., Mazzaferro, V., Bernardi, M., Bruix, J., Colombo, M., & Zhu, A. (2012). EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines:

- Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56(4), 908-943.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Lyne, P. D., Lamb, M. L., & Saeh, J. C. (2006). Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(16), 4805–4808. <https://doi.org/10.1021/jm060522a>
- Man, S., Luo, C., Yan, M., Zhao, G., Ma, L., & Gao, W. (2021). Treatment for liver cancer: From sorafenib to natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113690. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113690>
- Mansour, G. H., El-Magd, M. A., Mahfouz, D. H., Abdelhamid, I. A., Mohamed, M. F., Ibrahim, N. S., Hady A. Abdel Wahab, A., & Elzayat, E. M. (2021). Bee venom and its active component Melittin synergistically potentiate the anticancer effect of Sorafenib against HepG2 cells. *Bioorganic Chemistry*, 116(August). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105329>
- 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>
- Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K., & Gille, L. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 337–347.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.001>
- Moo-Puc, R., Robledo, D., & Freile-Pelegrián, Y. (2009). Actividad citotóxica y antiproliferativa in vitro de macroalgas marinas de Yucatán, México. *Ciencias Marinas*, 35(4), 345-358.
<https://doi.org/10.7773/cm.v35i4.1617>
- Mosmann. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Muros-Ortega, M., Díaz-Carrasco, M. S., Vila-Clérigues, N., Mendoza-Otero, F., De La Rubia, A., & Capel Alemán, A. (2011). Experiencia de uso de partículas DC Bead® cargadas con doxorubicina en quimioembolización hepática. *Farmacia Hospitalaria*, 35(4), 172–179.
<https://doi.org/10.1016/j.farma.2010.06.006>
- Pardo Andreu, G. L., Reis, F. Z. Dos, González-Durruthy, M., Hernández, R. D., D'Vries, R. F., Vanden Berghe, W., & Alberici, L. C. (2020). Rapanone, a naturally occurring

- benzoquinone, inhibits mitochondrial respiration and induces HepG2 cell death. *Toxicology in Vitro*, 63(November 2019), 104737. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104737>
- Placha, I., Bacova, K., & Plachy, L. (2022). Current Knowledge on the Bioavailability of Thymol as a Feed Additive in Humans and Animals with a Focus on Rabbit Metabolic Processes. *Animals*, 12(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani12091131>
- Prada-Gracia, D., Huerta-Yépez, S., & Moreno-Vargas, L. M. (2016). Aplicación de métodos computacionales para el descubrimiento, diseño y optimización de fármacos contra el cáncer. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de Mexico*, 73(6), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.10.006>
- Roser, M. (2020). *Is the world making progress against cancer?* Our World in Data. <https://ourworldindata.org/progress-against-cancer>
- Roser, M., & Ritchie, H. (2019). *Cancer*. <https://ourworldindata.org/cancer>
- Samant, H., Amiri, H. S., & Zibari, G. B. (2021). Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: epidemiology, prevention, and management. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(S2), S361–S373. <https://doi.org/10.21037/jgo.2020.02.08>
- Sandoval, J., & Esteller, M. (2012). Cancer epigenomics: Beyond genomics. *Current Opinion in Genetics and Development*, 22(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.008>
- Sastry, G. M., 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>
- Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., & Uchimaya, M. (2007). Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(12), 681–691. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9133-z>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry* (1st ed., Vol. 60). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Tang, W., Chen, Z., Zhang, W., Cheng, Y., Zhang, B., Wu, F., Wang, Q., Wang, S., Rong, D., Reiter, F. P., De Toni, E. N., & Wang, X. (2020). The mechanisms of sorafenib resistance

- in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0187-x>
- Tomar, V., Mazumder, M., Chandra, R., Yang, J., & Sakharkar, M. K. (2018). 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>
- Walters, W. P. (2012). Going further than Lipinski's rule in drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(2), 99-107. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.648612>
- Wu, L., Cao, K., Ni, Z., Wang, S., Li, W., Liu, X., & Chen, Z. (2019). Rhein reverses doxorubicin resistance in SMMC-7721 liver cancer cells by inhibiting energy metabolism and inducing mitochondrial permeability transition pore opening. *BioFactors*, 45(1), 85-96. <https://doi.org/10.1002/biof.1462>
- Wyatt, J. I., & Haugk, B. (2019). *Liver, biliary system and pancreas* (S. S. Cross MD FRCPATH (ed.); pp. 356-387). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-7212-3.00016-5>
- Yin, P. H., Lee, H. C., Chau, G. Y., Wu, Y. T., Li, S. H., Lui, W. Y., Wei, Y. H., Liu, T. Y., & Chi, C. W. (2004). Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 90(12), 2390-2396. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601838>
- Yin, Q. H., Yan, F. X., Zu, X. Y., Wu, Y. H., Wu, X. P., Liao, M. C., Deng, S. W., Yin, L. L., & Zhuang, Y. Z. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1), 43-51. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9389-y>
- Zhong, C., Qiu, S., Li, J., Shen, J., Zu, Y., Shi, J., & Sui, G. (2019). Ellagic acid synergistically potentiates inhibitory activities of chemotherapeutic agents to human hepatocellular carcinoma. *Phytomedicine*, 59(November 2018), 152921. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152921>
- Zhou, J., Fang, L., Liao, J., Li, L., Yao, W., Xiong, Z., & Zhou, X. (2017). Investigation of the anti-cancer effect of quercetin on HepG2 cells in vivo. *PLoS ONE*, 12(3), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172838>
- Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Ryan, D. P., Clark, J. W., Muzikansky, A., Horgan, K., Sheehan, S., Hale, K. E., Enzinger, P. C., Bhargava, P., & Stuart, K. (2006). Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24(12), 1898-1903. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.9130>
- Zhu, L., Zhao, J., Zhang, Y., Zhou, W., Yin, L., Wang, Y., Fan, Y., Chen, Y., & Liu, H. (2018). ADME properties evaluation in drug discovery: in silico prediction of blood-brain

partitioning. *Molecular Diversity*, 22(4), 979–990. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9866-8>