

Identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales como adyuvantes en el
tratamiento del adenocarcinoma de mama con doxorubicina

Por:

Mayra Alejandra Carreño Corzo

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología

Trabajo de Grado para Optar al 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

2023

Dedicatoria

Dedico este trabajo con gran amor a mis padres por su apoyo en todo momento en esta etapa de mi vida, a mis abuelos y a mi hermana por estar siempre a mi lado, además a mis mascotas; mateo, mayita, niño y niña por su fiel compañía y estar siempre a mi lado en las noches de escritura.

Agradecimientos

Agradezco principalmente a mis padres porque sin su apoyo no sería posible este logro, principalmente a mi madre por estar siempre para mí incondicionalmente en todo momento, a mi hermana y amigos, pero especialmente a Jeimmy por estar para mí en mis momentos difíciles y distraerme en los de estrés y a una personita especial que siempre ha estado presente en mi vida desde el último año de colegio, pero ha sido un gran apoyo y compañía en este último año.

Agradezco a la profesora Stelia por darme la oportunidad de realizar este trabajo de grado con ella y permitirme aprender cosas nuevas y enamorarme de una rama de la química tan fascinante como lo es la bioquímica. A Luis Carlos por ser un maravilloso codirector y por tenerme mucha paciencia por tantas preguntas que le hacía en el camino y por reírse en los momentos en que las cosas nos salían mal, gracias a esas risas no me sentía mal.

Finalmente, a Tatiana y Andrea por su compañía en la realización de este proyecto, por los momentos de risa y estrés que vivimos en el laboratorio y por fuera de este.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron y estuvieron presentes en esta etapa de mi vida.

Tabla de Contenido

	Pág.
Resumen.....	10
Abstract.....	12
Introducción	14
1. Marco de referencia y antecedentes	16
1.1. Epigenética del cáncer y metabolismo de las células cancerígenas.....	16
1.2. Contribución de la mitocondria y la fosforilación oxidativa en la dinámica del cáncer	17
1.3. Cáncer de mama, tratamiento actual y factores de riesgo.....	18
1.4. Metabolitos secundarios como alternativa para el tratamiento del carcinoma mamario e inhibidores de la bioenergética mitocondrial	20
1.5. Docking molecular y descubrimiento de fármacos.....	22
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo General.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
CAPITULO 1. DETERMINACIÓN <i>in silico</i> DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS MEDICINALES CON EFECTO INHIBITORIO EN LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....	26
1. Metodología fase <i>in silico</i>	26
1.1 Construcción de base de datos y preparación de ligandos	27
1.2 Preparación de proteínas	27
1.3 Docking molecular.....	28
1.4 Cálculo de la energía de afinidad.....	29

1.5	Diseño de Figuras	30
2.	Resultados y discusión.....	30
CAPITULO 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y SINERGISMO..		37
1.	Metodología fase <i>in vitro</i>	37
1.1	Cultivo celular.....	38
1.2	Evaluación de citotoxicidad.....	38
1.3	Determinación del sinergismo entre metabolitos y fármaco de referencia por el método colorimétrico MTT.....	39
1.4	Determinación del sinergismo entre metabolitos y fármaco de referencia por el método cristal violeta.....	41
1.5	Efecto sobre la respiración de las células MCF-7	41
1.6	Análisis estadístico.....	42
2.	Consideraciones éticas	42
2.1.	Disposición adecuada de los residuos o desechos químicos.....	42
2.2	Ensayos con células	43
3.	Resultados y discusión.....	44
3.1	Determinación de cc_{50}	44
3.2	Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármaco de referencia.....	47
3.3	Acción de la mezcla entre ácido gálico y doxorubicina sobre la respiración celular de MCF-7.....	54
	Conclusiones	57
	Recomendaciones	57
	Divulgación de resultados.....	58
	Agradecimientos	58
	Anexos	59

Referencias Bibliográficas	65
----------------------------------	----

Lista de Tablas

	Pág.
<i>Tabla 1. Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del complejo II</i>	30
<i>Tabla 2. CC₅₀ a las 48 horas sobre las células MCF-7 de cada metabolito seleccionado y fármaco de referencia</i>	46
<i>Tabla 3. Mezclas realizadas entre los metabolitos ácido gálico, quercetina y timol y el fármaco doxorubicina</i>	47
<i>Tabla 4. Concentraciones utilizadas en las mezclas entre los metabolitos ácido gálico, quercetina y timol y el fármaco doxorubicina. Escribir el tiempo de tratamiento con el que se determinó la CC50.</i>	4747
<i>Tabla 5. Valores de porcentaje de viabilidad celular, Índice de combinación, tipo de interacción e índice de reducción de dosis obtenido al exponer las células MCF-7 durante diferentes tiempos a la mezcla; ensayo colorimétrico MTT</i>	52

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1. Esquema metodológico in silico para la selección de metabolitos con posibles interacciones con complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.....</i>	27
<i>Figura 2. Poses de acoplamiento representativas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo II, A: timol, B: quercetina, C: ácido gálico, D: carvacrol y E: 2-Tenoiltrifluoroacetona. Los residuos 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, amarillo). 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.</i>	35
<i>Figura 3. Estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de los complejos II de la cadena respiratoria mitocondrial.</i>	36
<i>Figura 4. Diagrama metodológico de la fase in vitro</i>	37
<i>Figura 5. Efecto de la viabilidad celular de células MCF-7 luego de 48 horas de tratamiento Vs. Concentración de los fármacos de referencia. A representa los fármacos de referencia, B y C los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial. .</i>	45
<i>Figura 6. Porcentaje de viabilidad sobre células MCF-7 luego de 48 horas Vs. Concentración de las diferentes mezclas donde A representa las mezclas binarias, B las mezclas terciarias y C la mezcla cuaternaria. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar y</i>	

*los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, *P < 0,05..... 49*

*Figura 7. Porcentaje de viabilidad celular sobre las células MCF-7 de tres concentraciones de la mezcla entre el ácido gálico y la doxorrubicina, 0,25CC50, 0,5CC50 y CC50, durante 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, obtenidos del ensayo colorimétrico MTT. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, *P < 0,05..... 51*

*Figura 8.Efecto de la mezcla doxorrubicina- ácido gálico sobre las células MCF-7 luego de 24 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 la prueba de Student, *P<0,05. 55*

Resumen

Título: Identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales como adyuvantes en el tratamiento del adenocarcinoma de mama con doxorubicina

Autor: Mayra A. Carreño-Corzo, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez.

Palabras Clave: Cáncer de mama, MCF-7, citotoxicidad, metabolitos secundarios

Descripción

El cáncer es una enfermedad que se puede desarrollar en cualquier persona, sin importar su género o edad. En el 2020, se registraron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y 10 millones de muertes en el mundo, siendo el cáncer de mama el principal tipo de cáncer diagnosticado en mujeres y la principal causa de muerte en ellas, por lo cual existe la necesidad de buscar nuevos compuestos que ayuden a mitigar los efectos secundarios y la resistencia a fármacos utilizados en los tratamientos ya existentes (Coley, 2008a).

En vista que la resistencia a los fármacos actualmente utilizados para combatir el cáncer se ha visto en aumento, este proyecto tuvo como objetivo principal, identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencialicen el efecto anticanceroso de la doxorubicina (un compuesto rutinariamente usado en quimioterapia) en células del carcinoma mamario MCF-7, teniendo como blanco molecular la mitocondria por su importancia en el cáncer debido a que interviene en el control de la muerte, la proliferación y la señalización celular (Grasso et al., 2020).

Para cumplir con el objetivo mencionado, se realizó un cribado de una base de datos de 187 metabolitos utilizando una interfaz de modelado molecular. Se inició calculando las propiedades ADME de los metabolitos de la base de datos, posteriormente se realizó un docking con dos grados de precisión (precisión estándar y extra-precisión) para determinar las posibles interacciones de los metabolitos con los residuos Arg 46, Ser 42 y Ile 30, identificados como importantes por su participación en la unión de inhibidores del complejo II (PDBID: 1ZOY, resolución 2, 4 Å) de la cadena respiratoria mitocondrial (Kluckova et al., 2015).

A partir del cribado fueron identificados cuatro compuestos potenciales: la quercetina, el timol, el carvacrol y el ácido gálico como los posibles mejores inhibidores del complejo II de la cadena respiratorio mitocondrial. Posteriormente mediante ensayos de citotoxicidad sobre células del adenocarcinoma mamario (MCF-7) y empleando el método MTT descrito por Mossmann, se determinó la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) a las 48 horas de tratamiento para cada uno de los metabolitos previamente seleccionados, cuyos valores fueron 195, 612, 136 y 372 μM , para la quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol, respectivamente. Además, se determinó la CC_{50} para el fármaco doxorrubicina, el cual fue 1,94 μM .

Seguido de esto, se realizaron ensayos de citotoxicidad exponiendo las células MCF-7, a diferentes concentraciones, de mezclas entre los metabolitos quercetina, timol y ácido gálico, y el fármaco doxorrubicina. A partir de este ensayo se seleccionó la mezcla ácido gálico - doxorrubicina como la mejor con concentraciones citotóxicas ($0,25CC_{50}$, $0,5 CC_{50}$ y CC_{50}), empleando el ensayo de cristal violeta bajo las mismas condiciones ya mencionadas.

Finalmente se llevaron a cabo ensayos de respiración celular para determinar el efecto de la mezcla ácido gálico-doxorrubicina sobre la bioenergética mitocondrial, exponiendo las células MCF-7 durante 24 horas a la mezcla, en una concentración del $0,25CC_{50}$. Obteniendo una disminución de la velocidad de consumo de oxígeno en un 35 y 34 % en el estado basal y el estado leak, respectivamente.

A partir de los resultados *in silico*, se sugiere que los compuestos quercetina, ácido gálico, carvacrol y timol podrían inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, por posibles interacciones con el complejo II. Posteriormente con los ensayos *in vitro* se determinó que el ácido gálico puede presentar efecto sinérgico y potenciar el efecto de la doxorrubicina bajando las concentraciones de la CC_{50} a $0,25CC_{50}$ siendo estas, 33,9 μM para el ácido gálico y 0,49 μM para la doxorrubicina. Además, la mezcla ácido gálico- doxorrubicina tuvo efecto sobre la respiración celular en células MCF-7.

Abstract

Title: Identification of secondary metabolites of medicinal plants as adjuvants in the treatment of breast adenocarcinoma with doxorubicin.

Author(s): Mayra A. Carreño-Corzo, Luis C. Vesga, Stelia C. Méndez-Sánchez.

Key Words: breast cancer, MCF-7, cytotoxicity, secondary metabolites

Description:

Cancer is a disease that can develop in anyone, regardless of gender or age. In 2020, 19.3 million new cases of cancer and 10 million deaths were registered worldwide, with breast cancer being the main type of cancer diagnosed in women and the leading cause of death in them, so there is a need to search for new compounds that help mitigate the side effects and resistance to drugs used in existing treatments (Coley, 2008a).

Due to the increasing resistance to the drugs currently used to fight cancer, the main objective of this project was to identify secondary plant metabolites that potentiate the anticancer effect of doxorubicin (a compound used in chemotherapy) in MCF-7 mammary carcinoma cells, having the mitochondria as molecular target, due to its importance in cancer because it is involved in the control of cell death, proliferation and signaling (Grasso et al., 2020).

To achieve the above objective, a database of 187 metabolites was screened using a molecular modeling interface. It started by calculating the ADME properties of the metabolites in the database, then docking was performed with two degrees of accuracy (standard accuracy and extra-precision) to determine the possible interactions of the metabolites with residues Arg 46, Ser 42 and Ile 30, identified as important for their involvement in binding inhibitors of complex II (PDBID: 1ZOY, resolution 2, 4 Å) of the mitochondrial respiratory chain (Kluckova et al., 2015).

The screening identified four potential compounds: quercetin, thymol, carvacrol, and gallic acid as the best potential inhibitors of complex II of the mitochondrial respiratory chain. Subsequently, the cytotoxicity effect of these compounds on mammary adenocarcinoma cells (MCF-7) was performed by using the MTT method described by Mossmann, the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined at 48 hours of treatment for each previously selected metabolite, whose values were 195, 612, 136, and 372 μM , for quercetin, carvacrol, gallic acid, and thymol, respectively. In addition, the (CC_{50}) for the drug doxorubicin was determined, which was 1,94 μM .

Following this, cytotoxicity assays were performed by exposing MCF-7 cells, at different concentrations, to mixtures between the metabolites quercetin, thymol, and gallic acid, and the drug doxorubicin. From this assay, the gallic acid - doxorubicin mixture was selected as the best with cytotoxic concentrations ($0,25CC_{50}$, $0,5 CC_{50}$ and CC_{50}), employing the crystal violet assay under the same conditions already mentioned.

Finally, cellular respiration assays were carried out to determine the effect of the gallic acid-doxorubicin mixture on mitochondrial bioenergetics, exposing MCF-7 cells for 24 hours to the mixture at a concentration of $0,25CC_{50}$, obtaining a decrease in the rate of oxygen consumption by 35 and 34% in the basal and leak states, respectively.

The *In silico* results suggest that the compounds quercetin, gallic acid, carvacrol and thymol could inhibit the mitochondrial respiratory chain due to possible interactions with complex II. with the *In vitro* assays determined that gallic acid had synergistic effect and potentiate the effect of doxorubicin by lowering the concentrations of the CC_{50} to $0,25CC_{50}$ being these, $33,9 \mu\text{M}$ for gallic acid and $0,49 \mu\text{M}$ for doxorubicin. In addition, the gallic acid-doxorubicin mixture had an effect on cellular respiration in MCF-7 cells.

Introducción

El cáncer es considerado un problema de salud pública debido al incremento en su incidencia y a sus altas tasas de mortalidad (Roser,2020.). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estima que, a nivel mundial, uno de cada cinco personas desarrolla cáncer durante su vida, y uno de cada ocho hombres y una de cada once mujeres mueren a causa de la enfermedad (IARC, 2020).

En el 2020 se registraron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer, y 10 millones de muertes (GLOBOCAN,2020), siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado de 1,8 millones de muertes (18 %), seguido del cáncer colorrectal (9,4 %), de hígado (8,3 %), de estómago (7,7 %) y de mama femenina (6,9 %) (Sung et al., 2021).

Además, aunque el cáncer de mama se encuentra en quinto lugar en mortalidad (Sung et al., 2021), es la principal causa de muerte en las mujeres a lo largo de su ciclo de vida debido a que su diagnóstico y la resistencia a los fármacos utilizados en su tratamiento va en aumento (Coley, 2008b; Kim et al., 2018; Sung et al., 2021). Con base en lo anterior, existe la necesidad de buscar nuevos compuestos para el tratamiento de cáncer de mama y mejorar los ya existentes (Burge & Lichtenberger, 2019; Coley, 2008b; Lao et al., 2013).

Por lo tanto, este estudio se realizó con el objetivo de identificar metabolitos que ayuden a combatir el cáncer de mama potencializando sinérgicamente el efecto de la doxorubicina, fármaco utilizado para el tratamiento de este tipo de cáncer (Burge & Lichtenberger, 2019), tomando como diana farmacológica la mitocondria, ya que se ha demostrado que este organelo tiene gran importancia en el cáncer debido a que interviene en el control de la muerte, la proliferación y la señalización celular (Grasso et al., 2020).

Para cumplir con el objetivo de este trabajo de grado, se realizó un cribado *in silico* por medio de acoplamiento molecular, donde se identificaron metabolitos secundarios de plantas medicinales (carvacrol, ácido gálico, quercetina y timol), los cuales podrían tener un alto potencial inhibitorio de la cadena respiratoria mitocondrial. Posteriormente, se evaluó la actividad citotóxica de los metabolitos previamente identificados, así como la del fármaco doxorubicina; a partir de estos resultados, se encontró la concentración a la cual se reduce la viabilidad de las células MCF-7 a un 50% (CC_{50}), siendo estas; 195, 612, 136, 372 y 1,94 μM , para la quercetina, carvacrol, ácido gálico, timol y la doxorubicina, respectivamente.

Con base en los resultados anteriores, se realizaron ensayos de citotoxicidad mezclando los metabolitos seleccionados con el fármaco, obteniendo que el ácido gálico es capaz de potenciar el efecto de la doxorubicina sobre las células de cáncer de mama MCF-7, finalmente se realizaron ensayos de respiración celular con la mezcla ácido gálico - doxorubicina para determinar su efecto sobre la bioenergética mitocondrial. Obteniendo una disminución de la velocidad de consumo de oxígeno en 35 % en el estado basal y 34 % en el estado leak.

Para una mayor comprensión de los resultados obtenidos, se presenta el estado del arte sobre la epigenética del cáncer y el metabolismo de las células cancerígenas, la contribución de la mitocondria en el cáncer, las características del cáncer de mama, tratamientos y un enfoque para el tratamiento del cáncer de mama, usando metabolitos de plantas como inhibidores de la respiración mitocondrial y el docking molecular en el descubrimiento de fármacos. Finalmente, con el fin de facilitar la lectura y entendimiento de los resultados obtenidos en este trabajo de grado, se dividieron los resultados en 2 capítulos. En el primer capítulo se abarca los datos relacionados con la fase *in silico* del proyecto, donde se logra la identificación de metabolitos de plantas como posibles inhibidores del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. Por otra

parte, en el capítulo 2 se consignan los resultados y análisis de la evaluación *in vitro* de los metabolitos previamente identificados en la viabilidad celular, así como en la respiración celular.

Marco de referencia y antecedentes

1.1. Epigenética del cáncer y metabolismo de las células cancerígenas

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales que pueden llegar a invadir tejidos u órganos. Debido a esto el cáncer se puede desarrollar en cualquier órgano del cuerpo cuando este cumple ciertas condiciones (Nawaz, 2011). Además, durante su desarrollo las células adquieren nuevas capacidades que incluyen mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir a la inducción de procesos de muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, y activar la invasión e inducir metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

Una cualidad importante de las células cancerosas es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species), donde las mitocondrias juegan un papel central en la regulación de la producción y eliminación de ROS (Miriyala et al., 2014). Además, las mitocondrias participan en la señalización celular en condiciones de vida o muerte, un cambio del estado redox de las células a condiciones oxidativas activa la señalización retrograda mitocondrial, una vía de comunicación desde las mitocondrias hasta el núcleo que conduce a la activación de la respuesta de muerte celular (Miriyala et al., 2014). Por lo cual, es importante comprender su funcionamiento y participación en esta enfermedad.

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

La morfología, funciones, y dinámica de las mitocondrias anormales se han asociado durante mucho tiempo con la transformación celular maligna (Roth et al., 2020). Otto Warburg fue uno de los primeros en observar el fenómeno en el que las células cancerosas utilizan la glucólisis, incluso en condiciones ricas en oxígeno, y producen un exceso de lactato, un proceso definido como glucólisis aeróbica que a menudo se conoce como el efecto Warburg (Deberardinis & Chandel, 2020).

Aunque la mayoría de las células cancerosas tienen mitocondrias funcionales, se ha demostrado que algunos tipos de cáncer, como postuló Warburg, tienen mitocondrias disfuncionales, en particular cánceres asociados con mutaciones que afectan a las enzimas mitocondriales como la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la succinato deshidrogenasa (SDH) (Roth et al., 2020). Por su parte, la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), también conocida como complejo mitocondrial II, es un complejo que participa tanto en el ciclo del ácido cítrico, donde oxida el succinato a fumarato, como en la cadena de transporte de electrones, donde reduce la ubiquinona a ubiquinol (Dalla Pozza et al., 2020). Una falla o mutación en cualquiera de las subunidades de la SDH, da como resultado la desestabilización de todo el complejo enzimático y una disminución en su actividad, provocando un fallo en la mitocondria (Rustin et al., 2002).

Por lo anterior, la mitocondria tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer, convirtiéndola en una diana farmacológica. Además, se ha vinculado la disfunción mitocondrial con la aparición de cáncer de mama, debido a que esta se relaciona con diversos mecanismos adquiridos por células cancerosas durante su transformación, como son: capacidad replicativa ilimitada, angiogénesis sostenida, evasión de apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, y, por último, invasión de tejidos y metástasis (Alberto

& Torres, 2013). Igualmente se ha asociado el complejo II mitocondrial a este tipo de cáncer por su participación en la transferencia de electrones y en el ciclo de Krebs, además de que su silenciamiento conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) (Kluckova et al., 2015). Además de conocer la participación que tiene la mitocondria en el cáncer de mama es importante conocer los tratamientos, causas y factores de riesgos de este.

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

El carcinoma mamario se origina en las células del epitelio glandular y, posteriormente, en su crecimiento atraviesan la membrana basal y el estroma subyacente (Fernández et al., 2021). Adicionalmente, por los cambios en la expresión génica las células adquieren la capacidad de infiltrar vasos linfáticos y sanguíneos alcanzando dichos torrentes y promoviendo su metástasis (Fernández et al., 2021).

Algunos factores de riesgo asociados al carcinoma mamario son, la edad, el peso y el factor de riesgo principal el sexo, ya que se ha demostrado que la incidencia de desarrollar esta enfermedad es mayor en mujeres (Goldman et al., 2021). Además, que en cuanto más temprana es la primera menstruación de la mujer, mayor es el riesgo de padecerlo (Rosero Rodríguez et al., 2015).

El pronóstico y las opciones de tratamiento del cáncer de mama generalmente se basan en la clasificación de la metástasis en los ganglios tumorales, la invasión linfovascular, el grado histológico, el estado del receptor hormonal, la sobreexpresión de la proteína ERBB2 (antes HER2 o HER2 / neu), las comorbilidades, el estado de la menopausia y la edad de la paciente (Maughan et al., 2010). Generalmente este tipo de cáncer se presenta como una alteración mamográfica o un cambio físico de la mama, como una masa o un engrosamiento asimétrico, secreción por el pezón

o cambios cutáneos del pezón (Goldman et al., 2021). Por este motivo, el primer paso para pronosticar esta enfermedad es el cribado sistemático mediante mamografía o examen clínico que dan como resultado un diagnóstico precoz del cáncer de mama (Marks et al., 2000).

Las opciones de tratamiento incluyen desde la medicina quirúrgica, médica complementaria, hasta la alternativa (CAM). Existen una gran variedad de tratamientos a causa de la gran cantidad de subtipos de cáncer de mama existentes, debido a que cada uno de ellos poseen diferentes características (Arif & Ghezzi, 2018). La quimioterapia es el tratamiento estándar para las mujeres con cáncer de mama localmente avanzado (LABC), con ganglios positivos o con un tumor de más de 1 cm (Maughan et al., 2010). En este tratamiento se utilizan antraciclinas como la doxorubicina y la epirubicina, y taxanos como el docetaxel y el paclitaxel (Maughan et al., 2010).

En general, la quimioterapia de inducción y la terapia endocrina de inducción son los tratamientos comúnmente utilizados en el cáncer de mama (Sushma Agrawal, 2020). La terapia endocrina de inducción (tamoxifeno con o sin inhibidores de la aromatasas) es menos efectiva y tóxica que la quimioterapia, por lo cual es la más apropiada para pacientes que no están dispuestos a aceptar la toxicidad relacionada con la quimioterapia. (Mauri et al., 2005). Sin embargo, estos tratamientos pueden presentar efectos secundarios agudos y crónicos a largo plazo como, toxicidad cardíaca, disfunción reproductiva, neumonitis (RP), edema linfático del brazo, neuropatía y los cambios cutáneos son ejemplos de la amplia gama de complicaciones (Sushma Agrawal, 2020).

Además de los efectos secundarios, la resistencia a los quimioterapéuticos es una dificultad en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama debido no solo a que limita la eficacia terapéutica, sino que también expone a los pacientes a una toxicidad grave en los tejidos sanos.

Las antraciclinas, aunque son los fármacos más antiguos empleados en este cáncer, en conjunto con los taxanos son utilizados en la quimioterapia estándar pero desafortunadamente, junto con otros componentes de la quimioterapia, estos agentes se vuelven cada vez más ineficaces en la enfermedad y los tumores generan resistencia a estos fármacos (Coley, 2008a).

Por lo tanto, es necesario la identificación de nuevos compuestos con actividad citotóxica selectiva hacia las células cancerosas, generando así una reducción de efectos secundarios producidos por la quimioterapia y la radioterapia. Además de compuestos que puedan modular el metabolismo y bioenergética mitocondrial con el fin de emplearse como terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama. Una alternativa para llevar acabo esto es la combinación de los fármacos utilizados en su tratamiento con metabolitos secundarios de plantas medicinales (Lin et al., 2020).

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

La medicina herbaria es conocida y usada en el mundo como una alternativa para aliviar dolores o curar enfermedades (Loraine et al., 2010), mediante la cual se ha logrado descubrir compuestos derivados de plantas, como la prostratina que actúa sobre el virus del sida, además de compuestos prometedores contra el cáncer, como la vincristina y el paclitaxel (Loraine et al., 2010).

El uso de productos naturales como agentes anticancerígenos es un enfoque terapéutico aceptable debido a su accesibilidad, aplicabilidad y citotoxicidad (Lin et al., 2020), además de ser usados con el fin de ampliar la ventana terapéutica de los fármacos quimioterapéuticos y disminuir la aparición de resistencia a la quimioterapia (Lin et al., 2020).

Con el fin de buscar metabolitos secundarios que contribuyan al tratamiento contra el cáncer de mama, en este trabajo de grado se evaluó la actividad citotóxica de algunos compuestos naturales sobre las células de adenocarcinoma de mama MCF-7, como lo fueron, el ácido gálico, la quercetina, el timol y el carvacrol.

Por su parte, el ácido gálico altera la expresión del gen p53, incrementando su concentración, lo que conlleva la inducción de la apoptosis por activación del gen diana y transactivación independiente en las mitocondrias, con un CC_{50} de 18,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 48 horas (Moll & Zaika, 2001; Rezaei-Seresht et al., 2019a), al igual que el timol con un CC_{50} de 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 48 horas de tratamiento (Seresht et al., 2019b).

De igual forma, el carvacrol induce apoptosis a través de la ruta p53, además de la ruta Bcl-2/Bax. Por otro lado, el tratamiento con este compuesto induce la expresión génica de las enzimas caspasa 3, 9 y 6 y la fragmentación del ADN genómico, con un CC_{50} de 244,7 μM a 48 horas (Al-Fatlawi et al., 2014). Además, se ha identificado a la quercetina como un metabolito que inhibe la viabilidad y proliferación de las células, con un CC_{50} de 73,8 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ a 48 horas de tratamiento (Niazvand et al., 2019).

Se debe resaltar que en los trabajos anteriormente mencionados el método para determinar el CC_{50} de los compuestos fue el método colorimétrico MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) y fue determinado en células de cáncer de mama de la línea celular MCF-7.

Además de la búsqueda de metabolitos que posean efecto anticancerígeno, se ha identificado que la combinación de ellos con un fármaco potencializa su efecto citotóxico (Tun et al., 2019). Por lo cual, aunque a los compuestos mencionados ya se les ha reportado actividad anticancerígena, se decidió determinar sus CC_{50} y evaluar el efecto sinérgico de los metabolitos

con la doxorubicina, fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama, teniendo como diana farmacológica la mitocondria ya que estas combinaciones no han sido reportadas.

En base a lo anterior, es importante conocer y comprender los diferentes métodos empleados en este trabajo de grado, tanto *in vitro* como *in silico* para la identificación de metabolitos, ya que una elección previa de estos implica un beneficio económico y evita prolongar el desarrollo del proyecto, por lo cual en este trabajo de grado se propuso identificar metabolitos secundarios que tengan como diana terapéutica la mitocondria, empleando un enfoque computacional.

1.5. Docking molecular y descubrimiento de fármacos

El docking molecular es un tipo de modelado computacional que explora el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión de una proteína objetivo (Pagadala et al., 2017). Por lo cual, el acoplamiento molecular a menudo es utilizado para predecir la orientación de la unión de moléculas (candidatas a fármacos) a su objetivo biomolecular (como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) con el objetivo de establecer parámetros tentativos de unión y así obtener datos brutos para el diseño de fármacos con nuevos agentes con mayor eficacia y especificidad (Agarwal & Mehrotra, 2016).

Este modelado computacional ha sido utilizado para la investigación de diferentes compuestos adyuvantes contra el cáncer, como es en el caso del cáncer de mama. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Acharya y colaboradores en el 2019 donde se centraron en 4 receptores de cáncer de mama: ER α (receptor alfa de estrógeno), PR (receptor de progesterona), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y Mtor (objetivo de rapamicina en

mamíferos), seleccionándolos como sitio de unión de 23 furanocumarinas utilizadas en este trabajo (Acharya et al., 2019).

En esta investigación obtuvieron que, de las 23 furanocumarinas evaluadas, 19 exhibieron valores de energía de acoplamiento superiores a -6 kcal/mol para los receptores de cáncer de mama seleccionados, posteriormente evaluando las reglas de lipinski concluyeron que solo 20 las cumplían, de estos 20 solo 5 exhibieron energías de afinidad de unión altas hacia los receptores, estos fueron; XAN (xantotoxol), BER (bergapteno), ANG (angelicina), PSO (psoraleno) e IMP (isoimperatorina). Siendo el XAN quien obtuvo la mejor confirmación de acoplamiento con una afinidad de unión de -13,56 kcal/mol hacia ER α , -18,10 kcal/mol hacia PR, -14,09 kcal/mol para EGFR y -11,93 kcal/mol para mTOR seguido por BER, ANG, PSO e IMP, seleccionando así a XAN, BER, ANG, PSO, IMP en función de sus mejores puntajes de acoplamiento contra el cáncer de mama, lo que validaron mediante ensayos *in vitro* específicos del Potencial antagonista en ER α y EGFR y el potencial inhibidor de Mtor confirmando que estos valores se debían a la inhibición de cada receptor (Acharya et al., 2019).

Basándose en las afinidades de unión exhibidas por los estudios de acoplamiento respaldados por los ensayos *in vitro*, Acharya y colaboradores llegaron a la conclusión de que los cinco compuestos de furanocumarina seleccionados, pueden considerarse como potentes agentes cancerígenos contra ER α , PR, EGFR y mTOR y es necesario investigar más a fondo realizando estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos de cáncer de mama para el tratamiento y la prevención de este tipo de cáncer (Acharya et al., 2019). Lo cual demuestra que esta herramienta computacional es de gran utilidad para identificar posibles fármacos o compuestos específicos con actividad anticancerígena, con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencialicen el efecto anticanceroso de la doxorrubicina en células del carcinoma mamario MCF-7, teniendo como blanco molecular la mitocondria.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar por medio de docking molecular metabolitos de plantas medicinales que puedan interaccionar con el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Evaluar la actividad citotóxica y el sinergismo del fármaco doxorrubicina con los metabolitos previamente identificados sobre la línea celular del carcinoma mamario MCF-7.
- Determinar el efecto de los compuestos con mejor actividad citotóxica sobre la bioenergética mitocondrial en la línea celular del carcinoma mamario MCF-7.

***CAPITULO 1. DETERMINACIÓN in silico DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
PLANTAS MEDICINALES CON EFECTO INHIBITORIO EN LA CADENA
RESPIRATORIA MITOCONDRIAL***

En este capítulo se abordará la identificación de compuestos empleando enfoques computacionales buscando cumplir con el objetivo de identificar por medio de docking molecular metabolitos de plantas medicinales que puedan interactuar con el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.

1. Metodología fase *in silico*

Como se muestra en la **figura 1**, el análisis *in silico* consto de 6 fases. Donde en la primera fase se creó una base de datos de metabolitos de plantas medicinales con actividad anticancerosa reportada en la literatura. Para su realización se partió de la base de datos creada por el grupo de investigación en bioquímica y microbiología GIBIM (Anexo A). Posteriormente se prepararon sus estructuras químicas y la estructura cristalina de la subunidad del complejo II (subunidad C). seguido de esto se seleccionaron los residuos Arg 46, Ser 42 y Ile 30 y el sitio de unión de la ubiquinona, para finalmente realizarse el docking molecular con los diferentes grados de precisión, uno de precisión estándar (docking SP) y otro de extra-precisión (docking XP). Finalmente se seleccionaron los posibles mejores inhibidores, teniendo en cuenta parámetros como, el docking score, la energía de afinidad, interacciones con aminoácidos relevantes, y las propiedades ADME.

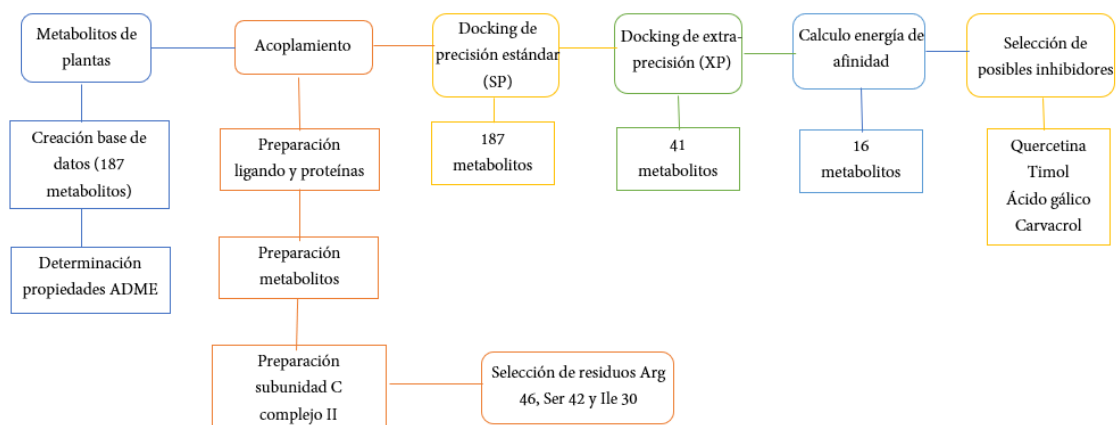


Figura 1. Esquema metodológico *in silico* para la selección de metabolitos con posibles interacciones con el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial

1.1 Construcción de base de datos y preparación de ligandos

Se inició con la creación de una base de datos con 187 metabolitos y sus estructuras químicas en formato sdf, junto con la estructura de la doxorubicina, fármaco de referencia empleado en el tratamiento del cáncer de mama. Estos compuestos fueron visualizados y preparados usando la herramienta Ligprep (LigPrep, versión 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015), generando su conformación en tres dimensiones, con la menor energía, y que mantuviera la quiralidad y estereoisomería de cada molécula. Además, 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).

1.2 Preparación de proteínas

La preparación de la estructura cristalina de la proteína y los cálculos del docking, fueron realizados utilizando la interfaz Maestro del paquete de Schrödinger Drug Discovery suite for molecular modeling (2020-4). Primero, la estructura cristalina del complejo II de la cadena

respiratoria mitocondrial (PDBID: 1ZOY, resolución 2,4 Å (Kluckova et al., 2015)), fue obtenida de la Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), luego, usando el módulo Protein Preparation wizard, se preparó la subunidad C del complejo II, dado que en ella se encuentra uno de los sitios de unión de la ubiquinona y su mutación aumenta los niveles de producción de ROS, la inestabilidad genómica y la tumorigénesis de las células mutantes (Dalla Pozza et al., 2020). De esta forma, 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; Madhavi Sastry et al., 2013).

1.3 Docking molecular

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 posicionan los metabolitos. Se siguió el protocolo utilizado por Kluckova y colaboradores en el año 2015, creando así una caja de 7 Å en cada arista, centrada en los residuos Arg 46, Ser 42 y Ile 30, los cuales fueron identificados como importantes por su participación en la unión de inhibidores del complejo II, tomando como referencia el protocolo mencionado en el artículo de Kluckova (Kluckova et al., 2015).

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

En primer lugar, se realizó el docking SP con los 187 metabolitos pertenecientes a la base de datos creada, y fármaco de referencia doxorubicina, 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 inglés), de los metabolitos usando la herramienta Qikprop (Qikprop, versión 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015).

Posteriormente 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 los metabolitos seleccionados se realizó el docking XP, 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 base a estos resultados, y teniendo como criterios de selección el número de interacciones con aminoácidos importantes y el docking score, se seleccionaron 17 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 17 metabolitos de la base de datos, se predijo la energía de afinidad, usando la herramienta Prime MM-GBSA (del inglés Molecular Mechanics-Generalized Born/Surface Area) 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 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.) y el editor de imágenes Inkscape 1.0.

2. Resultados y discusión

A partir de 187 metabolitos, se construyó una base de datos (anexo A), donde se observan las propiedades ADME y sus respectivos nombres. Usando esta base de datos se realizó un docking molecular, el cual permitió seleccionar los posibles mejores inhibidores del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial.

Inicialmente, se seleccionaron 41 posibles metabolitos teniendo en cuenta las reglas de Lipinski, sus interacciones con los residuos seleccionados, y el docking score del docking SP. Posteriormente se realizó un docking XP y se seleccionaron 16 metabolitos como posibles inhibidores del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, para posteriormente calcular su energía de afinidad (**tabla 1**), estos fueron seleccionados teniendo en cuenta los parámetros anteriormente mencionados, adicionando el docking score del docking XP.

Tabla 1. Docking score, energía de afinidad y descriptores ADME de los posibles mejores inhibidores del complejo

II

Compuesto	DS	EA [kcal/mol]	PM	Log P O/A	DH	A H	PSA	ER	Caco- 2	MDCK
Quercetina	-4,749	-39,50	302,24	0,41	1	4	91,9	1	58	23
Niazirin	-4,609	-21,23	279,29	0,05	3	9	103,0	3	166	71
Sinigrin	-4,100	-18,07	359,37	-1,4	5	14	186,0	7	5	2
Sinalbin	-3,939	-45,06	425,43	-1,56	6	15	207,5	7	0	0
Catequina	-3,433	-31,00	290,27	1,39	2	2	81,3	1	107	44
Baicaleína	-3,296	-42,26	270,24	0,54	1	3	68,4	1	194	84
Arbutin	-3,215	-37,27	272,25	-1,05	5	10	125,1	3	69	27
Ácido gálico	-2,863	-6,49	170,12	-0,55	1	2	84,4	1	106	43

Ácido clorogénico	-2,771	-45,04	354,31	-1,88	6	10	99,7	5	50	19
Timol	-2,451	-22,93	150,22	3,3	1	1	20,9	1	3816	2104
Esclareol	-2,370	-41,10	308,5	5,01	2	2	35,9	4	3034	1642
Capsaicina	-2,330	-36,30	305,42	3,76	2	2	36,7	9	1860	967
Miricetina	-2,156	-29,96	318,24	0,58	1	4	108,5	1	39	15
Emodina	-2,224	-25,82	270,24	0,13	1	4	67,7	0	340	154
Brasilin	-1,779	-34,03	286,28	1,3	4	4	96,2	0	137	57
Carvacrol	-1,375	-33,00	150,22	3,3	1	1	21,5	1	3687	2027
Doxorrubicina	-	-	543,53	-0,39	5	14	214,8	11	2	0
2-Tenoiltrifluoroacetona	-1,664	-24,74	22,19	1,46	0	6	4,14	3	0,537	1

Nota: Se muestran los resultados obtenidos de DS: docking score 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, AH: número de aceptores de puentes de hidrogeno, PSA: área de superficie polar y ER: número de enlaces rotatorios, sus rangos recomendados son 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20, 7 – 200 y 0 – 15, respectivamente; los resultados de permeabilidad en células: Caco-2: células intestinales y MDCK: células renales. 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 azul (≥ 500): alta permeabilidad.

Como se observa en la **Tabla 1**, las propiedades ADME, docking score (DS) y energía de afinidad (EA) sugieren que los mejores compuestos como inhibidores del complejo II serían los compuestos quercetina, baicaleina, ácido gálico, timol, esclareol, y carvacrol.

La quercetina presentó un valor de docking score de (-4,749) y un valor de EA (-39,50 kcal/mol) además, por sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antiinflamatorias por ser un flavonoide, ha sido objeto de estudio y se ha demostrado que la quercetina induce apoptosis y produce efectos antiproliferativos en la línea celular MCF-7 (C.C.Chou et al., 2010; Rhman et al., 2022).

La baicaleina por su alto valor de EA (-42,26 kcal/mol) y un DS alto (-3,296) además de producir una inhibición significativa de la proliferación contra las células de cáncer de mama a

través de múltiples vías mediadas por especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) (Liu et al., 2019). El esclareol por sus valores de EA (-41,10 kcal/mol) y DS (-2,370) y poseer una alta permeabilidad (Caco-2: 3034 y permeabilidad MDCK: 1642). Además, se ha demostrado que el esclareol es capaz de inhibir la síntesis de ADN, inducir la detención del ciclo celular y desencadenar la apoptosis (Afshari et al., 2020). Estos metabolitos, es decir, la baicaleina y el esclareol no se pudieron usar en los ensayos *in vitro* debido a que su tiempo de entrega no fue adecuado.

El ácido gálico, aunque obtuvo valores de EA (-6,49 kcal/mol) y DS (-2,863) bajos, posee una permeabilidad intermedia (Caco-2: 106 y permeabilidad MDCK: 43), lo cual indica que este podría tener una buena absorción por vía oral y ser capaz de penetrar hasta la mitocondria, además se ha demostrado que el ácido gálico puede desencadenar apoptosis, mediante diferentes vías, como la liberación de citocromo *c* de las mitocondrias al citosol, la activación de caspasa-3, la condensación nuclear, el encogimiento celular y la membrana plasmática (Tang & Cheung, 2021). Otro motivo por el cual se eligió fue el estudio realizado por Maurya y colaboradores donde el ácido gálico demostró que inhibe el crecimiento celular en células A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) y disminuye la viabilidad celular e inhibe la proliferación celular en forma dependiente de la dosis y el tiempo (Maurya et al., 2011).

Aunque el timol obtuvo bajos valores de DS (-2,451) y EA (-22,93 kcal/mol), posee una alta permeabilidad (Caco-2: 3816 y MDCK: 2104), lo que indica una buena absorción y una posible penetración hasta la mitocondria. Este metabolito ya ha sido usado en otros tipos de cáncer como lo es el cáncer colorrectal donde se obtuvo que el tratamiento con timol de forma *in vitro* inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis y la detención del ciclo celular en CCR (cáncer colorrectal) (Zeng et al., 2020), además para su elección se tuvo presente los resultados obtenidos

en el grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) en un estudio realizado con mosquitos donde se obtuvo que el timol inhibe la succinato deshidrogenasa, complejo II mitocondrial.

Por último, se eligió el carvacrol, al igual que el timol por su alta permeabilidad (Caco-2: 3687 y MDCK: 2027) y por inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Monzote et al., 2009). Además, tanto el carvacrol, el timol y el ácido gálico fueron elegidos por su disponibilidad en el laboratorio.

Se resalta que, aunque los metabolitos sinigrin, sinalbin, niazirin, catequina, arbutin y capsaicina obtuvieron valores de energía de afinidad más favorables y algunos poseen alta permeabilidad, fueron descartados por el factor de costos.

Además de las razones mencionadas anteriormente, se tuvo en cuenta sus interacciones con los residuos Arg 46, Ser 42 y Ile 30, los cuales fueron identificados como importantes por su participación en la unión de inhibidores del complejo II mitocondrial (Kluckova et al., 2015).

Siendo así, la quercetina (DS; -4,749, EA; -39,50 kcal/mol), obtuvo interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile 30, Tyr 33, Trp 35, Ile 43 y Met 39 e una interacción de puentes de hidrogeno con la Ser 42 (**figura 2A**), residuo importante en la inhibición con el 2-Tenoiltrifluoroacetona (TTFA1) (Sun et al., 2005). El Timol (DS; -2, 451, EA; -22,93 kcal/mol) presentó interacciones hidrofóbicas, con los residuos; Trp 35, Ile 43, Met 39, Tyr 33 y Ile 30 (**figura 2B**). El ácido gálico (EA; -6,49 kcal/mol, DS; -2,863) tuvo interacción de puentes de hidrogeno con Ser 42 y el grupo Hemo además de una interacción hidrofóbica con el residuo Ile 43 y una interacción π -catión con la Arg 46 (**figura 2C**). Por otro lado, la inhibición del complejo II por el ácido gálico podría deberse a sus interacciones con los residuos Ser 42 y Arg 46, siendo el primero un sitio de unión del inhibidor 2-Tenoiltrifluoroacetona (TTFA1) (Sun et al., 2005) y

el segundo del inhibidor tiabendazol (TBZ)(Zhou et al., 2011). Finalmente, el Carvacrol (DS; -1, 375, EA; -33,00 kcal/mol) obtuvo interacciones hidrofóbicas con los residuos Trp 35, Ile 43 y Met 39 y una interacción por puente de hidrógeno con la Ser 42 (**figura 2D**), al igual que la quercetina su efecto inhibitorio se asocia a esta interacción (Ser 42), al ser este residuo parte de la inhibición con el 2-Tenoiltrifluoroacetona (TTFA1) (Sun et al., 2005).

Además, se analizó el inhibidor 2-Tenoiltrifluoroacetona (TTFA1) (DS; -1, 664, EA; -24,74 kcal/mol), el cual presentó interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile 30, Trp 35, Ile 43 y Met 39 y una interacción de puente de hidrógeno con la Ser 42 (**figura 2E**), tal como fue identificado por Fei Sun y colaboradores (Sun et al., 2005).

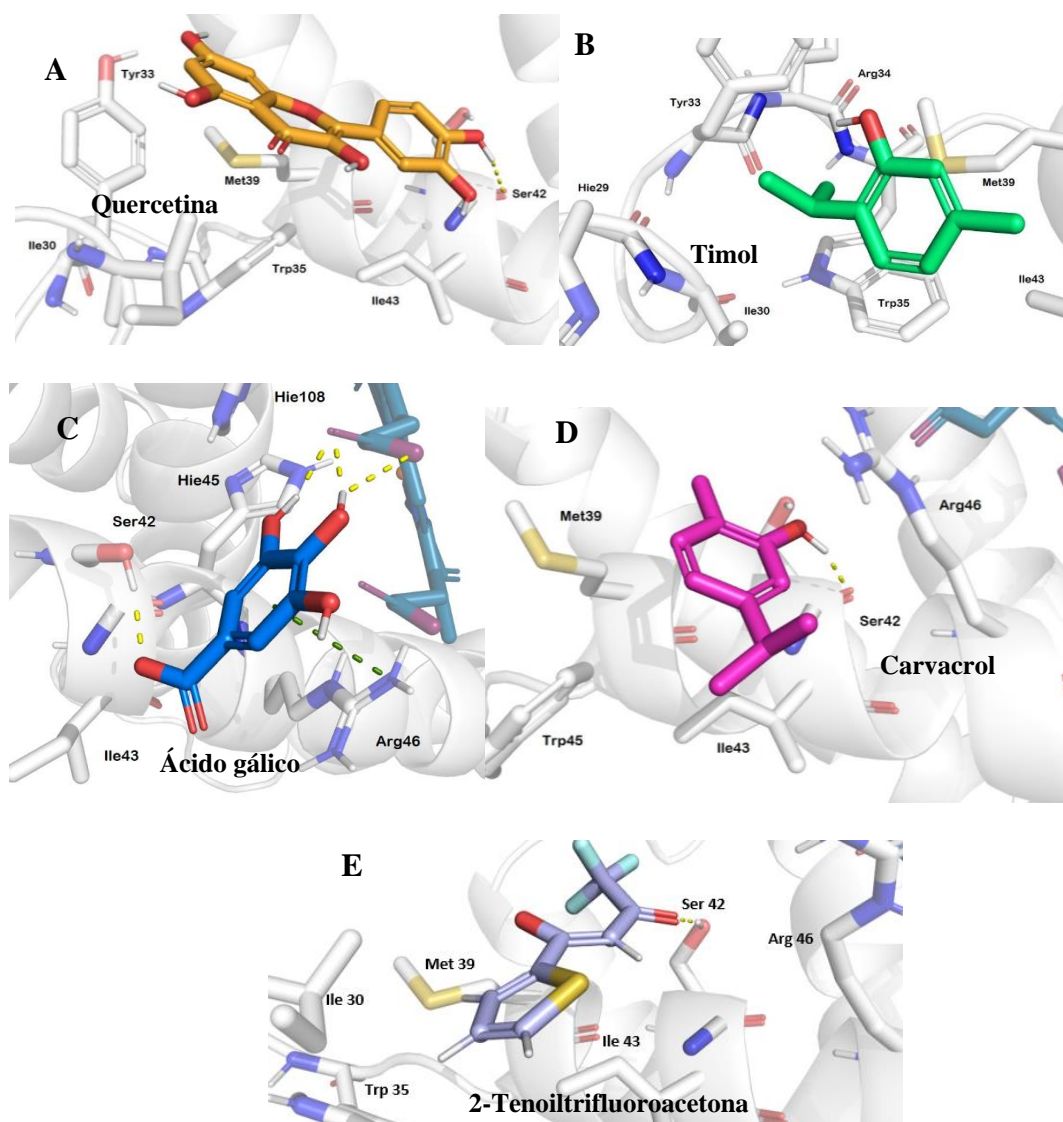


Figura 2. Poses de acoplamiento representativas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores del complejo II. A: timol, B: quercetina, C: ácido gálico, D: carvacrol y E: 2-Tenoiltrifluoroacetona. Los residuos están coloreados de acuerdo con el tipo de átomo de los residuos de aminoácidos que interactúan (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; azufre, amarillo). 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 -catión están coloreadas en verde.

Finalmente, en la **figura 3** se muestran las estructuras químicas de los cuatro metabolitos seleccionados y usados para los ensayos experimentales llevados a cabo en este trabajo de grado.

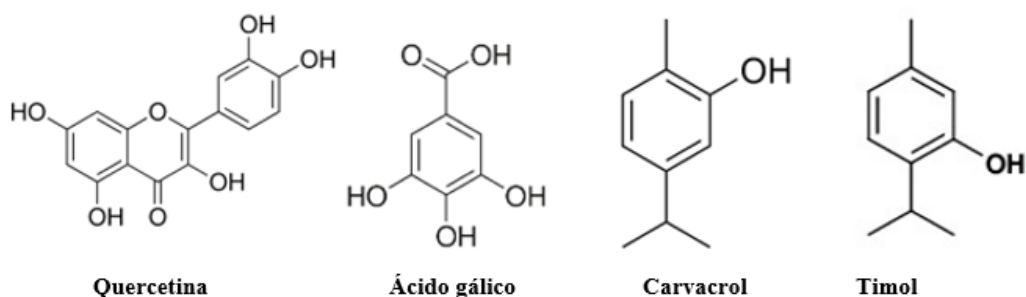


Figura 3. Estructuras químicas de los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de los complejos II de la cadena respiratoria mitocondrial.

Se destaca que el ácido gálico y la quercetina son polifenoles, los cuales se consumen en la dieta humana diaria, encontrándose en una amplia variedad de vegetales, frutas y café. Por otro lado, el carvacrol y el timol son fenoles monoterpénicos isoméricos, que se encuentran en el aceite de tomillo y se extrae de *Thymus vulgaris*, aunque se extraigan de diferentes fuentes, todos poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas (Hassan et al., 2021; Shukla et al., 2022; Souza et al., 2022; Toyota et al., 2022), motivo por el cual también fueron seleccionados en este proyecto .

A partir de los resultados anteriormente mencionados del docking molecular, es posible que los compuestos quercetina, carvacrol, timol y ácido gálico, inhiban el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial por su interacción con los residuos, Arg 46, Ser 42 y Ile 30, los cuales fueron identificados como importantes por ser sitios de unión de inhibidores del complejo II. Por lo cual, se seleccionaron estos compuestos, para realizar ensayos de citotoxicidad sobre las células MCF-7.

CAPITULO 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y SINERGISMO

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

1. Metodología fase *in vitro*

En esta fase se inició determinando el CC_{50} , a 48 horas de tratamiento sobre células MCF-7, de los metabolitos seleccionados quercetina, carvacrol, timol y ácido gálico y los fármacos, doxorubicina y oxaliplatino. Posteriormente, se evaluó el posible sinergismo entre los compuestos al exponer las células MCF-7 a diferentes mezclas entre ellos, y por último se determinó el efecto de la mejor mezcla obtenida sobre la respiración de esta línea celular. El esquema metodológico seguido se muestra en la figura 4.

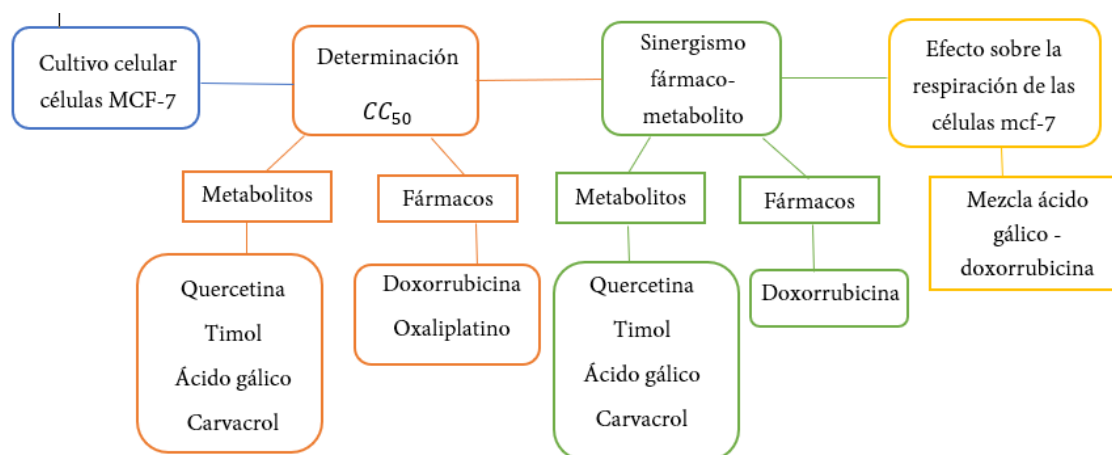


Figura 4. Diagrama metodológico de la fase *in vitro*

1.1 Cultivo celular

Las células de adenocarcinoma de mama MCF-7 se cultivaron en botellas de plástico con medio EMEM (pH 7,3) suplementado con gentamicina 100 µg/mL y 7 % 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 MCF-7 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).

Se inició sembrando las células MCF-7 en placas de 96 pozos ($1 * 10^4$ células/pozo) y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente, se adicionó diferentes concentraciones de cada fármaco de referencia y metabolito seleccionado.

Después de 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 GoThermo.

Los resultados de viabilidad celular se expresaron como un porcentaje de viabilidad respecto al control, además, con estos resultados se calculó el CC_{50} (concentración a la cual se disminuye la viabilidad a un 50%) de cada metabolito o fármaco (Moo-Puc 2009).

1.3 Determinación del sinergismo entre metabolitos y fármaco de referencia por el método colorimétrico MTT

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 MCF-7 al exponer las células a combinaciones entre metabolitos y el fármaco, siguiendo el esquema metodológico de T. Chou (Chou, 2007). Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar posible sinergismo entre ellos.

Estas combinaciones se evaluaron a diferentes concentraciones de los compuestos, manteniendo una relación de concentración equivalente entre ellos, las cuales fueron CC_{50} , para combinaciones binarias; $0,33CC_{50}$ para combinaciones terciarias; y $0,25CC_{50}$ para la combinación cuaternaria. Se seleccionaron las concentraciones teniendo en cuenta la cantidad de compuestos en cada combinación además del CC_{50} (concentración a la cual se disminuye la viabilidad a un 50%) por cual, en una combinación de cuatro compuestos, previendo un efecto del 100% y teniendo en cuenta el efecto aditivo, cada uno debería aportar un 25% al efecto total, asimismo para las demás combinaciones (Tallarida, 2011) .

Finalmente, utilizando la herramienta CompuSyn, se determinó el índice de combinación (IC) y el índice de reducción de la dosis (DRI por sus siglas en ingles “dosereduction index”) de cada concentración de cada combinación. El IC indica el tipo de interacción que puede haber entre los componentes de una mezcla, cuando es menor que 1 nos indica sinergismo, igual a 1, efecto aditivo y mayor que 1, antagonismo. Por otra 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 (T. C. Chou, 2006) .

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la mejor mezcla binaria a la cual se le realizó nuevamente el ensayo colorimétrico MTT a 3 concentraciones diferentes, las cuales fueron; $0,25CC_{50}$, $0,5CC_{50}$ y CC_{50} , además de diferentes tiempos de exposición a la mezcla, estos fueron 12, 24, 48 y 72 horas.

1.4 Determinación del sinergismo entre metabolitos y fármaco de referencia por el método cristal violeta

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en el ensayo colorimétrico MTT, se realizó el ensayo de tinción violeta, ya que ambos tienen principio de acción diferentes. El ensayo colorimétrico MTT mide la viabilidad celular en términos de actividad reductora y está mediada por las enzimas deshidrogenasas presentes en la célula, un indicador sensible y fiable de la actividad metabólica celular (Constante et al., 2022). El MTT soluble amarillo se reduce al formazán purpura, donde la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo (Constante et al., 2022; Nga et al., 2020). Mientras que, en el ensayo de cristal violeta, el colorante cristal violeta, se une a las proteínas y al ADN tiñendo los cuerpos celulares (Feoktistova et al., 2016). Cabe mencionar que ambos ensayos son utilizados por ser rápidos, versátiles y reproducibles (Constante et al., 2022; Feoktistova et al., 2016; Nga et al., 2020).

El ensayo de tinción violeta se llevó a cabo con las mismas concentraciones y tiempos de exposición al fármaco y metabolitos anteriores.

Al igual que el ensayo anterior, las células MCF-7 ($1 * 10^4$ células/pozo) fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . Luego las células se trataron con las diferentes

concentraciones de la mezcla e incubadas por 12, 24, 48, y 72 horas. Al transcurrir estos tiempos, las células fueron lavadas con buffer salino fosfato (tampón PBS, NaCl 680 mM, KCl 13,4 mM y Na_2HPO_4 40,5 mM), y fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente incubadas con 50 μL de solución de cristal violeta (0.02% p/v disuelto en etanol al 2% v/v) durante 5 minutos. Después, las células fueron lavadas con PBS hasta garantizar que se retiró el tinte por completo. Finalmente, se solubilizó el contenido de cada pozo en 200 μL de citrato de sodio (0.05 M) y se realizó la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Los resultados se expresaron en número de células en función del tiempo en horas.

1. 5 Efecto sobre la respiración de las células MCF-7

Con el objetivo de evaluar el efecto en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, de la mezcla con mejor efecto citotóxico, se realizaron ensayos de consumo de oxígeno.

Para esto, las células fueron sembradas (2×10^6 células) en cajas Petri de 8,5 x 1,45 mm por 24 horas a 37 °C, 5% CO_2 . Luego las células fueron expuestas a una concentración igual al $0,25\text{CC}_{50}$ de la mezcla entre ácido gálico y doxorubicina (ácido gálico: 33,9 μM y doxorubicina: 0,49 μM) por un periodo de 24 horas. Después, las células fueron aisladas con 1,5 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 mg/mL); y desacoplado, el consumo de oxígeno en presencia del desacoplador FCCP (4 μM). Además, se determinó el flujo de oxígeno de la

respiración no mitocondrial, que se obtuvo con la adición de rotenona (1 μ M) y antimicina (5,5 μ g/mL) (Meira et al., 2017). Los resultados son expresados como la media del porcentaje del flujo de oxígeno por número de células (pmol O₂/ (seg * 1 * 10⁶ células)) \pm DS.

1.6 Análisis estadístico

En 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 van a producir en el desarrollo de este proyecto de grado serán 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 23 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, los solventes y los colorantes que se usarán en el proyecto se clasifican como residuos químicos peligrosos debido a que pueden ser citotóxicos y causar daño a la salud humana y/o el medio ambiente. De igual manera, se consideran peligrosos los envases,

empaques o embalajes que estén en contacto con ellos. Por tal razón, teniendo en cuenta el código de colores para el almacenamiento de sustancias, los residuos se dispondrán en bolsas de color rojo, se etiquetarán con el rotulo “riesgo químico” y se entregarán 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.) estarán clasificados como residuos infecciosos o de riesgo biológico de acuerdo con el Manuel de gestión integral de residuos, por esta razón serán 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 seguirá las orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC, aquí se realizarán ensayos dosis respuesta en células cultivadas in vitro. Adicionalmente, en la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del ministerio de salud de la república de Colombia, este trabajo de grado se considera sin riesgo de acuerdo con el artículo 11 de esta última resolución (INVIMA, 1993). Adicionalmente teniendo en cuenta el principio de beneficencia mediante ensayos dosis respuesta en células cultivadas in vitro, y siguiendo con los objetivos propuestos, en este plan de trabajo de grado se espera identificar metabolitos secundarios de plantas medicinales que potencialicen el efecto

anticanceroso de fármacos utilizados en el cáncer de mama, para de esta manera, impactar de forma favorable en el tratamiento contra este cáncer. Las células que se utilizaran en este trabajo de grado fueron donadas por el doctor Marcos López de la fundación cardiovascular de Colombia en el año 2016 al grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) dirigido por la profesora de la escuela de química, Stelia Carolina Méndez Sánchez.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de CC_{50}

Al tener seleccionados la quercetina, el timol, el ácido gálico y el carvacrol como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre las células MCF-7 usando estos compuestos. Las células fueron expuestas durante 48 horas a diferentes concentraciones entre 50 a 500 μM de estos metabolitos, y a concentraciones entre 0,5 y 12 μM de los fármacos de referencia doxorubicina y oxaliplatino, teniendo en cuenta concentraciones de citotoxicidad reportadas en la literatura de estos compuestos sobre células MCF-7 (Fang et al., 2014; Raymond et al., 1997; Rezaei-Seresht et al., 2019b, 2019a; Seresht et al., 2019a, 2019b).

Como se observa en la **figura 5A**, el oxaliplatino no disminuyó la viabilidad de las células en ninguna de las concentraciones evaluadas, las cuales fueron; 1, 5, 10 y 12 μM , siendo su porcentaje de viabilidad a la mayor concentración 93%. Razón por la que no fue posible calcular el CC_{50} de este fármaco, descartando así este fármaco para futuros ensayos. Al contrario, la viabilidad de las células disminuyó de forma significativa al ser expuestas al fármaco de referencia doxorubicina, tal como se muestra en la **figura 5A**, siendo su menor porcentaje 37% a la mayor concentración utilizada, es decir 3 μM .

Asimismo, la viabilidad de las células disminuyó de forma significativa en forma dosis dependiente al ser expuestas a los metabolitos, es decir, al ácido gálico, la quercetina, el carvacrol y al timol, como se observa en la **figura 5B y 5C**, donde sus porcentajes disminuyeron hasta 46, 23, 62 y 24 % en sus mayores concentraciones, es decir, 150, 300, 400 y 500 μM , respectivamente.

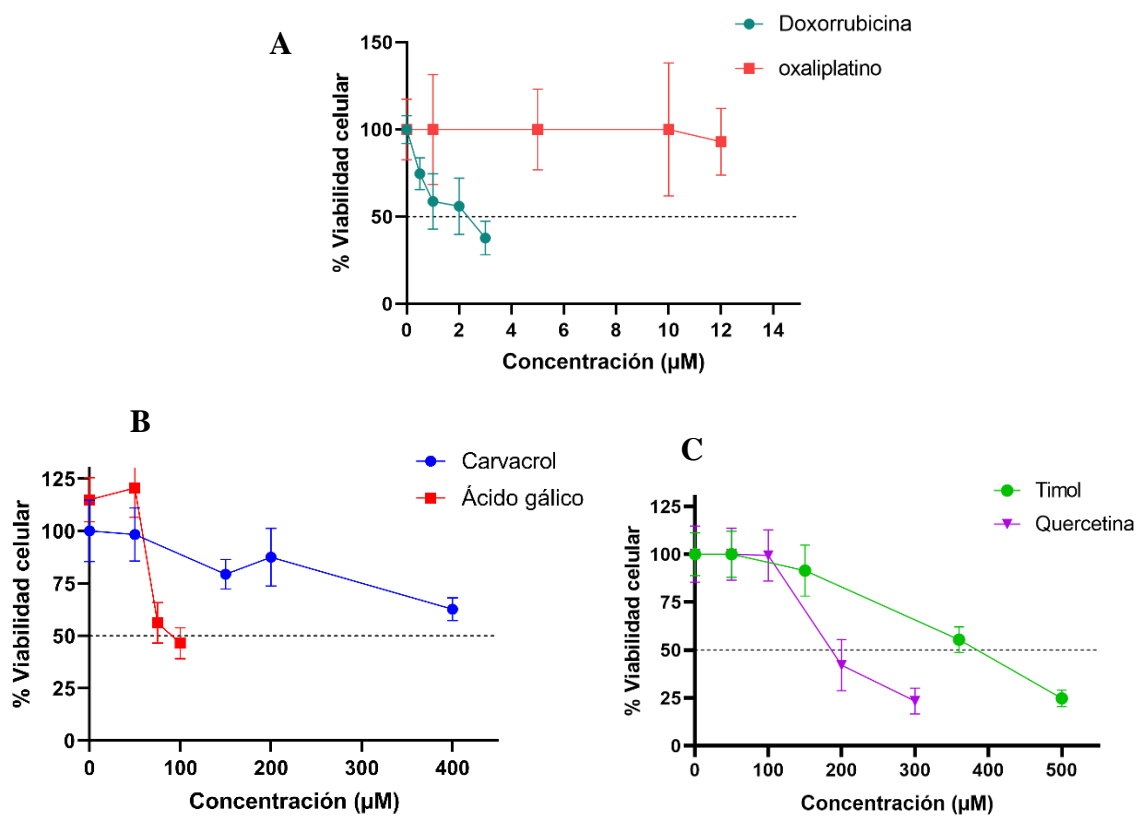


Figura 5. Efecto de la viabilidad celular de células MCF-7 luego de 48 horas de tratamiento Vs. Concentración de los fármacos de referencia. A representa los fármacos de referencia, B y C los metabolitos seleccionados como posibles inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial.

A partir de los resultados mostrados en la **figura 5** se determinó el CC_{50} a las 48 horas de los metabolitos quercetina, carvacrol, ácido gálico y timol, los cuales fueron: 195, 612, 136 y 372 μM , respectivamente, y el fármaco doxorrubicina, cuyo valor fue 1,94 μM , (**tabla 2**).

Tabla 2. CC_{50} a las 48 horas sobre las células MCF-7 de cada metabolito seleccionado y fármaco de referencia

Metabolito/Fármaco	CC_{50} [μM]
Quercetina	195
Carvacrol	612
Ácido gálico	136
Timol	372
Doxorrubicina	1,94

Teniendo en cuenta los resultados de CC_{50} observados en la tabla 2, el oxaliplatino y el carvacrol fueron descartados para futuros ensayos, el primero debido a que no fue posible hallar el CC_{50} a las concentraciones evaluadas, y el carvacrol debido a que su CC_{50} fue un valor alto en comparación con los demás metabolitos seleccionados.

Cabe resaltar que al igual que en los resultados de citotoxicidad obtenidos en este proyecto de grado, se ha reportado en la literatura que los metabolitos seleccionados disminuyen la viabilidad de las células MCF-7 en función de su concentración, y además que lo hacen mediante inducción de apoptosis (Moll & Zaika, 2001; Niazvand et al., 2019; Rezaei-Seresht et al., 2019b; Seresht et al., 2019a). A partir de estos resultados, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad, para determinar si al combinar estos metabolitos con el fármaco doxorrubicina, existe sinergismo entre ellos.

3.2 Determinación de sinergismo entre metabolitos y fármaco de referencia

Con el fin de determinar el tipo de interacción farmacológica que pudiera existir entre los metabolitos (quercetina, timol y ácido gálico) y el fármaco (doxorrubicina), se realizaron ensayos de citotoxicidad exponiendo las células MCF-7 durante 48 horas a mezclas entre los compuestos previamente mencionados. Para esto se realizaron tres mezclas binarias, tres mezclas terciarias y una mezcla cuaternaria (**tabla 3**).

Tabla 4. Mezclas realizadas entre los metabolitos ácido gálico, quercetina y timol y el fármaco doxorrubicina

Constituyentes	MEZCLAS						
	Binarias			Terciaria			Cuaternaria
	T-D	G-D	Q-D	T-G-D	T-Q-D	G-Q-D	T-G-Q-D
Timol	X			X	X		x
Acido gálico		x		X		X	x
Quercetina			x		X	X	x
Doxorrubicina	X	x	x	X	X	X	x

Nota: T: timol, G: ácido gálico, Q: quercetina D: doxorrubicina

Cada mezcla se evaluó a diferentes concentraciones, las binarias con el CC_{50} , las terciarias al $0,33 CC_{50}$ y la cuaternaria $0,25 CC_{50}$ del fármaco y de los metabolitos (**tabla 4**). Estas concentraciones fueron seleccionadas teniendo en cuenta un posible efecto aditivo, de ser así, las mezclas disminuirían la viabilidad a un 0%.

Tabla 4. Concentraciones utilizadas en las mezclas entre los metabolitos ácido gálico, quercetina y timol y el fármaco doxorubicina. Escribir el tiempo de tratamiento con el que se determinó la CC50.

	CONCENTRACIONES (μM)		
	CC ₅₀	0,33 CC ₅₀	0,25 CC ₅₀
Timol	372	122,9	93,1
Ácido gálico	136	44,8	33,9
Quercetina	195	64,3	48,8
Doxorrubicina	1,94	0,65	0,49

Como se observa en la **figura 6A** las mezclas binarias entre la doxorubicina a una concentración de 1,94 μM con el timol, el ácido gálico y la quercetina a concentraciones 372, 136 y 195 μM , respectivamente, generan una disminución de la viabilidad celular superior al 50%, mostrando un posible efecto sinérgico y aditivo. Donde la mezcla ácido gálico + doxorubicina generó la mayor disminución de la viabilidad celular, y mayor efecto sinérgico. Por otra parte, en la **figura 6B** se observa que las mezclas terciarias con la doxorubicina a una concentración de 0,65 μM con los metabolitos, timol + quercetina; timol + ácido gálico; y ácido gálico + quercetina, a concentraciones 122,9 + 64,3, 122,9 + 44,8 y 44,8 + 64,3 μM respectivamente, no generan una disminución de la viabilidad celular mayor al 50%, lo cual nos permite inferir que no se presentó efecto aditivo, ni sinérgico. De igual manera, en la **figura 6C** se puede observar que, al combinar la doxorubicina a una concentración de 0,49 μM con los tres metabolitos, timol, ácido gálico y

quercetina a concentraciones de 93,1, 33,9 y 48,8 μM , respectivamente, se obtiene un porcentaje de viabilidad celular mayor a 50%.

A partir de los resultados obtenidos mostrados en la **figura 6**, se concluyó que tanto las mezclas terciarias, como la mezcla cuaternaria no tuvieron efecto aditivo, dado que su efecto citotóxico no logró una disminución de la viabilidad celular, mayor al 50%. De forma contraria, las mezclas binarias generaron porcentajes de viabilidad celular menores al 50% en las células MCF7, por lo cual se escogió la mejor mezcla para futuros ensayos siendo esta la mezcla ácido gálico + doxorrubicina con un porcentaje de viabilidad de 12,5 % (Figura 6A).

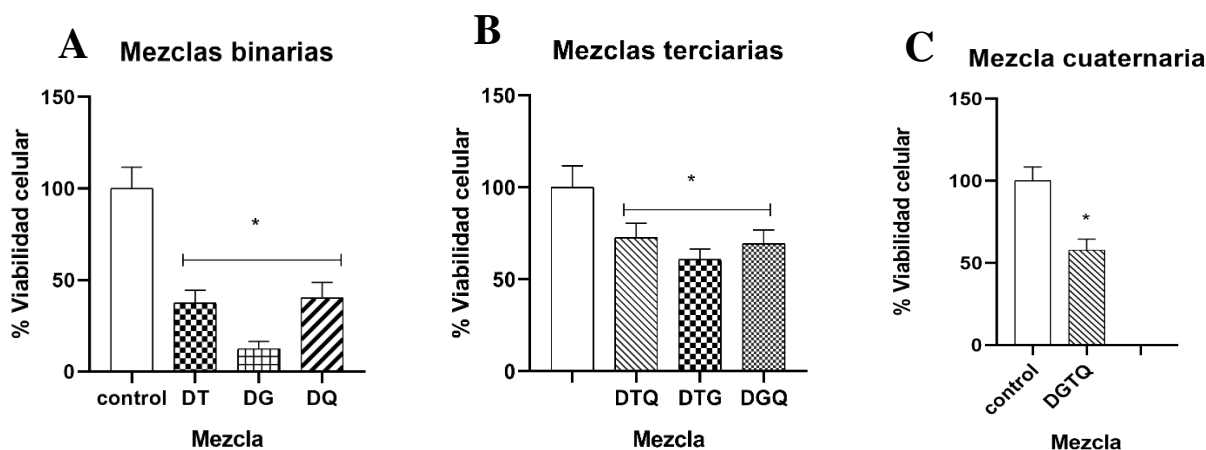


Figura 6. Porcentaje de viabilidad sobre células MCF-7 luego de 48 horas Vs. Concentración de las diferentes mezclas donde A representa las mezclas binarias, B las mezclas terciarias y C la mezcla cuaternaria. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, $*P < 0,05$

Una vez seleccionada la mezcla binaria ácido gálico + doxorrubicina como la mejor por su efecto en la viabilidad celular, se evaluó el efecto citotóxico de esta mezcla a diferentes concentraciones (0,25 CC_{50} , 0,5 CC_{50} y CC_{50}) y diferentes tiempos de tratamiento (12, 24, 48 y

72 horas). Para esto, se realizaron ensayos de MTT y cristal violeta, con el objetivo de encontrar la menor concentración y el menor tiempo de exposición donde su porcentaje de viabilidad fuera aproximadamente 80% es decir solo afecta el 20% de las células, además de poder observar si el efecto era dependiente del tiempo y la dosis administrada en las células MCF-7.

Los resultados obtenidos del ensayo de MTT se muestran en la **figura 7**, donde se puede observar cómo las concentraciones de la mezcla ácido gálico + doxorubicina afecta las células MCF-7 a los diferentes intervalos de tiempo. A las doce horas se observa que la menor concentración de la mezcla ($0,25 CC_{50}$) no ocasiono un efecto significativo al compararlo con el control (células sin tratamiento); mientras que las concentraciones del $0,5 CC_{50}$ y CC_{50} de la mezcla si producen un efecto significativo, siendo estos de 59 y 34 %, respectivamente, obteniendo el efecto mayor la concentración del CC_{50} . Igualmente se puede observar que a partir de las 24 hasta las 72 horas las tres concentraciones de las mezclas es decir $0,25 CC_{50}$, $0,5 CC_{50}$ y CC_{50} tienen efecto significativo respecto al control, obteniendo porcentajes de viabilidad a las 24 horas de 75, 57 y 25 %, a las 48 horas de 70, 38 y 14% y finalmente a las 72 horas de 68, 32 y 11%, respectivamente en las tres concentraciones usadas. Además, la concentración que menor porcentaje de viabilidad celular tiene en todos los intervalos de tiempo es la del CC_{50} y la menor concentración donde aproximadamente el 20% de las células en exposición fueron afectadas fue en el menor tiempo posible fue la concentración del $0,25 CC_{50}$, a las 24 horas con un porcentaje de viabilidad del 75%.

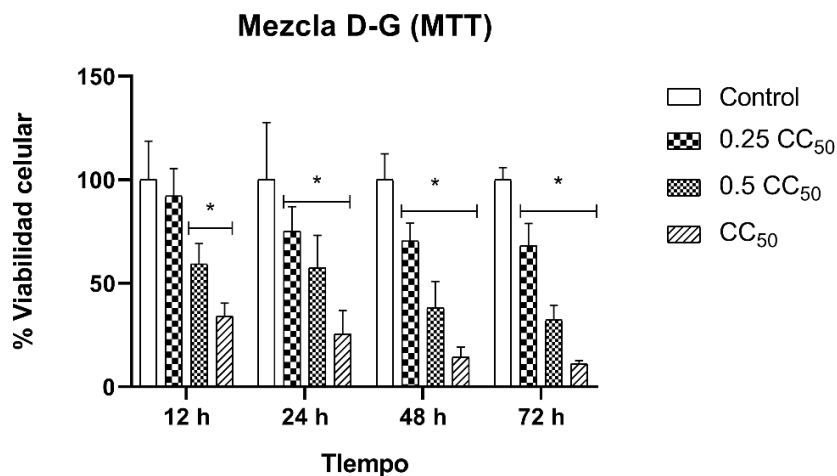


Figura 7. Porcentaje de viabilidad celular sobre las células MCF-7 de tres concentraciones de la mezcla entre el ácido gálico y la doxorubicina, 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, durante 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, obtenidos del ensayo MTT. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, * $P < 0,05$

Con los datos obtenidos del ensayo MTT mostrados en la **figura 7**, se calculó el tipo de interacción que tuvo la mezcla en cada una de las concentraciones utilizadas a los diferentes tiempos de exposición.

Como se observa en la **tabla 5**, en ninguna de las concentraciones utilizadas a las 12 y 24 horas hubo efecto sinérgico, al contrario, todas tuvieron efecto antagonista. Por otro lado, a las 48 horas en la concentración 0,25 CC₅₀ hubo efecto casi aditivo (IC 0,93) donde se obtuvo mediante el DRI que la dosis del ácido gálico se puede reducir hasta 6 veces y la de la doxorubicina una vez más y seguir manteniendo un alto porcentaje de citotoxicidad en las células MCF-7, además se obtuvo sinergismo leve (IC 0,89) en la concentración del 0,5 CC₅₀, con un DRI que indica que la dosis de la doxorubicina se puede disminuir hasta 3 veces y el ácido gálico solo una vez. A las 72 horas las mismas concentraciones (0,25 CC₅₀ y 0,5 CC₅₀) tuvieron efecto sinérgico leve (0,84)

y moderado (0,89), respectivamente, obteniendo mediante el DRI para la primera concentración (0,25 CC_{50}) que la dosis de doxorrubicina se puede reducir una vez y el ácido gálico 5 veces más, para la segunda concentración (0,5 CC_{50}), se obtuvo lo contrario, es decir, la dosis de doxorrubicina se puede reducir 5 veces y el ácido gálico una vez más. Esto nos refleja que las concentraciones 0,25 CC_{50} y 0,5 CC_{50} favorecen el efecto sinérgico de los componentes de la mezcla doxorrubicina + ácido gálico. Sin embargo, la concentración de CC_{50} no favorece este efecto ya en los cuatro tiempos de exposición se obtuvo efecto antagonista.

Tabla 5. Valores de porcentaje de viabilidad celular, Índice de combinación, tipo de interacción e índice de reducción de dosis obtenido al exponer las células MCF-7 durante diferentes tiempos a la mezcla; ensayo colorimétrico MTT

Mezcla; ácido gálico-doxorrubicina						
(MTT)						
Tiempo (Horas)	Concentración (μ M)	% viabilidad celular	IC	Tipo de sinergismo	DRI (D)	DRI (G)
12	0,25 CC_{50}	92,21	6,15	Antagonismo	0,16	13,06
	0,5 CC_{50}	59,33	1,22	Antagonismo	1,22	2,41
	CC_{50}	34,16	1,78	Antagonismo	2,30	0,74
24	0,25 CC_{50}	75,17	1,18	Antagonismo	0,95	6,85
	0,5 CC_{50}	57,37	1,16	Antagonismo	1,35	2,32
	CC_{50}	25,59	1,89	Antagonismo	3,89	0,61
48	0,25 CC_{50}	70,44	0,93	Casi aditivo	1,30	6,12
	0,5 CC_{50}	38,01	0,89	sinergismo leve	3,71	1,60
	CC_{50}	14,31	2,42	Antagonismo	9,84	0,43
72	0,25 CC_{50}	68,18	0,84	sinergismo moderado	1,49	5,82
	0,5 CC_{50}	32,25	0,89	sinergismo leve	5,13	1,42

CC50	11,17	2,73	Antagonismo	14,16	0,38
------	-------	------	-------------	-------	------

Nota: IC: Índice de combinación, DRI: Índice de reducción de dosis. Los IC menores que 1, están coloreados de color azul y los mayores que 1, de color amarillo. G: ácido gálico y D: doxorubicina

Por otro lado, los resultados obtenidos del ensayo de cristal violeta (**Figura 8**) indican que al igual que en el ensayo del MTT, se presenta un comportamiento similar en las concentraciones y tiempo de tratamiento evaluados. En este caso, las tres concentraciones usadas, es decir 0,25 CC_{50} , 0,5 CC_{50} y CC_{50} tienen efecto significativo al compararlas con el control a partir de las 24 hasta las 72 horas. A las doce horas solo las concentraciones del 0,5 CC_{50} y CC_{50} tienen un efecto significativo. Igualmente se observa que la menor concentración donde aproximadamente el 20% de las células en exposición fueron afectadas y en el menor tiempo, fue a la concentración del 0,25 CC_{50} , a las 24 horas, además la concentración que menor porcentaje de viabilidad celular tiene en todos los intervalos de tiempo es la del CC_{50} . Como se puede observar en la **figura 7** y **figura 8**, el ensayo colorimétrico MTT y el ensayo de tinción violeta, obtuvieron resultados similares, Corroborando así los resultados de citotoxicidad.

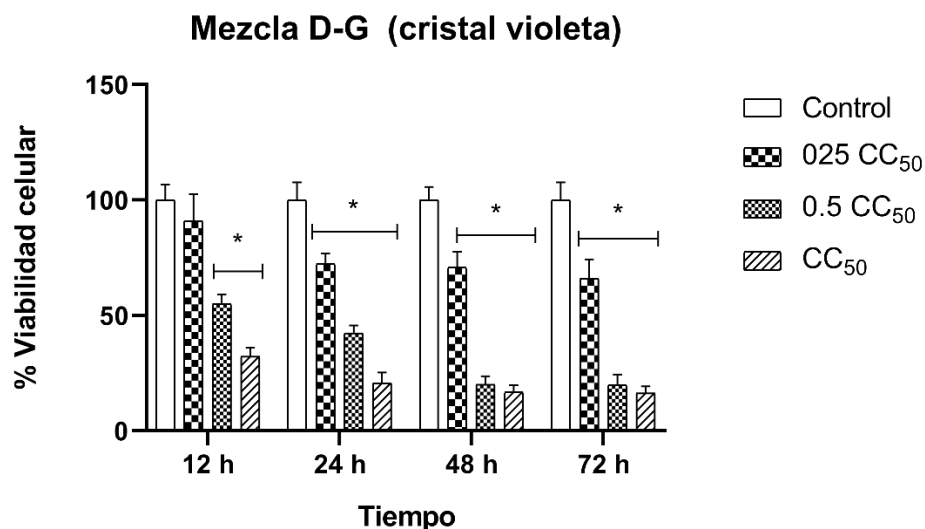


Figura 8. Porcentaje de viabilidad celular sobre las células MCF-7 de tres concentraciones de la mezcla entre el ácido gálico y la doxorubicina, 0,25CC₅₀, 0,5CC₅₀ y CC₅₀, durante 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, obtenidos del ensayo de tinción violeta. Los resultados son expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante ANOVA, utilizando la prueba de Tukey, * $P < 0,05$

Finalmente, con base en los resultados mencionados anteriormente se seleccionó la concentración 0,25CC₅₀ (doxorubicina: 0,49 μ M y ácido gálico: 33,9 μ M) a las 24 horas por ser la concentración más baja donde su porcentaje de viabilidad celular es significativamente diferente al valor del control para evaluar su efecto en la bioenergética mitocondrial en las células MCF-7.

3. 3 Acción de la mezcla entre ácido gálico y doxorubicina sobre la respiración celular de MCF-7

Mediante ensayos de respiración mitocondrial, se evaluó el efecto de la mezcla ácido gálico + doxorubicina a una concentración de 0,25CC₅₀ (ácido gálico: 33,9 μ M y doxorubicina: 0,49 μ M) a las 24 horas de tratamiento, cuyos resultados se muestran en la **figura 8**.

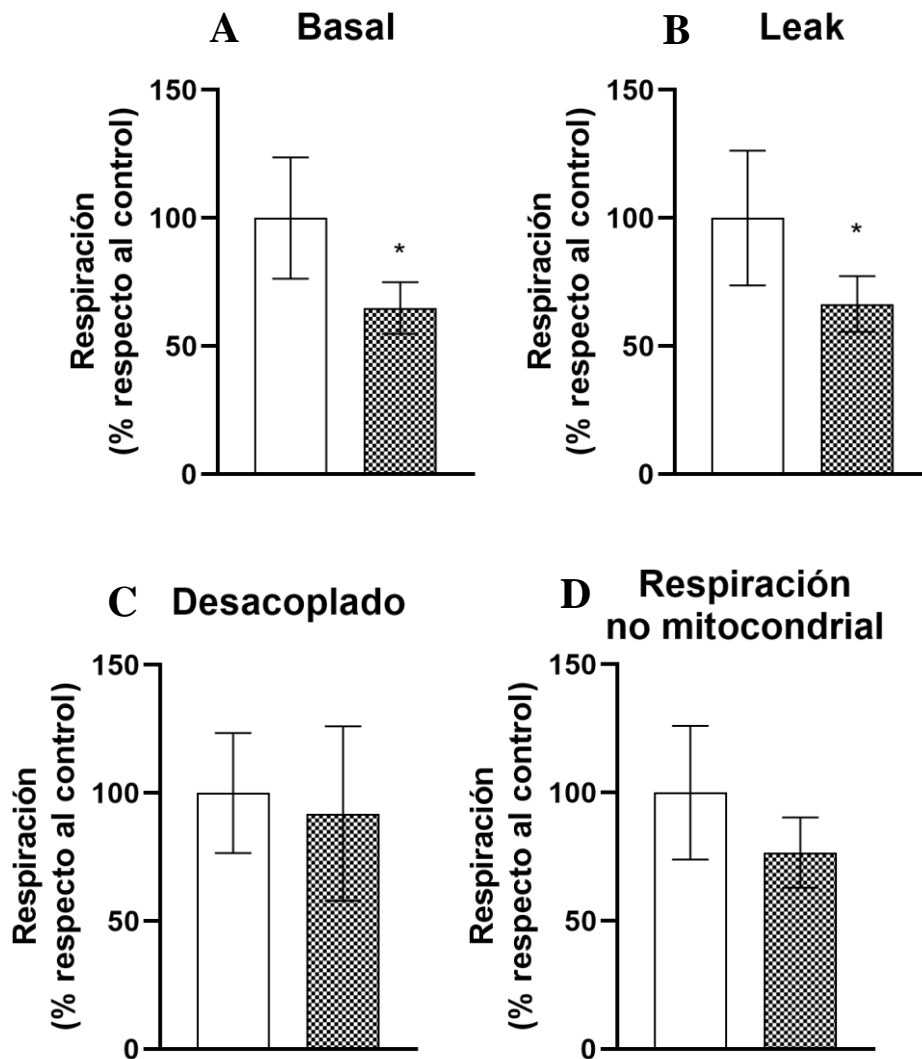


Figura 8. Efecto de la mezcla doxorubicina- ácido gálico sobre las células MCF-7 luego de 24 horas de tratamiento, los resultados están expresados como el promedio \pm la desviación estándar y los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control, determinada mediante la prueba de Student, $*P < 0,05$.

Inicialmente, el estado basal, se interpreta como la demanda energética de la célula bajo condiciones normales, posteriormente el estado leak representa la respiración sensible a la oligomicina, donde esta inhibe la ATPasa generando un aumento de potencial de membrana mitocondrial. En el estado desacoplado, se puede estimar la tasa máxima de respiración en

respuesta a la adición del FCCP (un protonoforo con actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa), la oxidación del sustrato y el aumento de la actividad de la cadena respiratoria en un intento de mantener el potencial de la membrana mitocondrial; finalmente, la respiración no mitocondrial, refleja el consumo de oxígeno de las oxidasas citoplasmáticas, debido a la adición de inhibidores de la cadena de transporte de electrones, siendo estos la rotenona (Complejo I) y la antimicina (Complejo III)(Divakaruni et al., 2014; Gnaiger E, 2015.)

Como se observa en la figura 8, el efecto de la mezcla ácido gálico-doxorrubicina generó una disminución significativa en dos estados, en el estado basal (**figura 8A**) y el leak (**figura 8B**), en el estado basal el tratamiento disminuyó un 35% la velocidad del consumo de oxígeno, esto se debe a que la respiración de las células MCF-7 con tratamiento es menor, debido a que sus condiciones iniciales (medio sin adición de la mezcla) fueron alteradas al agregar la mezcla de ácido gálico-doxorrubicina produciendo una alteración en su respiración inicial (Divakaruni et al., 2014) , igualmente en el estado leak la velocidad del consumo de oxígeno disminuyó un 34% en comparación del control, esta disminución puede significar un menor paso de electrones ya que este estado representa los protones que migran a la matriz sin producir ATP, haciendo que el acoplamiento del oxígeno del sustrato y la generación de ATP sea incompleto (Cheng et al., 2017), además de representar el ATP producido por la mitocondria (Agilent Technologies, 2019), por lo cual la disminución en este estado representa un menor paso de electrones y por ende una menor producción de ATP.

Por otro lado, el estado desacoplado (**figura 8C**) y el no mitocondrial (**figura 8D**) no presentaron diferencias significativas respecto al control.

Conclusiones

- Los resultados obtenidos del docking sugieren que la quercetina, el carvacrol, el timol y el ácido gálico presentan afinidad por el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, evidenciando interacciones con los residuos Arg 46, Ser 42 e Ile 30.
- A partir de los ensayos realizados de citotoxicidad sobre las células MCF-7 se obtuvo que no es conveniente realizar mezclas de más de dos compuestos citotóxicos, ya que las mezclas binarias presentaron mejores resultados de porcentaje de viabilidad celular que al mezclar tres o cuatro compuestos.
- La mezcla de ácido gálico y doxorrubicina induce citotoxicidad en células MCF-7, presentando efecto sinérgico entre los dos compuestos.
- La mezcla ácido gálico/doxorrubicina afecta la viabilidad de las células MCF-7, debido a que inhibe dos estados de la respiración celular (estado basal y leak), posiblemente como consecuencia de una alteración en su transporte de electrones.

Recomendaciones

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

- Evaluar el efecto citotóxico de la mezcla sobre la línea no tumoral HepaRG (hepatocitos normales).
- Evaluar el efecto sobre la respiración de celular de células MCF-7 de los metabolitos ácido gálico y doxorrubicina por separado.

- Determinar el tipo de muerte producida por los metabolitos ácido gálico y doxorubicina en las células MCF-7

Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo de grado se presentaron en modalidad poster en el año 2021 en el I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias, Pandemias Persistentes y Emergentes (**anexo B**)

Agradecimientos

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

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 -Amorfeno	204,36	5,55	0	0	9906	5899
442831	1-Acetoxipinoresinol	416,43	2,65	2	8	541	254
6429274	2-epi-trans- β -Cariofileno	204,36	-0,24	0	0	9906	5899
6429376	4,5-di-epi-Aristolecheno	204,36	5,41	0	0	9906	5899
527113	6,9-guayadieno	204,36	5,26	0	0	9906	5899
5280442	Acacetina	284,27	0,09	2	6	615	292
158003	Acalifina	360,32	-2,45	5	16	19	6
80792	Acetato de carvacrilo	192,26	2,84	0	3	4238	2356
1549026	Acetato de geranilo	196,29	2,01	0	3	4841	2720
64971	Ácido betulínico	456,71	6,24	2	4	274	155
689043	Ácido cafeico	180,16	-0,67	3	3	184	79
1794427	Ácido clorogénico	354,31	-1,88	6	10	50	19
5281855	Ácido elágico	302,20	-1,81	0	6	33	12
370	Ácido gálico	170,12	-0,55	1	2	106	43
10494	Ácido oleanólico	456,71	6,30	2	4	327	187
382831	Ácido pomólico	472,71	5,69	3	4	247	139
72	Ácido protocatequico	154,12	-0,45	1	2	246	108
5281792	Ácido rosmarínico	360,32	1,21	5	7	1	0
8742	Ácido shikímico	174,15	-1,21	3	5	141	59
10742	Ácido siríngico	198,18	0,45	2	4	725	349
64945	Ácido ursólico	456,71	6,20	2	4	320	184
9215	Acridina	179,22	2,06	0	1	8015	4692
5386591	Ajoene	234,39	1,92	2	3	218	5791
2537	Alcanfor	152,24	1,94	0	2	3958	2188
65036	Alicina	162,26	1,66	1	1	5668	4607
42608158	Alo-Aromadendreno	204,36	5,01	0	0	9906	5899
10207	Aloe-emodina	270,24	0,14	2	6	430	199
5281600	Amentoflavona	538,47	2,78	4	8	2	0
5318517	Andrografólido	350,45	1,49	3	8	245	108
5280443	Apigenina	270,24	0,10	1	4	210	91
440936	Arbutina	272,25	-1,05	5	10	69	27
91354	Aromadendreno	204,36	5,18	0	0	9906	5899
6917864	Artesunato	384,43	2,60	1	8	65	33
1550607	Aurapteno	298,38	2,55	0	4	1677	865
5281303	Azadiractina	720,72	1,27	3	19	259	115

12308714	Azadiradiona	450,57	4,17	0	7	734	354
10906239	Azadirona	436,59	5,41	0	5	1924	1003
5281605	Baicaleína	270,24	0,54	1	3	194	84
10337211	Bavachinina	338,40	2,77	1	4	1412	718
21159022	Biciclogermacreno	204,36	5,23	0	0	9906	5899
5280373	Biocanina A	284,27	0,45	2	6	1370	695
73384	Brasilín	286,28	1,30	4	4	137	57
24360	Camptotecina	348,36	1,74	1	8	446	206
6616	Canfeno	136,24	3,35	0	0	9906	5899
1548943	Capsaicina	305,42	3,76	2	2	1860	967
10364	Carvacrol	150,22	3,30	1	1	3687	2027
73160	Catequina	290,27	1,39	2	2	107	44
122724	Celastrol	450,62	5,06	2	5	73	37
119093	Cinaropicrina	346,38	1,88	1	7	224	98
188323	Cirsimaritina	314,29	0,04	3	6	322	145
5284371	Codeína	299,37	1,15	1	5	885	479
6167	Colchicina	399,44	1,02	7	8	1801	934
5351344	Combretastatina	316,35	4,05	1	4	3663	2012
5281437	Costunolida	232,32	2,71	0	3	2412	1281
5281607	Crisina	254,24	0,24	1	4	615	292
5281232	Crocetina	328,41	2,71	2	5	279	124
117443	Cubebina	356,37	-0,08	2	6	9906	5899
5281321	Curcubitacina	514,66	2,94	4	10	74	29
969516	Curcumina	368,39	1,28	2	6	529	249
107935	Deguelin	394,42	4,15	0	6	4881	2745
5281708	Diadzeína	254,24	0,11	2	6	842	410
101300	Dicentrina	339,39	1,51	6	4	7805	4559
456410	Dihidroartemisinina	284,35	2,01	1	6	2743	1472
3213	Elipticina	246,31	2,93	1	2	3619	1986
3220	Emodina	270,24	0,13	1	4	340	154
1203	Epicatequina	290,27	1,39	2	2	107	44
637122	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 epigalocatequina	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</i> -ment-3-en-8-ol	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 muestran los resultados obtenidos de: las reglas de Lipinski, peso molecular (PM), coeficiente de octanol-agua (Log P O/A), número de donadores de enlaces de hidrógeno (DH) y número de aceptores de enlaces de hidrógeno (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 azul (≥ 500): alta permeabilidad.

Anexo B



ICONGRESO
INTERNACIONAL EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

U21
ODS
Que nadie se quede atrás

Universidad
Industrial de
Santander

LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Certifica que:

MAYRA ALEJANDRA CARREÑO CORZO

Participó como ponente del trabajo titulado:

Identificación por docking molecular de compuestos adyuvantes para el tratamiento del adenocarcinoma Mamario con doxorubicina.

Por: Mayra Alejandra Carreño Corzo, Luis Carlos Vesga & Stelia Carolina 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.


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


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

Referencias Bibliográficas

- Acharya, R., Chacko, S., Bose, P., Lapenna, A., & Pattanayak, S. P. (2019). Structure Based Multitargeted Molecular Docking Analysis of Selected Furanocoumarins against Breast Cancer. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52162-0>
- Afshari, H., Nourbakhsh, M., Salehi, N., Mahboubi-Rabbani, M., Zarghi, A., & Noori, S. (2020). STAT3-mediated Apoptotic-enhancing Function of Sclareol Against Breast Cancer Cells and Cell Sensitization to Cyclophosphamide. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 19(1), 398. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2020.112587.13843>
- Agarwal, S., & Mehrotra, R. (2016). An overview of Molecular Docking. *JSM Chem*, 4(2), 1024. <https://www.researchgate.net/publication/303897563>
- Agilent Technologies, I. (2019, April). *Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit User Guide*. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XFp_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf
- Alberto, J., & Torres, T. (2013). Mutación en el ADN mitocondrial y su relación con el cáncer de mama. In *Rev Esp Méd Quir* (Vol. 18).
- Al-Fatlawi, A. A., Rahisuddin, & Ahmad, A. (2014). Cytotoxicity and pro-apoptotic activity of carvacrol on human breast cancer cell line MCF-7. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1218–1223. <http://wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/cytotoxicity-pro-apoptotic-carvacrol-human-breast-cancer-cell>
- Arif, N., & Ghezzi, P. (2018). Quality of online information on breast cancer treatment options. *Breast*, 37, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.10.004>

- Burge, S., & Lichtenberger, L. M. (2019). Growth inhibitory effects of PC-NSAIDs on human breast cancer subtypes in cell culture. *Oncology Letters*, *18*(6), 6243–6248. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10951>
- Cheng, J., Nanayakkara, G., Shao, Y., Cueto, R., Wang, L., Yang, W. Y., Tian, Y., Wang, H., & Yang, X. (2017). Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *982*, 359. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_20
- Chou, C. C., Yang, J. S., Lu, H. F., Ip, S. W., Lo, C., Wu, C. C., Lin, J. P., Tang, N. Y., Chung, J. G., Chou, M. J., Teng, Y. H., & Chen, D. R. (2010). Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, *33*(8), 1181–1191. <https://doi.org/10.1007/S12272-010-0808-Y/METRICS>
- Chou, T. C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.10>
- Coley, H. M. (2008a). Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *34*(4), 378–390. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.01.007>
- Coley, H. M. (2008b). Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *34*(4), 378–390. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2008.01.007>

- Constante, C. K., Rodríguez, J., Sonnenholzner, S., & Domínguez-Borbor, C. (2022). Adaptation of the methyl thiazole tetrazolium (MTT) reduction assay to measure cell viability in *Vibrio* spp. *Aquaculture*, *560*, 738568. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738568>
- Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M. T., Donadelli, M., & Palmieri, M. (2020). Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 98, pp. 4–14). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.013>
- Deberardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2020). *We need to talk about the Warburg effect*. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- 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, pp. 309–354). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3>
- Fang, X. J., Jiang, H., Zhu, Y. Q., Zhang, L. Y., Fan, Q. H., & Tian, Y. (2014). Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF- κ B in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncology Reports*, *31*(6), 2735–2742. <https://doi.org/10.3892/OR.2014.3131/HTML>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT087379>
- Fernández, J. Á., Ozores, P. P., López, V. C., Mosquera, A. C., & López, R. L. (2021). Breast cancer. *Medicine (Spain)*, *13*(27), 1506–1517. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.03.002>

- 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/SUPPL_FILE/JM0306430_S.PDF
- 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/SUPPL_FILE/JM051256OSI20060602_023733.PDF
- Gnaiger E. (2015). *An experiment with high-resolution respirometry: coupling control in cell respiration*. www.orooboros.at
- Goldman, L., Ausiello, D., & Schafer, A. (2021). *Goldman-Cecil. Tratado de medicina interna-ClinicalKey* (26th ed., pp. 1321–1329). 31st March 2021. <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2197/#!/browse/book/3-s2.0-C2019104870X>
- 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>
- 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/SUPPL_FILE/JM030644S_S.PDF
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hassan, H. F. H., Mansour, A. M., Salama, S. A., & El-Sayed, E. S. M. (2021). The chemopreventive effect of thymol against dimethylhydrazine and/or high fat diet-induced colon cancer in rats: Relevance to NF- κ B. *Life Sciences*, 274, 119335. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119335>
- 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: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2), 351–367. <https://doi.org/10.1002/PROT.10613>
- Kim, J., Meehan, J., Durhan, G., Gennari, A., Nardin, S., Mora, E., Varughese, F. M., D'avanzo, F., Vachanaram, A. R., Rossi, V., Saggia, C., & Rubinelli, S. (2018). Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities. *Frontiers in Oncology / Www.Frontiersin.Org*, 1, 864. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00864>
- Kluckova, K., Sticha, M., Cerny, J., Mracek, T., Dong, L., Drahota, Z., Gottlieb, E., Neuzil, J., & Rohlena, J. (2015). Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *Cell Death & Disease* 2015 6:5, 6(5), e1749–e1749. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.110>
- Lao, J., Madani, J., Puértolas, T., Álvarez, M., Hernández, A., Pazo-Cid, R., Artal, Á., & Antón Torres, A. (2013). Liposomal Doxorubicin in the Treatment of Breast Cancer Patients: A Review. *Journal of Drug Delivery*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/456409>
- Lin, S. R., Chang, C. H., Hsu, C. F., Tsai, M. J., Cheng, H., Leong, M. K., Sung, P. J., Chen, J. C., & Weng, C. F. (2020). Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *British Journal of Pharmacology*, 177(6), 1409–1423. <https://doi.org/10.1111/BPH.14816>

- Liu, Z. H., Yang, C. X., Zhang, L., Yang, C. Y., & Xu, X. Q. (2019). Baicalein, as a Prooxidant, Triggers Mitochondrial Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Through Mobilization of Intracellular Copper and Reactive Oxygen Species Generation. *OncoTargets and Therapy*, 12, 10749. <https://doi.org/10.2147/OTT.S222819>
- Loraine, A. C., Mendoza-Espinoza, S. , & Alberto, J. (2010). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 18–27. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916060003>
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2013 27:3, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/S10822-013-9644-8>
- Mari, A., Mani, G., Nagabhishek, S. N., Balaraman, G., Subramanian, N., Mirza, F. B., Sundaram, J., & Thiruvengadam, D. (2020). Carvacrol Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis through PI3K/AKT Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 2020 27:9, 27(9), 680–687. <https://doi.org/10.1007/S11655-020-3193-5>
- Marks, J. S., Lee, N. C., Lawson, H. W., Henson, R., Bobo, J. K., & Kaeser, M. K. (2000). Implementing Recommendations for the Early Detection of Breast and Cervical Cancer Among Low-Income Women. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*, 49(RR-2), 35–55. <http://www.jstor.org/stable/42000707>
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American Family Physician*, 81(11), 1339–1346. <https://doi.org/10.1056/nejm199810013391407>

- Mauri, D., Pavlidis, N., & Ioannidis, J. P. A. (2005). Neoadjuvant Versus Adjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *ARTICLES Journal of the National Cancer Institute*, 97(3). <https://doi.org/10.1093/jnci/dji021>
- Maurya, D. K., Nandakumar, N., & Devasagayam, T. P. A. (2011). Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(1), 85. <https://doi.org/10.3164/JCBN.11-004FR>
- 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>
- Miriyala, S., Holley, A. K., & Clair, D. K. S. (2014). Mitochondrion: A novel center for cancer cell signaling. *Mitochondria: The Anti-Cancer Target for the Third Millennium*, 9789401789844, 1–38. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8984-4_1/COVER
- Moll, U. M., & Zaika, A. (2001). Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Letters*, 493(2–3), 65–69. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02284-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02284-0)
- 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>
- Nawaz, S. (2011). The Normal Breast and Benign Diseases of the Breast. In *Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Breast Cancer* (pp. 1–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4932-6.50006-8>

- Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*, *610*, 113937. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2020.113937>
- Niazvand, F., Orazizadeh, M., Khorsandi, L., Abbaspour, M., Mansouri, E., & Khodadadi, A. (2019). Effects of Quercetin-Loaded Nanoparticles on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Medicina*, *55*(4), 114. <https://doi.org/10.3390/medicina55040114>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews* *2017* 9:2, *9*(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/S12551-016-0247-1>
- Raymond, E., Buquet-Fagot, C., Djelloul, S., Mester, J., Cvitkovic, E., Allain, P., Louvet, C., & Gespach, C. (1997). Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anti-Cancer Drugs*, *8*(9), 876–885. <https://doi.org/10.1097/00001813-199710000-00009>
- Rezaei-Seresht, H., Cheshomi, H., Falanji, F., Movahedi-Motlagh, F., Hashemian, M., & Mireskandari, E. (2019a). Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *9*(6), 574. <https://doi.org/10.22038/AJP.2019.13475>
- Rezaei-Seresht, H., Cheshomi, H., Falanji, F., Movahedi-Motlagh, F., Hashemian, M., & Mireskandari, E. (2019b). Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *9*(6), 574. <https://doi.org/10.22038/AJP.2019.13475>
- Rhman, M. A., Devnarain, N., Khan, R., & Owira, P. M. O. (2022). Synergism Potentiates Oxidative Antiproliferative Effects of Naringenin and Quercetin in MCF-7 Breast Cancer

Cells. *Nutrients* 2022, Vol. 14, Page 3437, 14(16), 3437.
<https://doi.org/10.3390/NU14163437>

Roser max. (n.d.). *Is the world making progress against cancer? - Our World in Data*. Retrieved October 10, 2022, from <https://ourworldindata.org/progress-against-cancer>

Rosero Rodríguez, A., Ruiz-Giménez Úbeda, L., & Jara Sanchez, C. (2015). Epidemiología del cáncer de mama. *Revisiones En Cancer*, 29(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/s1283-081x\(20\)43722-1](https://doi.org/10.1016/s1283-081x(20)43722-1)

Roth, K. G., Mambetsariev, I., Kulkarni, P., & Salgia, R. (2020). The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 26, Issue 1, pp. 119–134). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.009>

Rustin, P., Munnich, A., & Rötig, A. (2002). Succinate dehydrogenase and human diseases: New insights into a well-known enzyme. *European Journal of Human Genetics*, 10(5), 289–291. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200793>

Seresht, H. R., Albadry, B. J., Al-mosawi, A. K. M., Gholami, O., & Cheshomi, H. (2019a). The Cytotoxic Effects of Thymol as the Major Component of *Trachyspermum ammi* on Breast Cancer (MCF-7) Cells. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53(2), 101–107. <https://doi.org/10.1007/S11094-019-01961-W/FIGURES/4>

Seresht, H. R., Albadry, B. J., Al-mosawi, A. K. M., Gholami, O., & Cheshomi, H. (2019b). The Cytotoxic Effects of Thymol as the Major Component of *Trachyspermum ammi* on Breast Cancer (MCF-7) Cells. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2019 53:2, 53(2), 101–107. <https://doi.org/10.1007/S11094-019-01961-W>

- Shukla, S., Singh, B., Singh, A., & Singh, C. (2022). Emerging and advanced drug delivery systems for improved biopharmaceutical attributes of gallic acid: A review. *Phytomedicine Plus*, 2(4), 100369. <https://doi.org/10.1016/J.PHYPLU.2022.100369>
- Souza, R. L. de, Dantas, A. G. B., Melo, C. de O., Felício, I. M., & Oliveira, E. E. (2022). Nanotechnology as a tool to improve the biological activity of carvacrol: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76, 103834. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2022.103834>
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, 121(7), 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.05.025>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sushma Agrawal. (2020). *Late effects of cancer treatment in breast cancer survivors*. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.130445>
- Tallarida, R. J. (2011). Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes and Cancer*, 2(11), 1003–1008. https://doi.org/10.1177/1947601912440575/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1947601912440575-FIG4.JPEG
- Tang, H. M., & Cheung, P. C. K. (2021). Gene expression profile analysis of gallic acid-induced cell death process. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-96174-1>

- Toyota, R., Ito, H., Sashide, Y., & Takeda, M. (2022). Suppression of the excitability of rat nociceptive primary sensory neurons following local administration of the phytochemical, quercetin. *The Journal of Pain*. <https://doi.org/10.1016/J.JPAIN.2022.10.014>
- Tun, J. O., Salvador-Reyes, L. A., Velarde, M. C., Saito, N., Suwanborirux, K., & Concepcion, G. P. (2019). Synergistic Cytotoxicity of Renieramycin M and Doxorubicin in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Marine Drugs*, *17*(9), 536. <https://doi.org/10.3390/md17090536>
- Zeng, Q., Che, Y., Zhang, Y., Chen, M., Guo, Q., & Zhang, W. (2020). Thymol Isolated from *Thymus vulgaris* L. Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis by Suppressing the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, *14*, 2535. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S254218>
- Zhou, Q., Zhai, Y., Lou, J., Liu, M., Pang, X., & Sun, F. (2011). Thiabendazole inhibits ubiquinone reduction activity of mitochondrial respiratory complex II via a water molecule mediated binding feature. *Protein and Cell*, *2*(7), 531–542. <https://doi.org/10.1007/S13238-011-1079-1>

