



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Acoplamiento molecular, síntesis y evaluación citotóxica de una molécula híbrida: Estudio sobre la inhibición de EGFR y efecto fotosensibilizador para la producción de especies oxidantes reactivas”**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
**QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICO**

Presenta

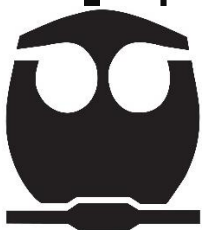
**ANGÉLICA LECHUGA MILLÁN**

Director de tesis

**DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS**

Supervisor técnico

**M. EN C. DIEGO IGNACIO FIGUEROA FIGUEROA**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PRESIDENTE:** Hernández Luis Francisco  
**VOCAL:** Novelo Torres Alma Miriam  
**SECRETARIO:** María Eugenia Mendoza Jasso  
**SUPLENTE:** Aguayo Ortiz Rodrigo  
**SUPLENTE:** Gonzalez Mendez Israel

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Laboratorio 121, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.  
Así como en el Laboratorio de Citopatología Celular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en colaboración con la Dra. Eva Ramón Gallegos.

#### **Asesor del tema**

Dr. Francisco Hernández Luis

#### **Supervisor técnico**

M. en C. Diego Ignacio Figueroa Figueroa

#### **Sustentante**

Angélica Lechuga Millán

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser un pilar fundamental en mi desarrollo personal y académico, por ser una Universidad cuyos valores quedarán como una huella imborrable en mi vida.

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones al presente trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación al mejoramiento de mi informe.

A la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de tener una formación académica en el área de Química Farmacéutica Biológica. Cada uno de mis profesores y profesoras ha sido importante tanto por sus conocimientos como por su manera de enseñar, y agradezco su dedicación en mi educación.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) por el apoyo otorgado para la compra de reactivos y materiales para los procesos de síntesis de los compuestos a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto UNAM-DGAPA PAPIIT IN215824.

A la Facultad de Química por el apoyo otorgado para el financiamiento de materiales para los ensayos in vitro en líneas celulares y pago del registro de espectros de Resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometría de masas, dentro del programa PAIP 5000-9136.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química por el servicio de análisis, especialmente, al personal técnico de las áreas de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales, Nayeli López Balbiaux), Espectrometría de Masas (Jessica Amacosta Castillo), y Espectroscopía de Infrarrojo y UV-Visible (Marisela Patricia Gutiérrez Franco).

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de la Información (DGTIC) de la UNAM, por el soporte brindado para el uso de supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli" (LANCAD-UNAM-DGTIC-207).

Al Doctor Francisco Hernández Luis; por dirigir este proyecto, por sus críticas constructivas y dirección académica. Gracias por su experiencia y conocimientos, que han sido una guía en todo este proceso. Además, expreso mi agradecimiento por su disposición para escuchar y comprender mis dudas e inquietudes, y por su apoyo para mi participación en cursos y seminarios. Finalmente, gracias por su orientación y optimismo, que me alentaron a alcanzar mis metas académicas.

Al M. en C. Diego Ignacio Figueroa Figueroa, le agradezco por su tiempo y comprensión, inspiración y motivación constante en la realización de esta tesis. Gracias por su amabilidad y apoyo. Su pasión por la investigación y la docencia, siempre la voy a recordar. Gracias por sus enseñanzas, que trascienden el ámbito académico, y que continuarán siendo un referente en mi desarrollo profesional.

A la Doctora Eva Ramón Gallegos del Laboratorio de Citopatología Celular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por permitirme colaborar en su laboratorio y brindarme las herramientas para conseguir terminar este proyecto satisfactoriamente. Agradezco su guía, apoyo, paciencia y su tiempo para instruirme en técnicas que eran nuevas para mí.

## Contenido

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. El cáncer y sus características.....	2
2.1.1. Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el desarrollo del cáncer.....	2
2.2. Epidemiología del cáncer.....	3
2.2.1. Epidemiología del cáncer en México.....	3
2.2.2. Epidemiología del cáncer en el mundo .....	4
2.3. Vías de señalización celular en el cáncer .....	5
2.3.1. Familia RTK.....	5
2.3.2. Señalización de EGFR.....	6
2.4. Terapia antitumoral .....	7
2.4.1. Terapia dirigida a EGFR .....	8
2.5. Terapia fotodinámica .....	9
2.5.1. Fotosensibilizadores (PS) .....	10
2.6. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	12
2.6.1. Introducción a las ROS.....	12
2.6.2. Fuentes de ROS .....	13
2.6.3. Implicaciones de las ROS en el cáncer.....	13
2.6.4. Papel de las ROS en la terapia fotodinámica .....	13
2.7. Terapia combinada: Quimioterapia y TFD.....	14
2.8. Líneas celulares MCF-7 y HaCaT.....	14
2.8.1. Línea celular MCF-7. ....	14
2.8.2. Línea celular HaCaT.....	15
3. Planteamiento del problema.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos.....	16
5.1. Objetivo general.....	16
5.2. Objetivos particulares .....	16
6. Diseño de moléculas.....	17
6.1. Diseño de la parte de unión a EGFR .....	17
6.2. Diseño de la parte fotosensibilizadora.....	18
6.3. Diseño del <i>linker</i> .....	18
7. Síntesis y caracterización de moléculas.....	19

7.1.	Síntesis del compuesto <b>2</b> .....	20
7.2.	Síntesis del compuesto <b>3</b> .....	20
7.3.	Síntesis del compuesto <b>4</b> .....	21
7.4.	Síntesis de <b>FcCHO</b> .....	21
7.5.	Síntesis del compuesto <b>5</b> .....	22
7.6.	Síntesis del compuesto <b>6</b> .....	22
7.7.	Resumen de la síntesis del compuesto <b>5</b> y <b>6</b> .....	23
7.8.	Técnicas analíticas avanzadas y caracterización molecular del compuesto <b>5</b> y <b>6</b> .....	24
8.	Ensayo de captura de radical anión superóxido.....	25
8.1.	Metodología.....	25
8.1.1.	Determinación de los disolventes para el NBT y los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> . 25	
8.1.2.	Determinación de las concentraciones del NBT y de los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> .....	25
8.1.3.	Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de anión superóxido (NBT y compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> ).....	25
8.1.1.	Establecimiento de dosis lumínica o fluencia (J/cm <sup>2</sup> ).....	26
8.1.2.	Disposición de la placa e irradiación de los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> . ....	26
8.2.	Resultados y discusión.....	27
8.2.1.	Determinación de los disolventes para el NBT y los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> . 27	
8.2.2.	Determinación de las concentraciones del NBT y de los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> .....	27
8.2.3.	Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de anión superóxido (NBT y compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> ).....	27
8.2.4.	Establecimiento de dosis lumínica o fluencia (J/cm <sup>2</sup> ).....	27
9.	Ensayo de captura de radical hidroxilo.....	30
9.1.	Metodología.....	30
9.1.1.	Determinación de los disolventes para el MB y los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> . .30	
9.1.2.	Determinación de las concentraciones del MB y de los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> .....	30
9.1.3.	Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de radical hidroxilo (MB y compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> ).....	30
9.1.4.	Establecimiento de dosis lumínica o fluencia (J/cm <sup>2</sup> ).....	31
9.1.5.	Disposición de la placa e irradiación de los compuestos <b>5</b> , <b>6</b> y <b>gefitinib</b> (experimento sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). ....	31

9.1.6.	Disposición de la placa e irradiación de los compuestos <b>5, 6</b> y <b>gefitinib</b> (experimento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). .....	32
9.2.	Resultados y discusión .....	32
9.2.1.	Determinación de los disolventes para el MB y los compuestos <b>5, 6</b> y <b>gefitinib</b> . .....	32
9.2.2.	Determinación de las concentraciones del MB y de los compuestos <b>5, 6</b> y <b>gefitinib</b> .....	32
9.2.3.	Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de radical hidroxilo (MB y compuestos <b>5, 6</b> y <b>gefitinib</b> ).....	32
9.2.4.	Establecimiento de dosis lumínica o fluencia (J/cm <sup>2</sup> ).....	33
9.2.5.	Disposición de la placa e irradiación de los compuestos <b>5, 6</b> y <b>gefitinib</b> , experimento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33
10.	Ensayo de viabilidad celular .....	35
10.1.	Metodología .....	35
10.1.1.	Solubilidad de los compuestos <b>5, FcCHO</b> y <b>gefitinib</b> .....	35
10.1.2.	Filtración de los compuestos <b>5, FcCHO</b> y <b>gefitinib</b> para esterilizar.....	36
10.1.3.	Determinación del efecto del vehículo (DMSO), en la línea celular MCF-7.....	37
10.1.4.	Determinación de la concentración de los compuestos <b>5, FcCHO</b> y <b>gefitinib</b> para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7. ....	37
10.1.5.	Determinación del número de células por pozo para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7. ....	38
10.1.6.	Experimento de exposición a luz de 460 nm (terapia fotodinámica) en la línea celular MCF-7 y HaCaT. ....	38
10.2.	Resultados y discusión.....	39
10.2.1.	Solubilidad de los compuestos <b>5, FcCHO</b> y <b>gefitinib</b> .....	39
10.2.2.	Filtración de los compuestos <b>5, FcCHO</b> y <b>gefitinib</b> para esterilizar.....	39
10.2.3.	Determinación del efecto del vehículo (DMSO) en la línea celular MCF-7.....	40
10.2.4.	Determinación de la concentración de los compuestos <b>5, FcCHO</b> y <b>gefitinib</b> para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7. ....	40
10.2.5.	Determinación del número de células por pozo para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7. ....	40
10.2.6.	Experimento de exposición a luz de 460 nm (terapia fotodinámica) en la línea celular MCF-7 y HaCaT. ....	41
11.	Acoplamiento molecular .....	43
11.1.	Metodología .....	43
11.1.1.	Preparación de archivos de entrada para el acoplamiento molecular.....	44
11.1.2.	Definición del espacio de acoplamiento molecular. ....	44
11.1.3.	Visualización del acoplamiento molecular .....	44

11.2. Resultados y discusión.....	44
12. Conclusiones y perspectivas. ....	47
13. Referencias.....	48
<b>ANEXO 1. Metodología de síntesis y caracterización de compuestos 5 y 6, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y espectrometría de masas. ....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 2. Metodología de prueba de MTT, descongelación de células, tripsinización, cuenta celular, y mantenimiento celular. ....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 3. Validación del acoplamiento molecular. ....</b>	<b>63</b>

### *Índice de Figuras*

Figura 1. Diagrama general del proyecto de tesis. ....	1
Figura 2. Representación de tumor primario y secundario. ....	2
Figura 3. Casos nuevos de cáncer, en el año de 2020 en México, según el órgano o sistema al cual afecta. ....	4
Figura 4. Casos nuevos de cáncer, en el año 2020 a nivel mundial, según el órgano o sistema al cual afecta.....	5
Figura 5. Representación esquemática del receptor tirosina cinasa y las vías de señalización posteriores. ....	6
Figura 6. Heterodímeros y homodímeros que pueden formar los miembros de la familia RTK ErbB/HER. ....	7
Figura 7. Fármacos inhibidores de tirosina cinasa utilizados en terapia anticancerosa dirigida a EGFR.....	9
Figura 8. Mecanismo de la reacción fotodinámica.....	10
Figura 9. Photofrin®, primer agente para TFD aprobado para el tratamiento del cáncer de esófago.....	11
Figura 10. Fotosensibilizadores de segunda generación.....	11
Figura 11. Etapas de reducción de oxígeno molecular que conducen a la generación de ROS junto con sus potenciales de reducción estándar. ....	12
Figura 12. Hipótesis del proyecto. ....	16
Figura 13. Interacciones de Gefitinib y Erlotinib con EGFR.....	17
Figura 14. Modelado de la sección de unión a EGFR de las moléculas diseñadas. ....	18
Figura 15. Funcionalización propuesta para el ferroceno para las moléculas diseñadas.....	18
Figura 16. Estructuras de las moléculas diseñadas.....	19
Figura 17. Diseño final de la estructura A.....	19
Figura 18. Aspecto físico y estructura química de los compuestos 3-6. ....	23
Figura 19. Señales características de resonancia magnética nuclear de protón ( <sup>1</sup> H RMN), con escala de 0-10 ppm, y señales obtenidas de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( <sup>13</sup> C RMN), con escala de 45-180 ppm del compuesto 5. ....	24
Figura 20. Señales características de resonancia magnética nuclear de protón ( <sup>1</sup> H RMN), con escala de 0-10 ppm, y señales obtenidas de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( <sup>13</sup> C RMN), con escala de 45-180 ppm del compuesto 6. ....	24
Figura 21. Disposición de la lámpara LED para la irradiación de las placas de 96 pozos.....	26
Figura 22. Integración de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	33
Figura 23. Prueba de solubilidad de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO. ....	36



Figura 24. Determinación de espectros de UV-Vis antes y después de filtrar las disoluciones de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.....	36
Figura 25. Disoluciones de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.....	37
Figura 26. Diseño experimental y tiempos de incubación para posterior irradiación.....	38
Figura 27. Filtración de las disoluciones en medio DMEM de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.....	40
Figura 28. Acoplamiento molecular del compuesto 5 en la proteína 1M17 (forma activa) .....	45
Figura 29. Acoplamiento molecular del compuesto 5 en la proteína 4HJO (forma inactiva) .....	46
Figura 30. Cámara de Neubauer.....	62

### *Índice de Tablas.*

Tabla 1. Características químicas de los compuestos 5 y 6. ....	23
Tabla 2. Diseño experimental para el ensayo de captura de radical anión superóxido. ....	25
Tabla 3. Condiciones experimentales para el ensayo de captura de radical superóxido. ....	27
Tabla 4. Dosis lumínicas y su tiempo de irradiación para el ensayo de captura de radical superóxido. ....	28
Tabla 5. Diseño experimental para el ensayo de captura de radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ).....	31
Tabla 6. Condiciones experimentales para el ensayo de captura de radical hidroxilo. ....	32
Tabla 7. Dosis lumínicas y su tiempo de irradiación para el ensayo de captura de radical hidroxilo. ....	33

### *Índice de Gráficas.*

Gráfica 1. Absorbancia del formazán obtenido dada la producción de radical superóxido, en función de la fluencia. ....	29
Gráfica 2. Compuesto 5 al ser irradiado con una luz de 460 nm a una energía de 75 J/cm <sup>2</sup> . ....	29
Gráfica 3. Producción de radical hidroxilo por el compuesto 5. ....	35
Gráfica 4. Inhibición celular de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO sin luz, línea MCF-7. ....	41
Gráfica 5. Inhibición celular de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO con luz, línea MCF-7.....	42
Gráfica 6. Inhibición celular de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO, línea HaCaT.....	43

### *Índice de Esquemas.*

Esquema 1. Síntesis del compuesto 5 y 6.....	20
Esquema 2. Síntesis del compuesto 2. ....	20
Esquema 3. Síntesis del compuesto 3. ....	21
Esquema 4. Síntesis del compuesto 4. ....	21
Esquema 5. Síntesis del compuesto FcCHO. ....	22
Esquema 6. Síntesis del compuesto 5. ....	22
Esquema 7. Síntesis del compuesto 6. ....	23

## Abreviaturas y acrónimos

°C	Grados Celsius	MeOH	Metanol
A	Ampere	mm	Milímetros
Å	Angstrom	mM	Milimolar
Akt	Proteína cinasa B	mmol	Milimol
ATP	Adenosín trifosfato	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
CC	Corriente continua	NBT	Nitrozul de tetrazolio
CCF	Cromatografía de capa fina	nm	Nanómetros
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	Pd/C	Paladio sobre carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	PDB	Protein Data Bank
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco	PDB ID	Identificador del Protein Data Bank
DMF	Dimetilformamida	PI3K	Fosfatidilinositol- 3-cinasa
DMF-DMA	N,N-Dimetilformamida dimetilacetal	PR	Receptor de progesterona
DMSO	Dimetilsulfóxido	PS	Fotosensibilizador
DNA	Ácido desoxirribonucleico	RMN	Resonancia magnética nuclear
DO	Densidad óptica	RNA	Ácido ribonucleico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	ROS	Especies reactivas de oxígeno
ER	Receptor de estrógeno	rpm	Revoluciones por minuto
EtOH	Etanol	RTK	Receptor de tirosina cinasa
FcCHO	Formilferroceno	SFB	Suero fetal bovino
g	Gramos	SOD	Superóxido dismutasa
H <sub>2</sub> O	Agua	TFD	Terapia fotodinámica
J/cm <sup>2</sup>	Energía	TKD	Dominio de tirosina cinasa
kDa	Kilodalton	uPAR	Receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa
LED	Diodo Emisor de Luz	UV	Ultravioleta
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno	W	Watt
MB	Azul de metileno	µg	Microgramo
MeCN	Acetonitrilo	µL	Microlitro

## 1. Introducción

Con el propósito de contar con compuestos que tengan una parte activable por la luz, para la terapia fotodinámica (TFD), y una porción farmacofórica, que les permita interactuar con el dominio de tirosina cinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (TKD-EGFR), en este trabajo se investigaron las propiedades ópticas y químicas de un fotosensibilizador del tipo quinazolina-ferroceno, presente en los compuestos **5** y **6**. Cuando el compuesto **5** fue excitado por una luz LED de 460 nm, generó especies reactivas de oxígeno (ROS). El experimento con nitroazul de tetrazolio (NBT), confirmó que el compuesto **5** generó radical anión superóxido; y esta producción aumentó con la intensidad y concentración de la luz LED. La prueba de blanqueo con azul de metileno, cuantificó los radicales hidroxilos generados por la descomposición del compuesto **5** en un entorno acuoso. En la oscuridad, el compuesto **5** demostró una modesta toxicidad en las células de cáncer de mama (MCF-7), mientras que al ser irradiado con una luz de 460 nm y 75 J/cm<sup>2</sup> de energía, a una concentración de 80 μM, dicha citotoxicidad aumentó notablemente. Además, el compuesto **5** mostró una posible capacidad de inhibición de TKD-EGFR mediante simulaciones de acoplamiento molecular, donde se ubicó en el sitio activo del dominio tirosina cinasa. Asimismo, el compuesto **5**, al ser evaluado en la línea celular no cancerosa de queratinocitos (HaCaT), demostró cierta selectividad sobre la línea de cáncer, ya que disminuyó aún más la viabilidad celular de las células de la línea MCF-7 (cancerosa) que la de la línea celular HaCaT (no cancerosa).

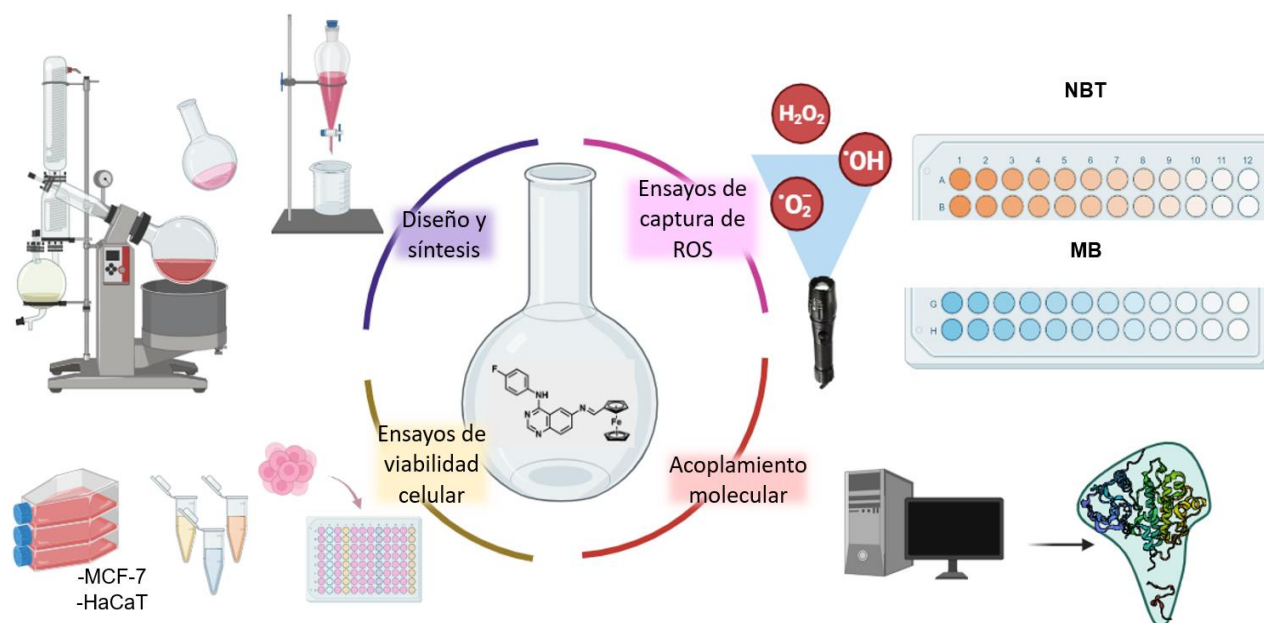
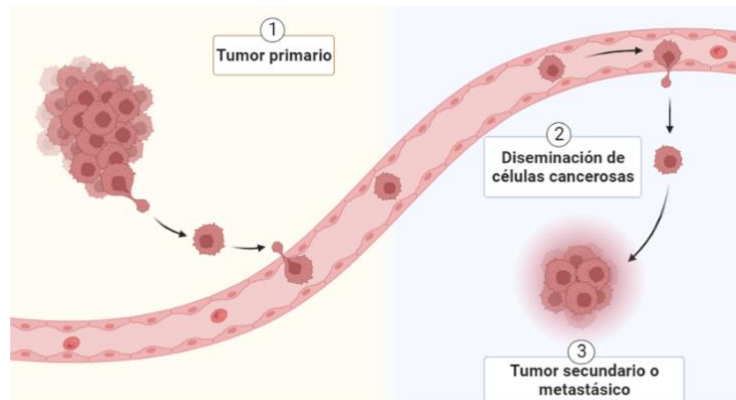


Figura 1. Diagrama general del proyecto de tesis.

## 2. Antecedentes

### 2.1. El cáncer y sus características

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales en el cuerpo, que pueden invadir y destruir tejidos cercanos y extenderse a otras partes del cuerpo. En algunas ocasiones, el proceso de división celular se ve alterado y las células anormales o dañadas se multiplican de manera descontrolada, lo que puede dar lugar a la formación de tumores, que son masas de tejido. (1) Entre las características de esta enfermedad se encuentran: evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, activación de la inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y mantenimiento de la señalización proliferativa. (2)



*Figura 2. Representación de tumor primario y secundario.*

#### 2.1.1. Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el desarrollo del cáncer

Dentro de los factores intrínsecos, en las últimas décadas se ha establecido que las mutaciones somáticas son el factor principal desencadenante de la carcinogénesis. Sin embargo, tanto la evidencia clínica como la del laboratorio sugieren que la carcinogénesis no se reduce únicamente a las mutaciones, también es importante considerar si los mecanismos de reparación del ADN están ausentes o funcionan de manera ineficiente. En la actualidad, se cuestiona cada vez más el papel de las mutaciones somáticas como el principal impulsor de la carcinogénesis, dado que algunos tipos de cáncer no están relacionados con ninguna mutación. Además, la desactivación de genes supresores de tumores también desempeña un papel en el proceso de transformación celular. También se ha planteado que la inflamación crónica juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, aunque su relevancia no se ha dilucidado por completo. Si bien el cáncer tiene un carácter hereditario, solo entre el 5 y 10% son de esta naturaleza. Se cree que alrededor del 15% son causados por infecciones, mientras que los restantes (70-80%) se consideran esporádicos y solo el 15% de éstos últimos se deben a mutaciones somáticas. (3)

El desarrollo del cáncer sigue las siguientes vías: 1) estímulo patógeno, 2) inflamación crónica, 3) fibrosis, 4) cambios en el microambiente celular que resultan en un nicho precanceroso, 5) despliegue de una estrategia de escape del estrés crónico, y 6) una transición de una célula normal a una célula cancerosa. (3)

Con respecto a los factores extrínsecos, éstos son diversos, aunque hay algunos que inciden prácticamente en todos los tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha descubierto que beber té caliente, fumar opio, bajo consumo de frutas y verduras, beber agua sin tubería, estar en contacto con la contaminación ambiental son atribuibles al 75% de casos de carcinoma de células escamosas de esófago (4). Otro ejemplo es el cáncer de páncreas (altamente agresivo), donde se han descrito factores responsables como la inhalación de humo de cigarrillo, así como la exposición a nitrosaminas mutagénicas, compuestos orgánicos clorados, metales pesados y radiaciones ionizantes. Adicionalmente, también contribuyen la pancreatitis, consumo de altas dosis de etanol, infecciones microbianas, obesidad, diabetes, presencia de cálculos biliares y acumulación de fibras de asbesto. (5)

Cada vez hay una cantidad creciente de evidencias que sugiere que aproximadamente el 90% de los casos de cáncer pueden estar vinculados a influencias ambientales. El ambiente, el modo de vida y las conductas combinan factores de estrés tanto internos como externos. A continuación, se enumeran algunos ejemplos que han sido ampliamente investigados: (6)

- Contaminación del aire emanado de las industrias
- Contaminación ambiental tóxica (metales pesados y agentes genotóxicos, etc.)
- Contaminación del agua potable y de los alimentos
- Exposición a radiaciones ionizantes (exposición profesional, exámenes médicos, etc.)
- Humo de tabaco (tanto activo como pasivo)
- Factores de estrés psicosocial (experiencia interpersonal estresante)
- Factores de riesgo nutricionales (consumo excesivo de alcohol, etc.)
- Infecciones virales
- Implantes artificiales/quirúrgicos (cirugía plástica, odontología, etc.)
- Ocupación profesional en ramas específicas (producción de compuestos tóxicos, ocupación de estatus superior, turnos rotativos y trabajo nocturno, azafatas, etc.)

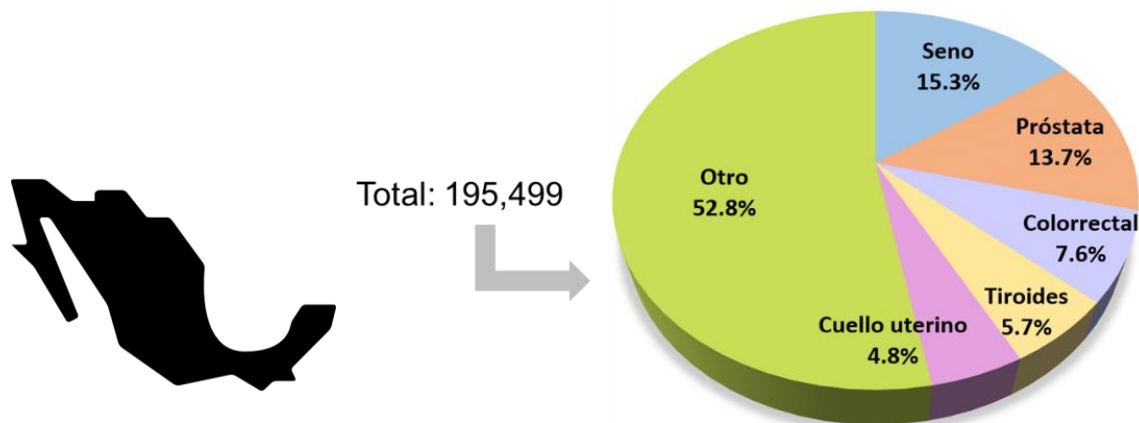
## 2.2. Epidemiología del cáncer

### 2.2.1. Epidemiología del cáncer en México

En México, el cáncer ha mantenido su posición en el segundo o tercer lugar entre las principales causas de muerte. Para el año 2013, el país registró una tasa de mortalidad de 66.37 por cada 100000 habitantes. Los estados ubicados en el norte de México, como Chihuahua, Sonora y Nuevo León, presentan tasas de mortalidad superiores a 75 por cada 100000 habitantes, lo que los convierte en las regiones con el mayor número de decesos atribuidos a neoplasias, junto con la Ciudad de México y Veracruz, que registraron tasas de 77.16 y 76.04 por cada 100,000 habitantes, respectivamente. En contraste, Tlaxcala, Estado de México y Guerrero se destacaron por tener tasas de mortalidad más bajas debido al cáncer, con cifras iguales o inferiores a 54 por cada 100,000 habitantes. (7)

Las estimaciones sobre la mortalidad en la población general indican que, de entre las diez causas principales de muerte por cáncer, el de próstata, hígado y mama experimentan un aumento continuo anual, alcanzando tasas de alrededor de cinco a seis por cada 100000 habitantes. El cáncer colorrectal, por su parte, muestra un notable incremento de casi tres puntos. (7)

En 2020, se produjeron en México 195,499 nuevos casos de cáncer y casi 90,222 de muertes por esta enfermedad. Se estima que, de 195499 casos nuevos, el cáncer de seno tuvo una alta incidencia (15.3%), siguiendo el cáncer de próstata (13.7%), colorrectal (7.6%), tiroides (5.7%) y cuello uterino (4.8%). (8)

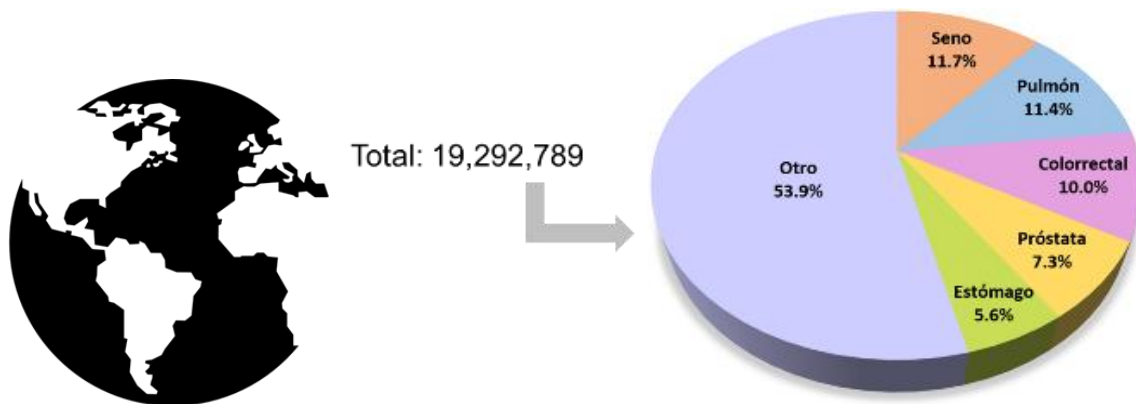


*Figura 3. Casos nuevos de cáncer, en el año de 2020 en México, según el órgano o sistema al cual afecta.*

### 2.2.2. Epidemiología del cáncer en el mundo

El cáncer representa una de las principales razones de fallecimiento y constituye un obstáculo significativo para el aumento de la esperanza de vida en todas las naciones del mundo. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2019, el cáncer se sitúa como la causa primordial o secundaria de defunción antes de los 70 años en 112 de los 183 países estudiados, ocupando el tercer o cuarto lugar en otros 23 países. El aumento en la relevancia del cáncer como la principal causa de deceso se debe en parte a la notable disminución en las tasas de mortalidad por accidentes cerebrovasculares y enfermedades coronarias, en comparación con el cáncer, en numerosas naciones. (9)

Se estima que en 2020 se produjeron en todo el mundo 19.3 millones de nuevos casos de cáncer (18.1 millones, excluyendo el cáncer de piel de tipo no melanoma) y casi 10 millones de muertes por cáncer (9.9 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma). El cáncer de mama femenino ha superado al cáncer de pulmón como el más comúnmente diagnosticado; con un estimado de 2.3 millones de casos nuevos (11.7%), seguidos de los cánceres de pulmón (11.4%), colorrectal (10 %), próstata (7.3%) y estómago (5.6%). El cáncer de pulmón siguió siendo la principal causa de muerte por cáncer, con aproximadamente 1.8 millones de defunciones (18%), seguido del cáncer colorrectal (9.4%), de hígado (8.3%), de estómago (7.7%) y de mama en mujeres (6.9%). (9)



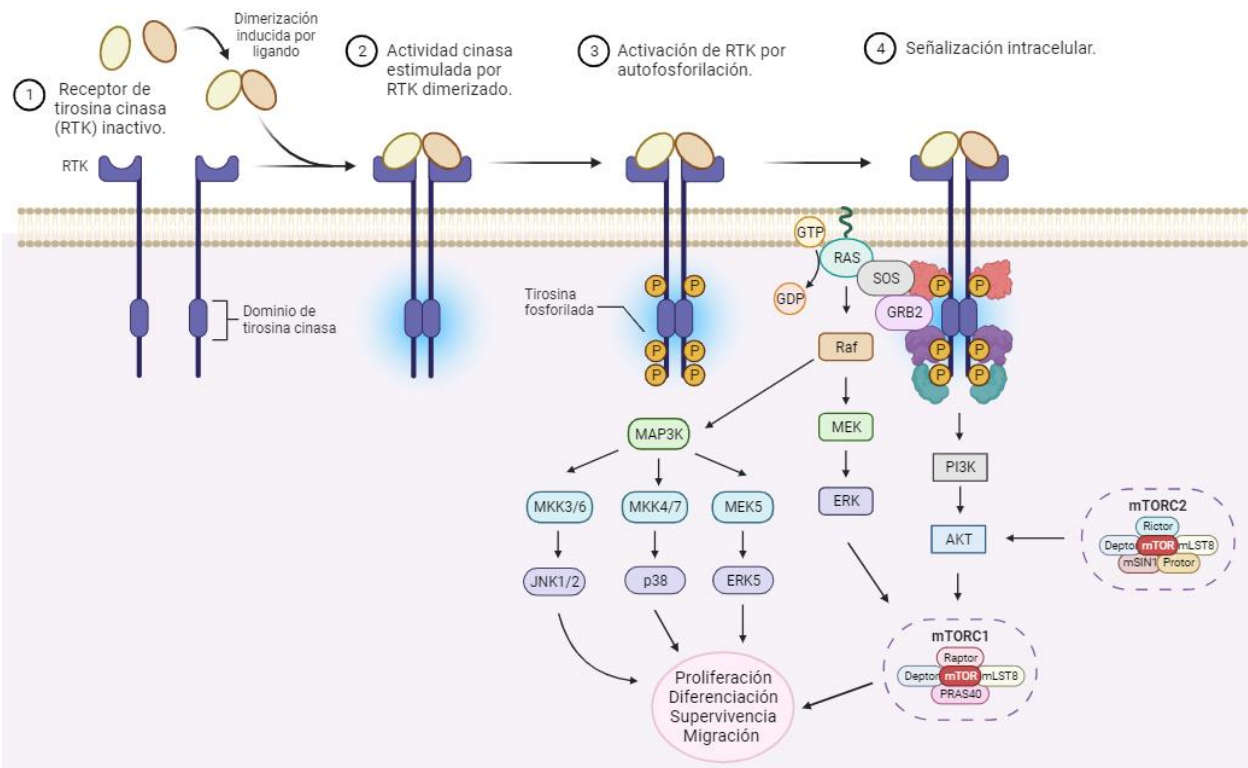
*Figura 4. Casos nuevos de cáncer, en el año 2020 a nivel mundial, según el órgano o sistema al cual afecta.*

### 2.3. Vías de señalización celular en el cáncer

El mantenimiento del equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular es la clave principal del desarrollo normal en el cuerpo humano. Las células cancerosas tienen una mayor tasa de proliferación que de muerte. Por lo general, el ciclo celular desregulado, causado por una señalización aberrante, es la causa de dicho deterioro. Muchas proteínas receptoras de tirosina cinasas, incluido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (TKD-EGFR), y otras proteínas, como caveolina-1, CD44, uPAR, H-Ras, integrinas y cateninas, han sido implicadas en diversas funciones celulares, que incluyen estabilidad y señalización. (10)

#### 2.3.1. Familia RTK.

Los receptores de tirosina cinasa (RTK) son una familia de receptores de superficie celular que actúan como receptores de factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, factores neurotróficos y otras moléculas de señalización extracelular. Los RTK median vías de señalización clave que están involucradas en la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la migración celular. La familia RTK comprende varias subfamilias que incluyen, entre otros, receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), receptores de insulina y receptores del factor de crecimiento similar a la insulina (IR e IGFR), receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptores del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) y el protooncogén c-KIT. Los monómeros RTK se organizan en un dominio extracelular (N-terminal), transmembrana y su cinasa citoplasmática. Se activan a través de la dimerización inducida por ligando que da como resultado la autofosforilación del receptor y la activación de la tirosina de los sustratos de RTK, incluida la fosfolipasa C- $\gamma$ , las proteínas cinasas activadas por mitógenos y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). (11)



**Figura 5. Representación esquemática del receptor tirosina cinasa y las vías de señalización posteriores.**

Como se muestra en la **Figura 5**, los receptores de tirosina cinasa se autofosforilan tras la unión del ligando, lo que da como resultado la activación de Ras y la inducción de la serina/treonina cinasa Raf. Raf fosforila Mek1/2, que a su vez fosforila y activa Erk1/2. Raf también activa las cinasas MAP3 que activan MKK4/7, MKK3/6 y MEK5, que activa p38, JNK1/2, y ERK5, consecutiva y respectivamente. PI3K se activa mediante la autofosforilación de RTK y da como resultado la activación de Akt, que también induce mTOR dentro del complejo mTORC1. Akt también está regulado por el complejo mTORC2. (11)

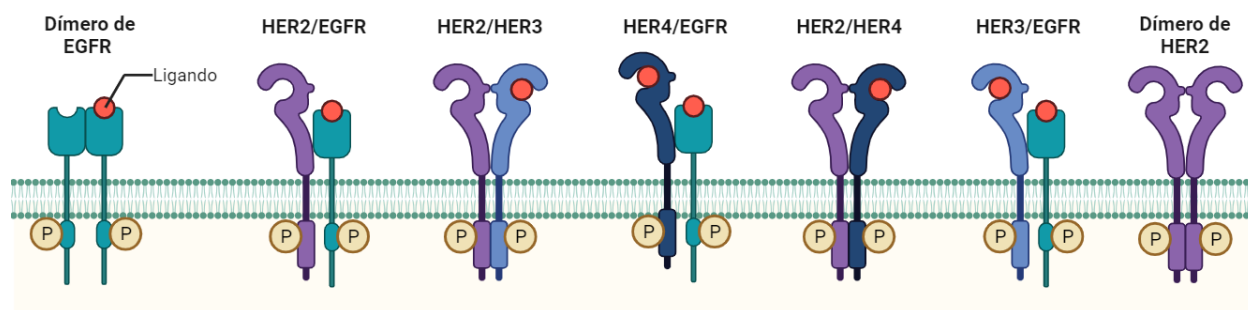
### 2.3.2. Señalización de EGFR.

En 1962, Cohen describió por primera vez un factor de crecimiento que tiene un profundo efecto en la diferenciación de células específicas *in vivo*, y que es un potente factor mitogénico para una variedad de células cultivadas, de origen ectodérmico y mesodérmico, que se conoce hoy como factor de crecimiento epidérmico (EGF). La familia EGFR desempeña un papel esencial en el desarrollo normal de los órganos al mediar en la morfogénesis y la diferenciación, y desempeña un papel crucial en el crecimiento, la diferenciación y la motilidad de las células normales y cancerosas. (10)

EGFR es uno de los cuatro miembros de la familia de RTK ErbB/HER que se encuentra anclada a la membrana. Esta familia también comprende a HER2 (neu/ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). (12) En condiciones normales, el EGFR se encuentra como monómero en la superficie celular en un estado autoinhibido, estructuralmente compacto, y muestra una actividad quinasa mínima.



La unión del ligando en el dominio extracelular conduce a la homo o heterodimerización del receptor. Los cuatro miembros de la familia ErbB son muy promiscuos y sus heterodímeros son más potentes en la transducción de señales que los homodímeros, lo que proporciona un medio para la amplificación y diversificación de señales, con implicaciones significativas para su capacidad de señalización. HER2 ha perdido la capacidad de unirse a ligandos y funciona principalmente, formando heterodímeros con otros miembros de la familia, como EGFR, es el socio de dimerización preferido de todos los demás receptores HER. HER3 ha perdido intensidad en su actividad cinasa y solo puede enviar señales mediante heterodimerización. De manera similar a EGFR, HER4 es en cambio un RTK completamente funcional, capaz de señalizar como homo o heterodímero, sin embargo, es el único miembro de la familia capaz de mostrar propiedades inhibitoras del crecimiento. (12)



*Figura 6. Heterodímeros y homodímeros que pueden formar los miembros de la familia RTK ErbB/HER.*

El EGFR es una glicoproteína lipídica transmembranal de 170 kDa, que comprende una cadena polipeptídica de 1,186 aminoácidos y está compuesta por tres dominios: un dominio extracelular de unión a ligando, una región lipofílica transmembranal y un dominio intracelular, que exhibe actividad intrínseca de tirosina cinasa. La región extracelular de unión al ligando de la membrana celular está conectada a la maquinaria intracelular, que posee la actividad de tirosina cinasa, a través de un dominio hidrofóbico de membrana. (10)

Al unirse el ligando al dominio extracelular de EGFR, el receptor procede a la dimerización e internalización. Cuando EGFR se activa, conduce a la excitación de vías de señalización intracelular posteriores, como PI3K/Akt y MAPK, que están involucradas en la proliferación, diferenciación, migración, invasión, metástasis y apoptosis de ciertas células. (13),(10)

La sobreexpresión de EGFR, produce un fenotipo neoplásico en las células tumorales, que se asocia con tasas más altas de progresión de formas superficiales a formas invasivas de varios tipos de cáncer. (10)

#### 2.4. Terapia antitumoral

Los distintos tipos de tratamientos reportados son: cirugía, terapia con radiación y tratamientos sistémicos, tales como quimioterapia, terapia dirigida, terapia hormonal e inmunoterapia. (14) Ahora bien, el curso del tratamiento y la elección del tipo del mismo, dependerá del órgano o tejido afectado. Por ejemplo, el tratamiento más común entre las mujeres con cáncer de mama en estadio temprano (estadio I o II), es la cirugía conservadora de mama con radioterapia adyuvante (49 %), aunque el 34 % de las pacientes se someten a una mastectomía.

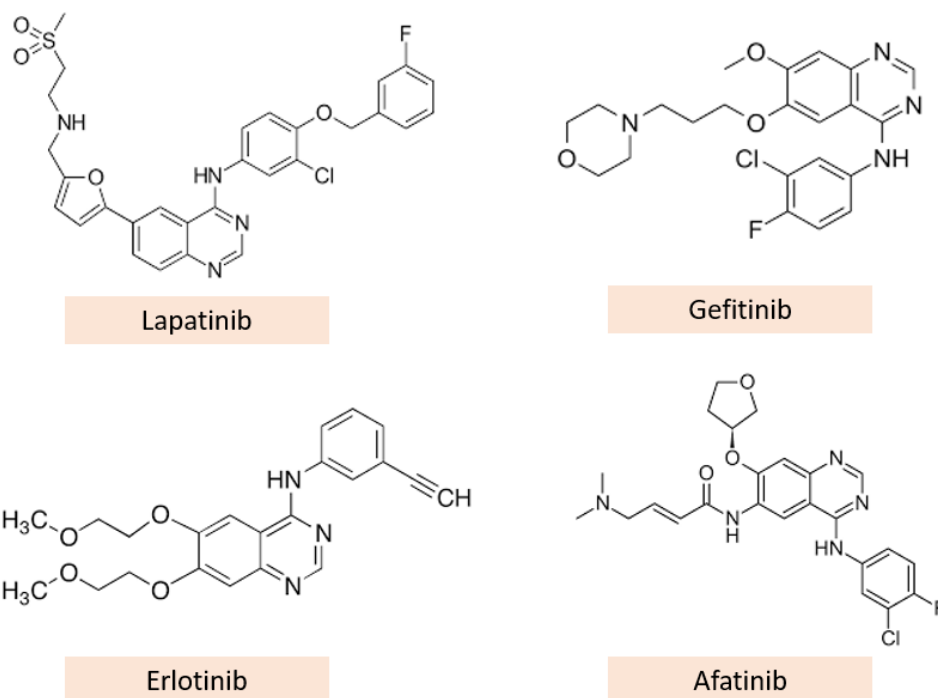
Por su parte, la mayoría de los pacientes con cáncer de colon en estadio I y II, se someten a una colectomía sin quimioterapia (84 %), y aproximadamente dos tercios de los pacientes con enfermedad en estadio III (así como algunos pacientes con enfermedad en estadio II), reciben quimioterapia adyuvante para reducir el riesgo de recurrencia (14).

#### 2.4.1. Terapia dirigida a EGFR

Las mutaciones genéticas, que afectan a los miembros de EGFR, se han asociado con varios tipos de cáncer. Estas mutaciones provocan su sobreexpresión en el 30 % al 50 % de los glioblastomas, del 25 % al 82 % en el cáncer colorrectal, y del 5 % al 20 % en el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Es por ello que se desarrollaron terapias dirigidas contra este receptor. Cetuximab (Erbix) y Panitumumab (Vectibix), son dos ejemplos de anticuerpos monoclonales que se utilizan para atacar el dominio extracelular para tratar pacientes con cáncer colorrectal metastásico. El beneficio de Cetuximab y Panitumumab se limitó a pacientes con tumores con el gen RAS “wild-type” o no mutado (15).

Lapatinib (Tykerb), un inhibidor de TKD-EGFR, interacciona en el mismo sitio de unión del ATP en el dominio cinasa de EGFR y HER2; y se ha utilizado como tratamiento alternativo de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, que desarrollaron resistencia a Trastuzumab. También se ha usado en combinación con compuestos quimioterapéuticos, como la Capecitabina, y se ha demostrado que reduce el riesgo de progresión de la enfermedad en mujeres con cáncer de mama HER2 positivo avanzado, que habían recibido múltiples tratamientos previos. Más recientemente, el Lapatinib se ha utilizado en combinación con Letrozol (Femara) para tratar a mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama metastásico HER2 positivo y receptor hormonal (HR) positivo. Esta combinación resultó en una mayor supervivencia libre de progresión en la población HER2-positiva.

Gefitinib (Iressa) y Erlotinib (Tarceva), que también son inhibidores de la TKD-EGFR, se han usado en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico. Estos fármacos se han utilizado en combinación con otros quimioterapéuticos y dieron como resultado una supervivencia mejorada y libre de progresión. Finalmente, Afatinib (Giotrif) es un nuevo inhibidor de la tirosina cinasa de la familia ErbB que bloquea selectivamente a EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4. A diferencia de Gefitinib y Erlotinib, Afatinib se une de forma irreversible (covalentemente) al dominio tirosina cinasa promoviendo así una actividad antiproliferativa sostenida. Este fármaco se ha probado en varios ensayos clínicos y ha demostrado que prolonga la supervivencia libre de progresión de los pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Sin embargo, este efecto parece ser más beneficioso para los pacientes portadores de mutaciones de delección del cromosoma 19 (*del19*) de EGFR (15).



*Figura 7. Fármacos inhibidores de tirosina cinasa utilizados en terapia anticancerosa dirigida a EGFR.*

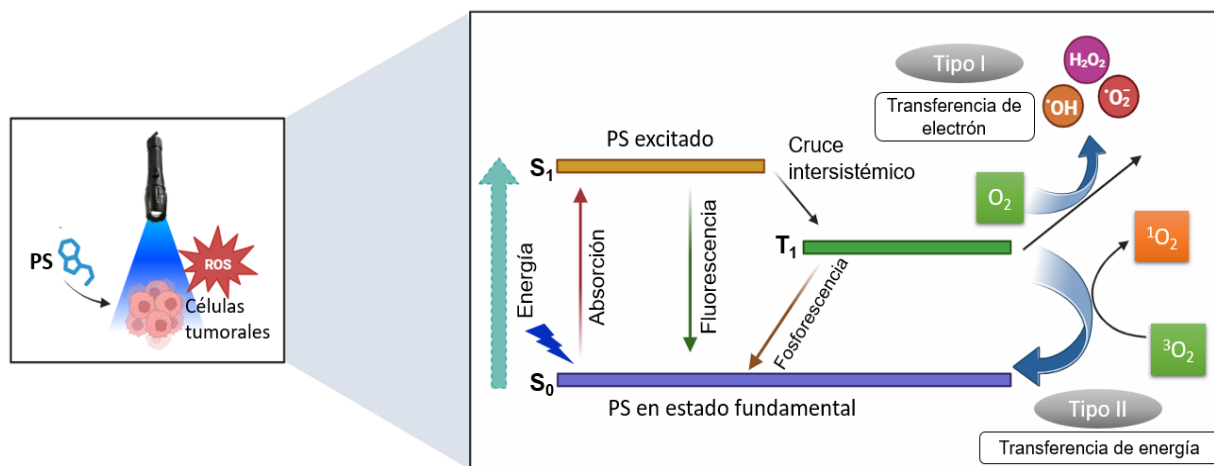
## 2.5. Terapia fotodinámica

Las propiedades terapéuticas de la luz se conocen desde hace miles de años, pero fue hasta el siglo pasado cuando se desarrolló la terapia fotodinámica (TFD). En la actualidad, la TFD se está probando en la clínica para su uso en el tratamiento de cáncer de cabeza, cuello, cerebro, pulmón, páncreas, cavidad intraperitoneal, mama, próstata y piel. La TFD involucra dos componentes individualmente no tóxicos que se combinan para inducir efectos celulares y tisulares de una manera dependiente del oxígeno. El primer componente de la TFD es un fotosensibilizador (PS), el cual es una molécula fotosensible que se localiza en una célula y/o tejido diana. El segundo componente implica la administración de luz de una longitud de onda específica que activa al PS.

El PS transfiere energía de la luz al oxígeno molecular, para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas reacciones ocurren en el lugar inmediato del PS que absorbe la luz, por lo tanto, las respuestas biológicas al PS se activan solo en las áreas particulares de tejido que han sido expuestas a la luz. (16) Entre las ventajas de la TFD se encuentran una mínima toxicidad tisular, insignificantes efectos sistémicos, reducida morbilidad a largo plazo y falta de mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos. (17)

En cuanto al mecanismo de acción, después de la absorción de luz (fotones), el PS se transforma de su estado fundamental (estado singlete) a un estado excitado electrónicamente, de vida relativamente larga (estado triplete) a través de un estado singlete excitado de corta duración. El triplete excitado puede experimentar dos tipos de reacciones. Primero, puede reaccionar directamente con un sustrato, como la membrana celular o una molécula, y transferir un átomo de hidrógeno (electrón) para formar radicales.

Estos radicales interactúan con el oxígeno para producir productos oxigenados (reacción de tipo I). Alternativamente, el triplete puede transferir su energía directamente al oxígeno, para formar oxígeno singlete, (reacción tipo II).



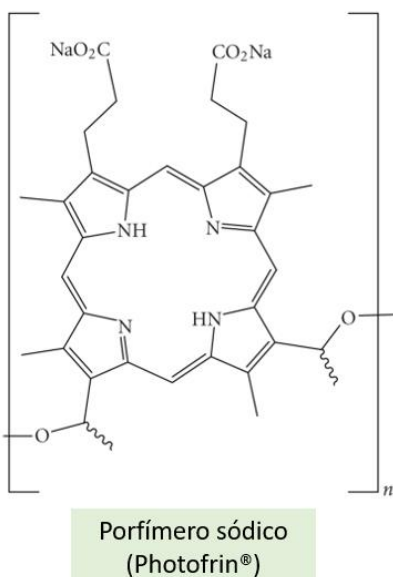
**Figura 8. Mecanismo de la reacción fotodinámica.**

Como se muestra en la **Figura 8**, la exposición a la luz lleva a una molécula fotosensibilizadora del estado singlete fundamental ( $S_0$ ) a un estado singlete excitado ( $S_1$ ). La molécula en  $S_1$  puede sufrir un cruce entre sistemas a un estado triplete excitado ( $T_1$ ) y luego formar radicales mediante una reacción de tipo I o, más probablemente, transferir su energía al oxígeno molecular ( $^3O_2$ ) y formar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), ocurriendo una reacción de tipo II.

Tanto las reacciones de tipo I como las de tipo II ocurren simultáneamente, y la relación entre estos procesos depende del tipo de PS utilizado, las concentraciones de sustrato y oxígeno, así como la afinidad de unión del PS por el sustrato. Debido a la alta reactividad y la corta vida media de las ROS, solo las células que están próximas al área de su producción (áreas de localización del fotosensibilizador) se ven directamente afectadas por la TFD (16).

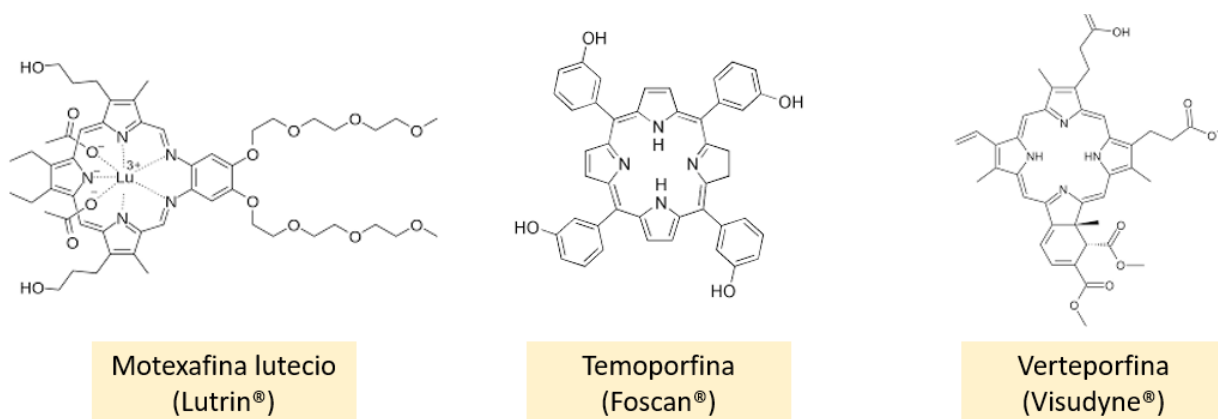
### 2.5.1. Fotosensibilizadores (PS)

La hematóporfina y sus derivados son la primera generación de PS. La primera generación de PS, se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de diferentes cánceres en la práctica clínica. Sin embargo, hubo algunas limitaciones e inconvenientes intrínsecos, como la pureza química deficiente, la longitud de onda corta de la luz, la vida media prolongada y la acumulación intensa en los tejidos normales, lo que resultó en toxicidad por fotosensibilidad. Photofrin® (porfímero sódico) fue el primer agente para TFD, aprobado para el tratamiento del cáncer de esófago obstructivo en 1995. Todavía se utiliza ampliamente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (pulmón, vejiga, cuello uterino, etc.) (18).



**Figura 9. Photofrin®, primer agente para TFD aprobado para el tratamiento del cáncer de esófago**

Los PS de segunda generación, han experimentado mejoras significativas en términos de su pureza, su capacidad para absorber longitudes de onda más largas, su sensibilidad a la luz y su capacidad para dirigirse selectivamente a tejidos. Demuestran ser más eficaces que sus predecesores. La mayoría de estos nuevos PS se basan en estructuras de porfirina y clorina. Además, se excitan con longitudes de onda largas, lo que mejora la penetración de la luz y, en consecuencia, aumenta la eficacia del tratamiento. Algunos ejemplos de PS de segunda generación son: Motexafina lutecio (Lutrin® y Lutex®), Temoporfina (Foscan®), purpurinas (Purlytin®), verteporfina (Visudyne®) y precursores de protoporfirina IX (Hexvix®, Metvix® y Levulan®) (18).



**Figura 10. Fotosensibilizadores de segunda generación.**

Los PS de segunda generación, tienen varios problemas críticos, como la baja solubilidad en agua, la tasa de eliminación del cuerpo y el fotoblanqueo, además de que no mostraron suficiente selectividad tumoral. Las desventajas de los primeros medicamentos con estos PS eran que ocasionaban efectos secundarios, como reacciones alérgicas, náuseas e inflamación, entre otros.

También pueden entrelazarse con las células sanas circundantes y matarlas simultáneamente. Los PS ideales tienen que ser químicamente puros, miscibles y estables en los fluidos corporales, por lo que es necesario desarrollar nuevos PS, con capacidad multifuncional para la terapia avanzada contra el cáncer (18).

## 2.6. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

### 2.6.1. Introducción a las ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se pueden definir de manera general como moléculas químicamente activas, que contienen oxígeno, y este grupo incluye el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En condiciones normales del entorno fisiológico, las ROS dentro de las células se mantienen en niveles bajos y constantes, gracias al equilibrio entre su producción y eliminación. Estas ROS interactúan con moléculas a través de modificaciones reversibles causadas por la oxidación y desempeñan un papel fundamental, en diversas vías de señalización celular, tales como el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. Los niveles bajos de ROS favorecen la proliferación y la supervivencia de las células. Sin embargo, un aumento leve en los niveles de ROS se asocia con el inicio y la progresión de enfermedades como el cáncer. (19)

El exceso de producción de ROS, puede inducir la senescencia y la muerte celular, debido a los efectos dañinos que ocasionan sobre proteínas, lípidos, RNA y DNA. El radical hidroxilo, por su alta reactividad y potencial oxidante, es particularmente responsable de dañar al DNA. En la regulación de cantidades excesivas de ROS, generadas internamente, se emplean antioxidantes no enzimáticos, como las vitaminas E y A; antioxidantes enzimáticos, que incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, y al péptido glutatión (GSH). (19)

Las ROS, son productos de la reducción parcial del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). Dos electrones desapareados con espines paralelos, ubicados en dos orbitales separados de oxígeno molecular, lo hacen altamente susceptible para formar radicales libres. Como se ilustra en la **Figura 11**, el producto de reducción de un electrón del oxígeno molecular se llama ion superóxido, mientras que la reducción de dos electrones conduce al peróxido de hidrógeno. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  al sufrir una reducción produce al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Este último es uno de los oxidantes más fuertes. Su potencial de reducción estándar de 2.31 volts, garantiza reacciones de oxidación especies con potenciales de reducción bajos. (20)

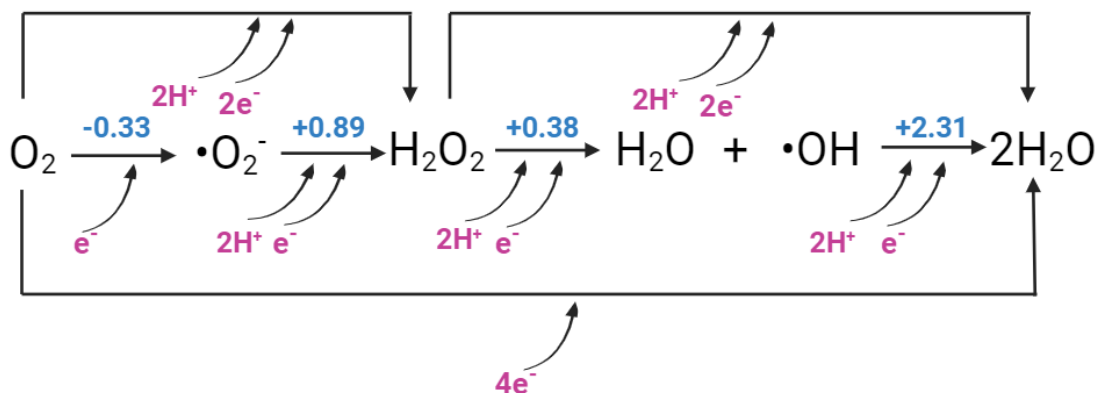


Figura 11. Etapas de reducción de oxígeno molecular que conducen a la generación de ROS junto con sus potenciales de reducción estándar.

### 2.6.2. Fuentes de ROS

La oxidación dependiente de ROS de lípidos, proteínas y DNA intracelulares conduce al daño de biomoléculas e implica varias patologías, incluido el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y la aterosclerosis. Diversos agentes químicos como fármacos, pesticidas, algunos metales y óxidos metálicos, así como factores físicos como la radiación gamma o UV y la temperatura elevada, conducen a una mayor producción de ROS. También son creados por neutrófilos, eosinófilos y macrófagos durante la inflamación y como subproductos de reacciones de transporte de electrones que ocurren en las mitocondrias. De esta forma, las ROS generadas provocan daño oxidativo y alteran las funciones de los órganos y las células, lo que conduce a la muerte celular. (20)

### 2.6.3. Implicaciones de las ROS en el cáncer

Las células normales suelen mantener una homeostasis *redox* y desarrollan una serie de sistemas antioxidantes para eliminar y equilibrar el nivel de ROS. Sin embargo, las células cancerosas con una regulación anómala de la homeostasis *redox* y la adaptación al estrés son más vulnerables al estrés oxidante inducido por agentes generadores de ROS, que es una base importante para que funcione la terapia con ROS. Por lo tanto, la elevación selectiva del nivel de ROS es factible para matar selectivamente las células cancerosas mientras se reduce el daño innecesario a las células normales. (21)

Las células cancerosas muestran una actividad enzimática antioxidante inferior, en comparación con las células normales, lo que resulta en niveles más elevados de ROS en las células tumorales. Además, los niveles aumentados de ROS en las células cancerosas pueden estar parcialmente relacionados con una disfunción en el metabolismo oxidativo mitocondrial. Por consiguiente, es posible que las células tumorales con niveles más altos de ROS endógenas sean más susceptibles a la acción de agentes exógenos que inducen ROS. De hecho, investigaciones han demostrado que el aumento controlado de los niveles de ROS mediante la regulación de las condiciones *redox* puede llevar a la muerte selectiva de células cancerosas, con un impacto limitado en las células normales. Por lo tanto, la inducción de ROS representa una estrategia prometedora en el campo de la terapia contra el cáncer. (19)

### 2.6.4. Papel de las ROS en la terapia fotodinámica

Las ROS también son fundamentales para la terapia fotodinámica (TFD). La eficacia de la TFD puede verse afectada por la naturaleza y la persistencia de las ROS. Una comprensión integral de las vías de generación de ROS, facilita en gran medida el análisis de los mecanismos fotodinámicos y permite la potenciación de la eficacia de la TFD. (20)

Recientemente, la TFD ha surgido como un enfoque prometedor en el tratamiento del cáncer, caracterizado por su capacidad para dirigirse de manera específica en el espacio y en el tiempo, y mínima invasión. Bajo la exposición a luz de una longitud de onda específica, los PS excitados transfieren su energía, generando ROS altamente citotóxicas, lo que puede resultar en la muerte celular, ya sea por necrosis o por apoptosis. No obstante, a pesar del aumento rápido de investigación en este campo, la efectividad terapéutica de la TFD aún se ve limitada por ciertas restricciones.

Por ejemplo, la falta de selectividad hacia los tumores por la mayoría de los PS disponibles, en la actualidad, inevitablemente contribuye a que se presenten reacciones adversas colaterales y a una fotosensibilidad prolongada en la piel. (21)

## 2.7. Terapia combinada: Quimioterapia y TFD.

El manejo de los tumores malignos representa una tarea compleja que no siempre puede abordarse con resultados exitosos. En la actualidad, se emplean distintos enfoques clínicos para abordar el cáncer, y se diseña un plan de tratamiento individualizado para cada paciente, tomando en consideración el estadio de la enfermedad y su ubicación. Este plan terapéutico puede comprender uno o varios tipos de intervenciones. Los principales son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. (22)

La terapia fotodinámica (TFD) y la quimioterapia, cuando se aplican de manera aislada, presentan desventajas y restricciones. En la actualidad, se promueve ampliamente el enfoque de terapia combinada para aumentar la eficacia en el tratamiento del cáncer, en el ámbito clínico. Este enfoque implica la utilización de dos modalidades de tratamiento distintas en relación a un tumor. Este enfoque multimodal permite obtener mejores resultados de curación gracias a la acción sinérgica de ambas modalidades terapéuticas. El uso de la terapia fotodinámica combinada con quimioterapia demostró ser altamente eficaz, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* y en la práctica clínica, una ventaja importante de la terapia combinada es que se supera la resistencia a múltiples fármacos de las células tumorales. (22)

## 2.8. Líneas celulares MCF-7 y HaCaT.

### 2.8.1. Línea celular MCF-7.

Esta línea celular fue establecida en 1973, por el Dr. Soule y sus colegas en el *Michigan Cancer Foundation*, de donde deriva su acrónimo. Las células MCF-7 se aislaron del derrame pleural de una mujer de 69 años con metástasis. Luego de una mastectomía de ambas mamas (la de la mama derecha por un tumor benigno), las recidivas locales se controlaron durante 3 años con radioterapia y hormonoterapia. En días previos al uso de tamoxifeno, la paciente fue tratada con altas dosis del estrógeno sintético dietilestilbestrol y la enfermedad se controló tres veces más rápido de lo esperado, lo que demuestra que el tumor respondía a las hormonas.

Dos meses después de que ocurrieran recidivas nodulares generalizadas, en junio de 1970, se tomaron muestras de un derrame pleural para estudios de laboratorio. Un descubrimiento fundamental para el cáncer de mama fue la descripción del receptor de estrógeno (ER) en las células MCF-7, en 1973. Más adelante, en 1975, se demostró que los antiestrógenos como el tamoxifeno inhibían el crecimiento de las células MCF-7, pero que los estrógenos podían revertir la inhibición.

MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama usada comúnmente, que ha sido propagada durante años por múltiples grupos. Provee un modelo de línea celular de mama adecuado para realizar investigaciones en todo el mundo, incluidas las relacionadas con fármacos anticancerosos. (23)

El crecimiento de las células de cáncer de mama está controlado no solo por el ER y el receptor de progesterona (PR), sino también por los receptores del factor de crecimiento asociado a la membrana plasmática.



Dos miembros particularmente importantes de esta gran familia son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que es activado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), ambos presentes en las células MCF-7. Sin embargo, MCF-7 se considera que es una línea celular que expresa EGFR moderadamente. (23)

### 2.8.2. Línea celular HaCaT

HaCaT es una línea celular monoclonal no tumorigénica, adaptada al crecimiento a largo plazo sin la necesidad de suplementación con factores de crecimiento. Exhibe morfogénesis normal y expresa todos los principales marcadores de superficie y actividades funcionales de queratinocitos aislados. (24) HaCaT es la primera línea de células epiteliales permanentes de la piel humana adulta que muestra una diferenciación normal y proporciona una prometedora herramienta para estudiar la regulación de la queratinización en células humanas. Esta línea celular se obtuvo a partir de un cultivo primario a largo plazo de queratinocitos de piel humana adulta. Estas células pueden considerarse inmortales, ya que se mantienen genéticamente estables incluso en el pase número 140, pero no son tumorigénicas. Incluso después de múltiples pases, las células HaCaT conservan una capacidad notable para la diferenciación normal y, por lo tanto, ofrecen un modelo adecuado y estable para los estudios de queratinización. (25)

## 3. Planteamiento del problema

En las últimas décadas, el cáncer se ha colocado como una de las enfermedades más letales a nivel global. Entre las técnicas terapéuticas más comunes, la terapia fotodinámica ha ganado un interés creciente. No obstante, la gran mayoría de los fotosensibilizadores utilizados en la práctica clínica no cumplen con los estándares ideales y presentan diversas limitaciones, como baja solubilidad en agua, escasa estabilidad ante la luz y una eliminación lenta del organismo. Además, los PS convencionales se distribuyen de forma no específica por todo el cuerpo, siendo el caso ideal que se acumularan en el tejido diana.

De esta forma, ¿será posible obtener una molécula híbrida que combine la inhibición de TDK-EGFR con propiedades fotosensibilizadoras eficaces con miras a mejorar la terapia fotodinámica contra el cáncer?

## 4. Hipótesis

Si se diseña y sintetiza una molécula con una estructura que posea una porción con potencial fotosensibilizador y otra porción con potencial de unión a TDK-EGFR, entonces dicha molécula presentará una actividad citotóxica en células cancerosas, que se acentuará al realizar la irradiación con luz a una longitud de onda específica. Esta molécula tendrá la ventaja, primero por la unión al receptor de EGFR y después, por la producción de especies reactivas de oxígeno.

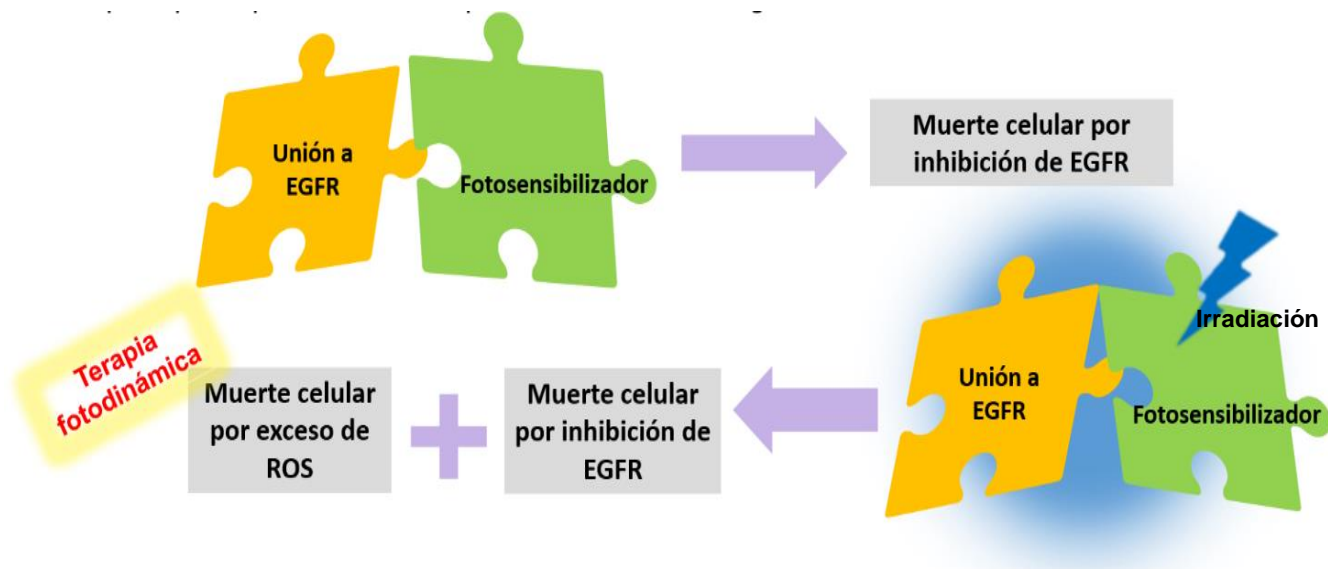


Figura 12. Hipótesis del proyecto.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar fotosensibilizadores de tipo *quinazolina-ferroceno*, diseñados con potencial de dirigirse selectivamente a TDK-EGFR, además de ser capaz de producir especies reactivas de oxígeno *in vitro* e *in vivo*.

### 5.2. Objetivos particulares

- Diseñar 2 moléculas híbridas que posean una parte fotosensibilizadora tipo ferroceno y otra parte, cuya estructura sea capaz de unirse al dominio tirosina cinasa (TDK) del receptor del factor crecimiento epidérmico humano (EGFR).
- Realizar estudios de acoplamiento molecular sobre TDK-EGFR, en su forma activa e inactiva.
- Sintetizar y caracterizar las moléculas a escala de 200 mg.
- Obtener el espectro de absorción UV-Vis de las moléculas sintetizadas.
- Comprobar la producción de especies reactivas de oxígeno, mediante el ensayo de captura de radical hidroxilo y ensayo de captura de radical anión superóxido.
- Evaluar el comportamiento citotóxico de los compuestos sintetizados en líneas celulares MCF-7 y HaCaT.

## 6. Diseño de moléculas

La combinación entre la terapia fotodinámica y la quimioterapia permite la producción de especies reactivas de oxígeno en un sitio en particular. En los subcapítulos de este capítulo, se explicará que las moléculas propuestas se componen de 3 partes, y se exponen las partes críticas en el diseño de cada una de las partes, para comprender la acción combinada que se espera obtener.

### 6.1. Diseño de la parte de unión a EGFR

Para anclar nuestras moléculas propuestas en las células cancerosas, se utilizará como proteína diana el dominio de tirosina cinasa del receptor de crecimiento epidérmico (TKD-EGFR). Entre los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer por su conocida inhibición de TKD-EGFR como se ha mencionado anteriormente, se encuentran el Gefitinib y el Erlotinib (**Figura 13**), y con sus estructuras se puede realizar un modelado farmacofórico (**Figura 14**) tomando en cuenta a ambas moléculas. El modelo propuesto (**Figura 14**) involucra la permanencia de la quinazolina debido a las interacciones que se dan al tener dos grupos aceptores de puente de hidrógeno (APH). También se conserva la sustitución en la posición 4 de la quinazolina, con la misma amina como *linker* con el otro anillo aromático sustituido en posición *para* con flúor. En la posición 6 de la quinazolina, se propone colocar un grupo con amina primaria, para facilitar reactividad de esta zona cuando ocurra la elongación de la molécula.

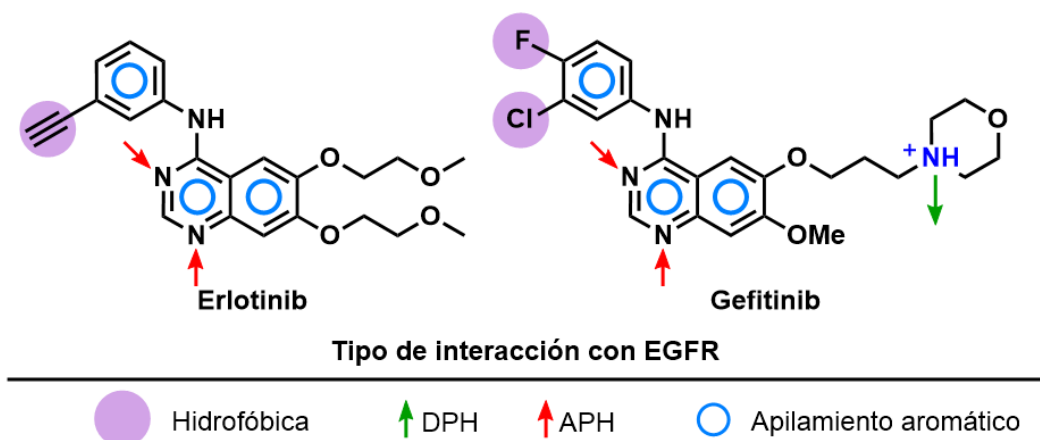
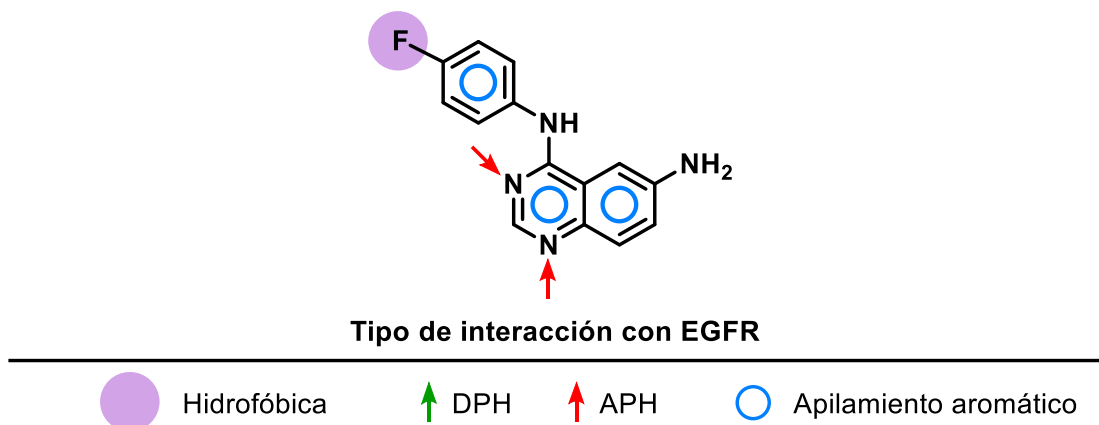


Figura 13. Interacciones de Gefitinib y Erlotinib con EGFR.



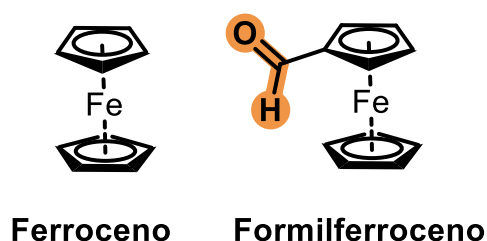
*Figura 14. Modelado de la sección de unión a EGFR de las moléculas diseñadas.*

### 6.2. Diseño de la parte fotosensibilizadora

Para la parte del fotosensibilizador, nos hemos centrado en explorar a los derivados del ferroceno dado que diversos estudios han concluido que dichos derivados son capaces de producir especies reactivas de oxígeno. Esto por las reacciones tipo Fenton que se producen *in situ*. (26), (27) También se utilizará esta molécula por su fácil funcionalización y favorables propiedades electrónicas. (27)

Ya que en nuestro grupo de investigación se tiene la información de que la porción de quinazolina no les proporciona características de absorción en la región de luz visible a las moléculas, se espera que, adicionando a las moléculas el derivado de ferroceno, éstas adquieran la propiedad de absorber luz de una longitud de onda que se encuentre en el espectro de luz visible, un aspecto fundamental para obtener una TFD exitosa.

Para la unión con el ferroceno, se planteó funcionalizarlo como han hecho otros investigadores (28), a partir del ferrocenocarboxaldehído o formilferroceno (**FcCHO**) para sintetizar la molécula híbrida (**Figura 15**).



*Figura 15. Funcionalización propuesta para el ferroceno para las moléculas diseñadas.*

### 6.3. Diseño del *linker*

En la elucidación del *linker*, se explorarán dos formas de unión. La primera en la cual la porción de unión a EGFR se une al derivado de ferroceno con un doble enlace (Estructura A), y en la segunda, en la cual se unan ambas partes mediante un enlace simple, (Estructura B), como se muestra en la **Figura 16**.

Aunque, se presume que la molécula con mejor resultado para este proyecto, será la que posee la estructura A, ya que ésta forma un sistema donante- $\pi$ -aceptor (D- $\pi$ -A) y los espectros ópticos de los sistemas D- $\pi$ -A, basados en ferroceno, generalmente contienen una banda de transferencia de carga intramolecular de metal a ligando (MLCT), en la región visible intensa, (27) dada la conjugación que existe en todo el sistema.

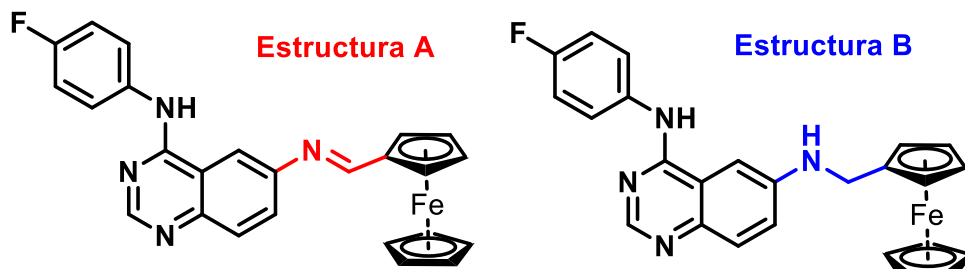


Figura 16. Estructuras de las moléculas diseñadas.

De esta forma, se utilizará la porción con el ferroceno como fotosensibilizador y la porción con la quinazolina, como posible inhibidor de TKD-EGFR. La combinación de las dos porciones en una única molécula, puede potenciar el efecto anticancerígeno del producto resultante.

En resumen, se cumple con el objetivo del diseño de las moléculas, que es obtener moléculas pequeñas (comparadas con los fotosensibilizadores actuales), que sean capaces de unirse a TKD-EGFR y producir ROS en las células cancerosas. Además, se espera que puedan sintetizarse en pocos pasos con altos rendimientos. De esta forma, se obtiene el diseño final (Figura 17).

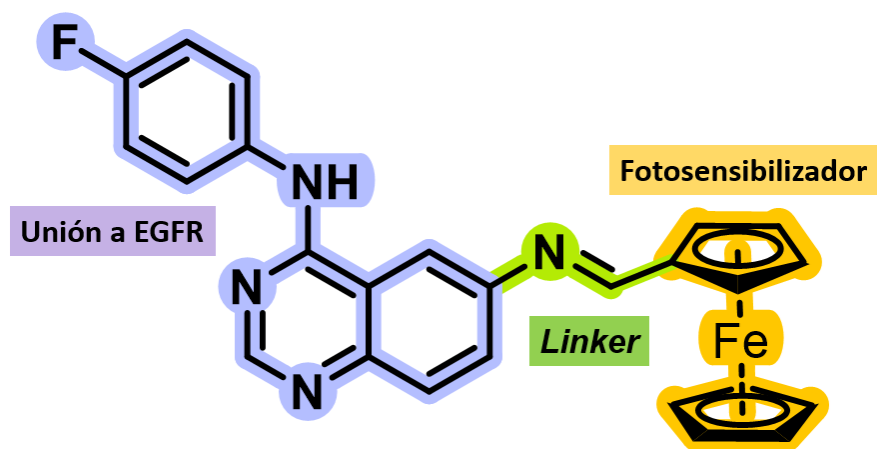
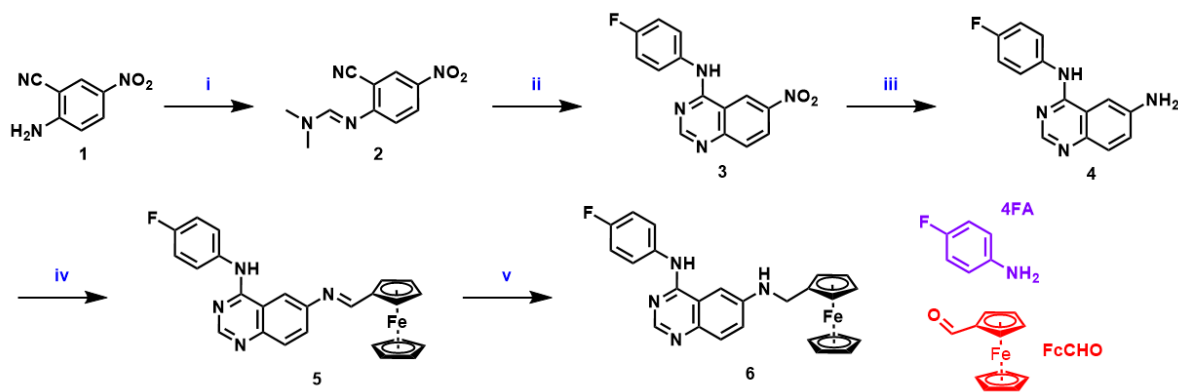


Figura 17. Diseño final de la estructura A.

## 7. Síntesis y caracterización de moléculas

En este apartado, se presenta una visión general de los métodos utilizados para sintetizar las moléculas híbridas de quinazolina-ferroceno diseñados: compuesto **5** (estructura A) y **6** (estructura B); nomenclatura establecida dada la síntesis química y los pasos de la misma. La síntesis de estos compuestos se llevó a cabo siguiendo la ruta delineada en el **Esquema 1**.

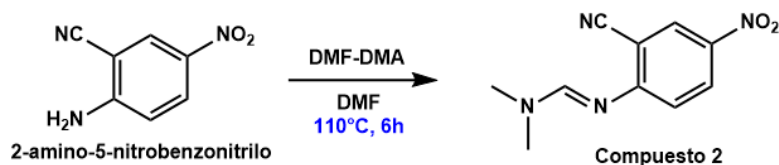
En los subcapítulos de esta sección, se presentan los resultados y se discuten los intermediarios y los productos finales obtenidos. La caracterización instrumental de los productos finales, así como sus puntos de fusión, también se describen de forma detallada, y se especifica el procedimiento para obtener a los compuestos en el **ANEXO 1**.



**Esquema 1. Síntesis del compuesto 5 y 6.** (i) DMF-DMA, DMF, reflujo, 6 h; (ii) 4FA (1.2 eq), MeCN/AcOH (7:3), reflujo, 4 h; (iii) 10% Pd/C, HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>, MeOH, reflujo, 1 h; (iv) FcCHO (1.1 eq), mW (850 watts), 120°, 20 min; (v) NaBH<sub>3</sub>CN, MeCN, t.a., 10 min

### 7.1. Síntesis del compuesto 2

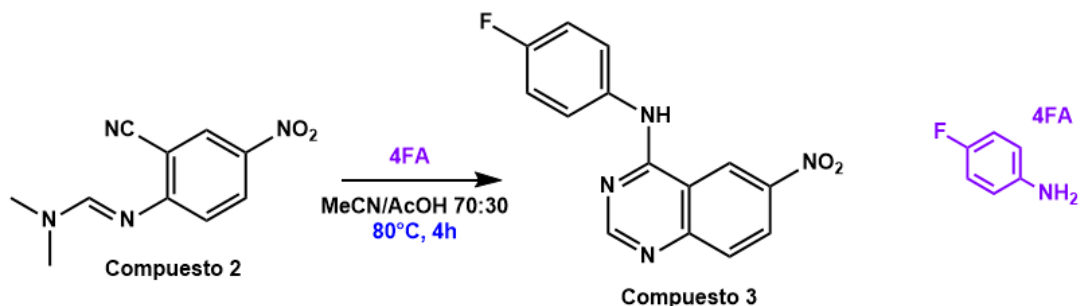
En la síntesis del compuesto **2**, se utilizó una amina aromática con N,N-dimetilformamida dimetilacetil (DMF-DMA), esta es una estrategia que se ha utilizado para la síntesis de moléculas en otros grupos de investigación (29–31). La síntesis del compuesto **2** consistió en la reacción de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo con DMF-DMA, utilizando DMF como disolvente a 110°C por 6 horas; ambos reactivos se encuentran comercialmente disponibles. El objetivo de esta reacción fue obtener un intermediario, que posteriormente, serviría para formar el núcleo de quinazolina mediante ciclocondensación con 4-fluoroanilina. El rendimiento fue de 81.6%. El R<sub>f</sub> obtenido fue de 0.73 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:20), mientras que el punto de fusión (pf) fue de 143-144 °C.



**Esquema 2. Síntesis del compuesto 2.**

### 7.2. Síntesis del compuesto 3

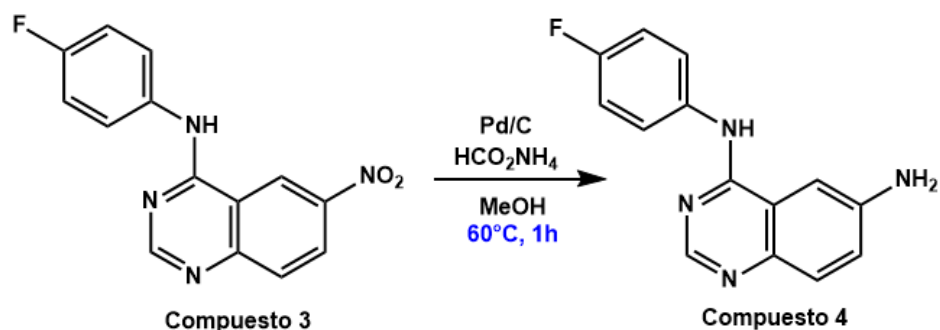
La síntesis consistió en una reacción de ciclocondensación entre el compuesto **2** y la 4-fluoroanilina. El mecanismo de esta ciclocondensación ha sido descrito anteriormente, en este se da la formación de una imina y la transformación se produce mediante la hidrólisis del anillo de pirimidina en el enlace C-N<sub>3</sub> con la subsecuente rotación de 180°C alrededor del enlace C<sub>10</sub>-C<sub>4</sub> y el cierre del anillo. (31) El rendimiento fue de 84.3%. El R<sub>f</sub> obtenido fue de 0.74 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:20), mientras que el punto de fusión (pf) fue de 270-271°C.



Esquema 3. Síntesis del compuesto 3.

### 7.3. Síntesis del compuesto 4

En este paso de la síntesis, se llevó a cabo una hidrogenación por transferencia catalizada por Pd/C. La hidrogenación por transferencia de compuestos con grupo nitro, para la obtención de la respectiva amina, se ha utilizado en las últimas décadas con éxito, en la obtención de productos farmacéuticos. (32) Entre los donadores de hidrógeno más comunes para este tipo de reacción, están el ciclohexeno, ciclohexadieno, ácido fosfínico, hidracina, ácido fórmico, formiato de sodio, formiato de amonio e hipofosfito de sodio; entre estos, se eligió al formiato de amonio dado que se descompone en H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y amoníaco, después de la reacción, que se puede lavar fácilmente a diferencia de, por ejemplo, el formiato de sodio que deja residuos de Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (33). La ventaja de utilizar Pd/C es que no requiere el uso de un gas inflamable como lo es el hidrógeno, ya que el formiato de amonio funge como donador de átomos de H. (32) El rendimiento de la reacción fue de 89.1%. El Rf obtenido fue de 0.42 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 70:30), mientras que el punto de fusión (pf) fue de 259-261 °C.

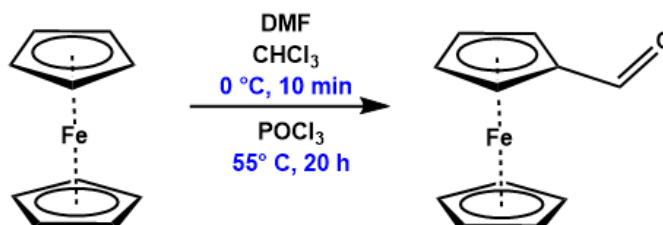


Esquema 4. Síntesis del compuesto 4.

### 7.4. Síntesis de FcCHO

En este paso, se llevó a cabo la formilación del ferroceno. Existen varias rutas para obtener formilferroceno. Una de ellas es la reacción de Vilsmeier de ferroceno con N-metilformanilida y cloruro de fosforilo. También se ha informado que el aldehído se podía preparar también con dimetilformamida y cloruro de fosforilo como reactivo de formilación, sin embargo, este método dio un rendimiento de tan solo 23%.

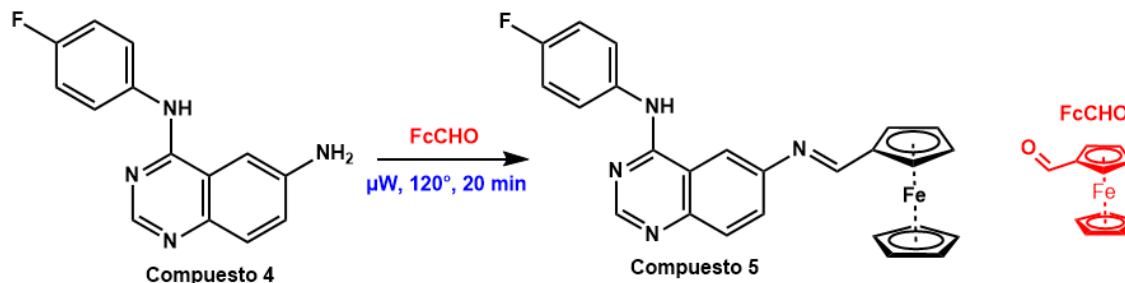
En este trabajo se utilizó el método de Vilsmeier modificado, utilizando dimetilformamida en lugar de *N*-metilformanilida (34). En esta modificación, se introdujo cloruro de fosforilo en una solución de cloroformo de la mezcla de ferroceno y dimetilformamida, para formar un complejo de Vilsmeier, que tras una cuidadosa neutralización con carbonato de sodio proporcionó el aldehído. El rendimiento fue de 32.1% dado que solo se realizaron 3 extracciones con éter.



Esquema 5. Síntesis del compuesto FcCHO.

### 7.5. Síntesis del compuesto 5

En este paso de la síntesis, ocurre una reacción de adición nucleofílica a carbonilo, en este caso al aldehído del formilferroceno. La formación de imina, entre el grupo amino en la posición 6 de la quinazolina y el formilferroceno, se logró en condiciones anhidras, empleando radiación de microondas como fuente de energía. El rendimiento de la reacción fue de 80.0%. El punto de fusión del compuesto 5 fue de 214-215 °C.

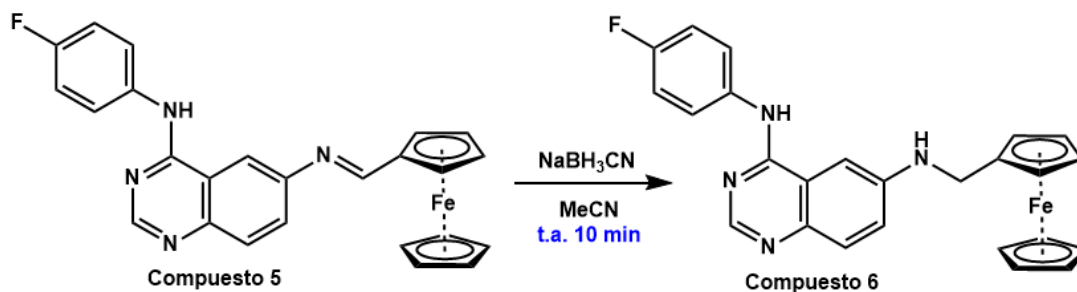


Esquema 6. Síntesis del compuesto 5.

### 7.6. Síntesis del compuesto 6.

Finalmente, la síntesis se completó formando el análogo del compuesto 5, que fue el compuesto 6, mediante una reacción de aminación reductora, utilizando cianoborohidruro de sodio como agente reductor en MeCN, que reduce la imina a amina, a temperatura ambiente. El rendimiento fue de 85.4%. El punto de fusión del compuesto 6 fue de 182-183 °C.



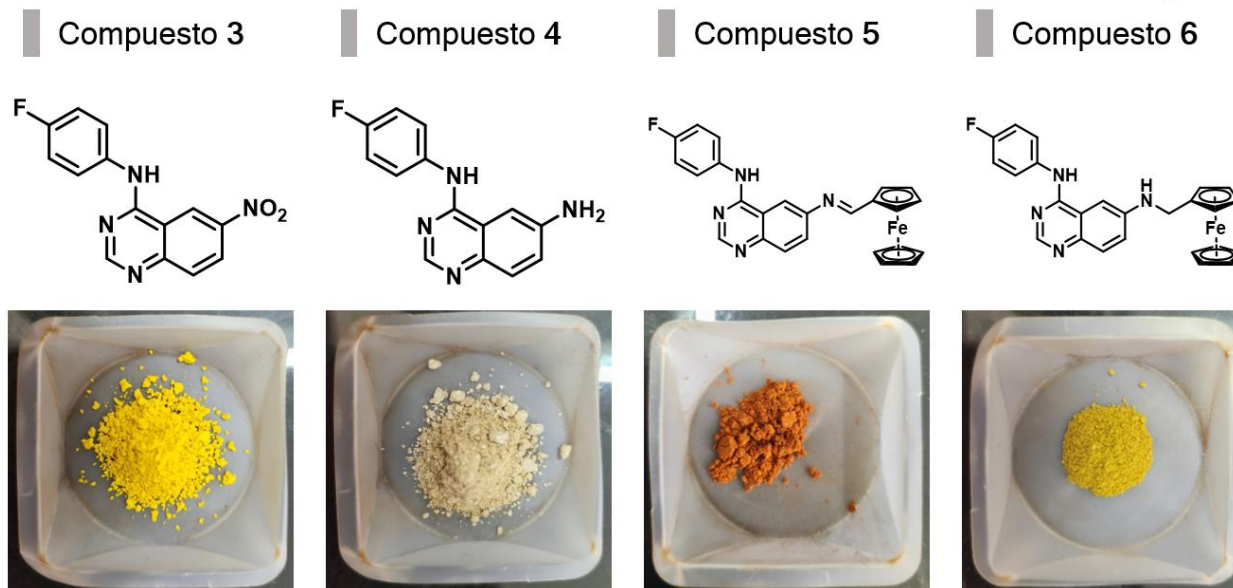


*Esquema 7. Síntesis del compuesto 6.*

### 7.7. Resumen de la síntesis del compuesto 5 y 6.

*Tabla 1. Características químicas de los compuestos 5 y 6.*

Compuesto	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	Rf (CHCl <sub>3</sub> /MeOH)
2	81.6	143-144	0.73 (80:20)
3	84.3	270-271	0.74 (80:20)
4	89.1	259-261	0.42 (70:30)
5	80.0	214-215	
6	85.4	182-183	
Rendimiento final: 48.21 %			

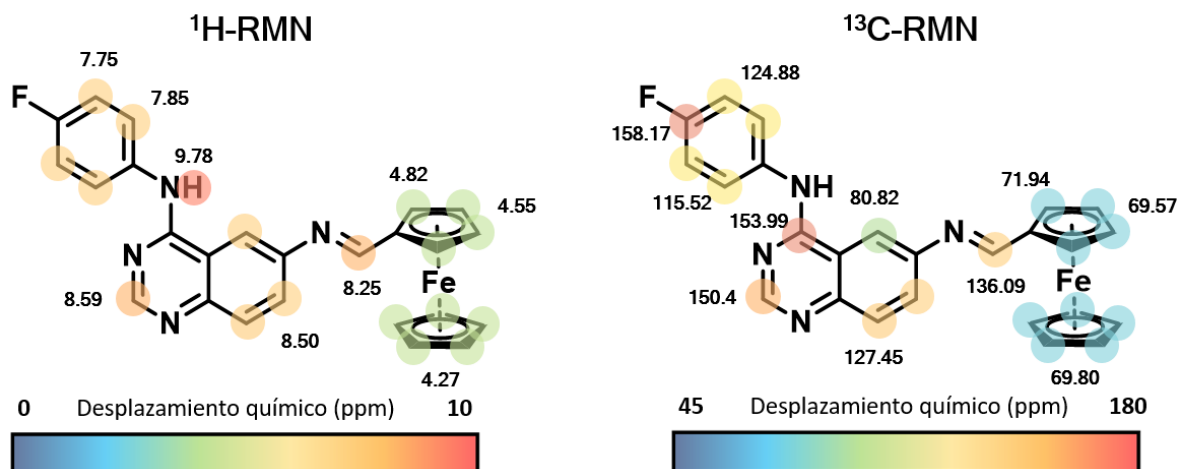


*Figura 18. Aspecto físico y estructura química de los compuestos 3-6.*

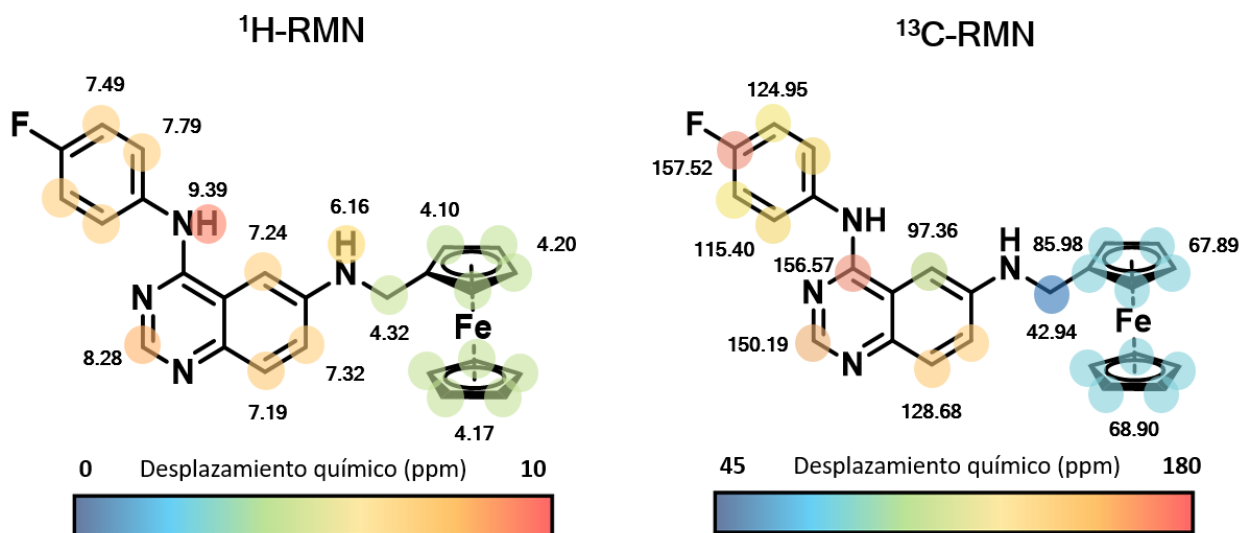
## 7.8. Técnicas analíticas avanzadas y caracterización molecular del compuesto 5 y 6.

Las técnicas utilizadas para la caracterización del compuesto 5 y 6, fueron espectrometría de masas con fuente de ionización APCI (**ANEXO 1**) y experimentos de resonancia magnética nuclear en (una dimensión) de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y también de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), (**ANEXO 1**).

En cuanto a las señales de RMN del compuesto 5 y 6, éstas son bastante similares dada su estructura. La **Figura 19** y **Figura 20** muestran señales de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos 5 y 6, respectivamente.



*Figura 19. Señales características de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN), con escala de 0-10 ppm, y señales obtenidas de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN), con escala de 45-180 ppm del compuesto 5.*



*Figura 20. Señales características de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN), con escala de 0-10 ppm, y señales obtenidas de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN), con escala de 45-180 ppm del compuesto 6.*

## 8. Ensayo de captura de radical anión superóxido

### 8.1. Metodología

Para este ensayo, se utilizó NBT como compuesto detector de anión superóxido. El NBT se reduce en presencia de anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) por la transferencia de un electrón, generando un precipitado de color negro azulado (formazán). (35)

#### 8.1.1. Determinación de los disolventes para el NBT y los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

Para este ensayo se realizaron pruebas de solubilidad del NBT en los siguientes disolventes: acetonitrilo (MeCN), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) y agua. Una vez encontrado el disolvente o mezcla de disolventes, se utilizaron estos mismos para realizar la prueba de solubilidad para los compuestos mencionados.

#### 8.1.2. Determinación de las concentraciones del NBT y de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

Para este experimento, se fijó primero una concentración de NBT de 10 mM. Para la realización de esta disolución, se pesaron 81.76 mg de NBT y se disolvieron en 10 mL de disolvente. Posteriormente, se prepararon las disoluciones *stock* de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** a una concentración establecida de 10 mM, teniendo 1 mL de disolución de cada compuesto.

#### 8.1.3. Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de anión superóxido (NBT y compuestos **5**, **6** y **gefitinib**).

Para determinar la concentración final en la placa de 96 pozos, se partió de las disoluciones *stock* de NBT y de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, y se realizaron experimentos cambiando las proporciones de NBT y de los compuestos para encontrar la óptima como se muestra en la **Tabla 2**. El volumen final en cada pozo fue de 200  $\mu\text{L}$ . La concentración ensayada de las disoluciones de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** es de 1 mM, y la concentración de NBT es de 10 mM.

**Tabla 2. Diseño experimental para el ensayo de captura de radical anión superóxido.**

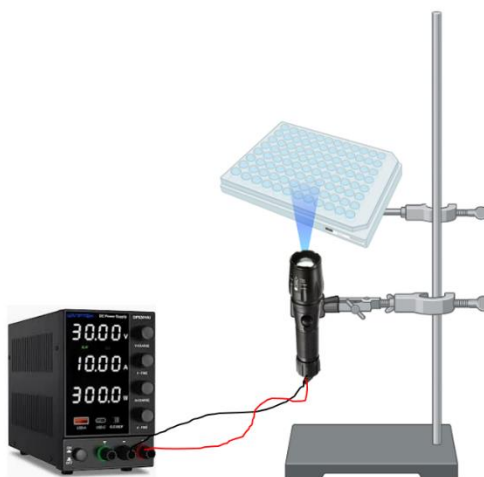
Volumen para adicionar ( $\mu\text{L}$ )		Concentración final del compuesto ( $\mu\text{M}$ )
<b>Compuesto 5</b>	<b>NBT</b>	
40	160	200
80	120	400
120	80	600
160	40	800
<b>Compuesto 6</b>	<b>NBT</b>	
40	160	200
80	120	400
120	80	600
160	40	800
<b>Gefitinib</b>	<b>NBT</b>	
40	160	200
80	120	400
120	80	600
160	40	800

### 8.1.1. Establecimiento de dosis lumínica o fluencia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Para este experimento, se utilizó como fuente de luz una linterna LED azul de 460 nm con 3.7 V, la cual fue adaptada para funcionar con corriente eléctrica directa en lugar de baterías, para eliminar fluctuaciones de energía. La linterna LED fue conectada a una fuente de alimentación de CC variable, ajustado la intensidad de corriente a 1 A y la potencia eléctrica a 3 W. Una vez realizado este ajuste, se midió la irradiancia de la linterna con un medidor, y se registró este dato para los cálculos posteriores. El medidor de irradiancia posee unidades en  $\text{W}/\text{cm}^2$ , mientras que las unidades de dosis lumínica o fluencia son  $\text{J}/\text{cm}^2$ . De esta manera, mientras más tiempo se expongan los compuestos a la luz de la linterna, la dosis lumínica aumentará mientras la irradiancia se mantiene constante. Se establecieron distintos intervalos de dosis lumínica, empezando en  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$  aumentando de 5 en 5 unidades hasta llegar a  $75 \text{ J}/\text{cm}^2$ , de esta manera, se fueron calculando los minutos necesarios para llegar a cada dosis, los cuales se obtienen de dividir la dosis lumínica sobre la irradiancia.

### 8.1.2. Disposición de la placa e irradiación de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

Una vez establecida la concentración de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, la concentración de NBT y las dosis lumínicas, se procedió a realizar la irradiación de los compuestos con la linterna LED, el arreglo final se muestra en la **Figura 21**.



*Figura 21. Disposición de la lámpara LED para la irradiación de las placas de 96 pozos.*

Cada ensayo para cada compuesto se realizó por triplicado, en los intervalos de tiempo establecidos. Una vez que se cumplió el primer tiempo para la primera dosis lumínica, la placa de 96 pozos se introdujo en un espectrofotómetro de placas y se realizó una lectura de los pozos seleccionados a una longitud de onda de 525 nm y se registraron los 3 datos. Posteriormente, se volvió a irradiar la placa para cumplir con el tiempo establecido para la segunda dosis lumínica y así sucesivamente, hasta llegar a la última dosis lumínica de  $75 \text{ J}/\text{cm}^2$ .

## 8.2. Resultados y discusión

### 8.2.1. Determinación de los disolventes para el NBT y los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

En el caso del NBT se determinó que el disolvente en el experimento fuese una mezcla 1:1 de DMF y agua. Para el caso de los compuestos se utilizó como disolvente dimetilformamida para la disolución *stock* de 10 mM.

### 8.2.2. Determinación de las concentraciones del NBT y de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

La concentración de NBT utilizada fue de 10 mM, mientras que la concentración de la disolución *stock* de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** fue de 10 mM. De estas disoluciones *stock*, se obtuvieron las disoluciones "B" de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, con una concentración de 1 mM.

### 8.2.3. Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de anión superóxido (NBT y compuestos **5**, **6** y **gefitinib**).

Una vez realizado los experimentos como se marca en la **Tabla 3**, las proporciones óptimas para el ensayo de captura de radical superóxido fueron las que describen a continuación:

**Tabla 3. Condiciones experimentales para el ensayo de captura de radical superóxido.**

Volumen para adicionar ( $\mu\text{L}$ )		Concentración final del compuesto ( $\mu\text{M}$ )
Compuesto <b>5</b>	NBT	
160	40	800
Compuesto <b>6</b>	NBT	
160	40	800
Gefitinib	NBT	
160	40	800

### 8.2.4. Establecimiento de dosis lumínica o fluencia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Una vez ajustados los valores de intensidad de corriente a 1 A, la tensión eléctrica a 3 V y la potencia eléctrica a 3 W con ayuda de la fuente de alimentación, se midió la irradiancia de la linterna LED, el valor obtenido fue de  $0.15 \text{ W}/\text{cm}^2$ . Una vez obtenido este valor, se calcularon los minutos necesarios para llegar a las dosis lumínicas establecidas en cada intervalo, empezando en  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$  aumentando de 5 en 5 unidades hasta llegar a  $75 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Los tiempos calculados se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Dosis lumínicas y su tiempo de irradiación para el ensayo de captura de radical superóxido.**

Dosis (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	Dosis (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	Dosis (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)
5	0.6	30	3.3	55	6.1
10	1.1	35	3.9	60	6.7
15	1.7	40	4.4	65	7.2
20	2.2	45	5.0	70	7.8
25	2.8	50	5.6	75	8.3

#### 8.2.5. Disposición de la placa e irradiación de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

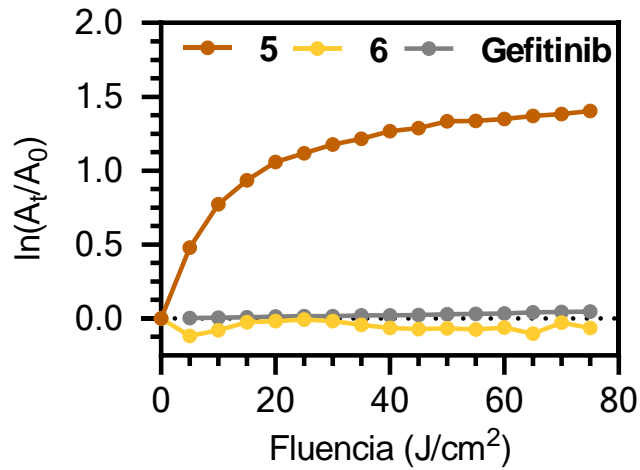
La intensidad del formazán formado, es directamente proporcional a la concentración de anión superóxido presente en la mezcla de reacción. Se utilizó la siguiente ecuación para proporcionar un análisis cuantitativo de la generación de anión superóxido en comparación con las condiciones iniciales en ausencia de exposición a la luz:

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = \ln A_t - \ln A_0$$

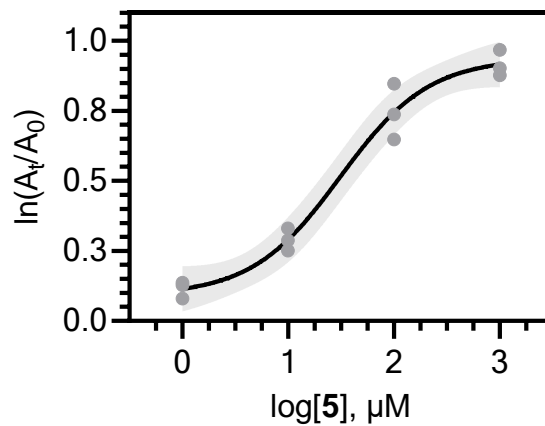
Donde  $A_t$  es la absorbancia en un punto de energía específico y  $A_0$  es la absorbancia inicial sin exposición a la luz. Esta ecuación permite la cuantificación precisa de la producción de anión superóxido a una energía específica, ya que se toma en cuenta la concentración de anión superóxido medida sin exposición a la luz (0 J/cm<sup>2</sup>).

Como se muestra en la **Gráfica 1**, el compuesto **5** produce tal cantidad de radical superóxido que logra reducir al NBT, que puede leerse a 525 nm, comparado con los compuestos **6** y **gefitinib**, que no generan radical superóxido. Dicha producción de esta ROS, alcanza un nivel estable a la dosis lumínica o fluencia de 75 J/cm<sup>2</sup>, de hecho, el crecimiento puede verse como una especie de curva sigmoidea, en donde al inicio, el crecimiento se desarrolla de forma cuasi exponencial y posteriormente, al irse descomponiendo el compuesto **5**, la tasa de crecimiento disminuye alcanzando una meseta. Dados los resultados, se espera que en los ensayos posteriores ni el compuesto **6** ni el **gefitinib** sean capaces de generar otro tipo de ROS, por lo tanto, también se espera que no repercutan en la viabilidad celular una vez que éstos sean irradiados. En este punto, el compuesto **6** se descarta para los siguientes experimentos, utilizando solamente el control positivo para las líneas celulares (**gefitinib**) y el compuesto **5**. Reconociendo la importancia de mantener la uniformidad en experimentos posteriores, se eligió el valor energético de 75 J/cm<sup>2</sup> como punto de referencia para futuras investigaciones y evaluaciones. Los experimentos de control mostraron que la formación de ROS del compuesto **5** es exclusiva de la excitación de luz a 460 nm. El compuesto **6** y **gefitinib** produjeron pocos radicales de anión superóxido durante los períodos generales de exposición. Con base en esta información, se realizaron otras pruebas para investigar cómo el cambio de la concentración del fotosensibilizador afectaba la cantidad de anión superóxido formada.

Irradiando el fotosensibilizador con luz de 460 nm a una energía de 75 J/cm<sup>2</sup>, el experimento tuvo como objetivo dilucidar el efecto de la concentración del fotosensibilizador sobre la producción de radicales de anión superóxido. Los resultados obtenidos de esta configuración experimental arrojaron un gráfico sigmoidal, que proporciona información valiosa sobre el efecto acumulativo de la producción de anión superóxido (**Gráfica 2**), con una concentración de acumulación máxima de aproximadamente 31 µM.



Gráfica 1. Absorbancia del formazán obtenido dada la producción de radical superóxido, en función de la fluencia.

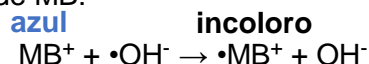


Gráfica 2. Compuesto 5 al ser irradiado con una luz de 460 nm a una energía de 75 J/cm<sup>2</sup>.

## 9. Ensayo de captura de radical hidroxilo

### 9.1. Metodología

Para este ensayo se utilizó como compuesto detector de radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}^-$ ) al azul de metileno (MB). Esta es una prueba que indica cuantitativamente la presencia de radicales hidroxilos mediante un blanqueo inmediato y distintivo del MB (36). En la prueba de MB, el radical hidroxilo reacciona con el catión de MB para producir un ion hidróxido y un catión radical de MB:



Dado que el catión de MB es de color azul oscuro y el catión radical MB es incoloro, la aplicación de una muestra que contiene radicales hidroxilos al MB produce un cambio de color de azul oscuro a incoloro.

#### 9.1.1. Determinación de los disolventes para el MB y los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

Para este ensayo se realizaron pruebas de solubilidad del MB en los siguientes disolventes: MeCN, DMF, DMSO y agua. Una vez encontrado el disolvente o mezcla de disolventes, se utilizaron estos mismos disolventes para realizar la prueba de solubilidad para los compuestos.

#### 9.1.2. Determinación de las concentraciones del MB y de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

Para este experimento, se fijó primero una concentración de MB de 10 mM. Para la elaboración de esta disolución, se pesaron 31.98 mg de MB y se disolvieron en 10 mL de disolvente. Posteriormente, se prepararon las disoluciones *stock* de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** a una concentración establecida de 10 mM, teniendo 1 mL de disolución de cada compuesto.

#### 9.1.3. Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de radical hidroxilo (MB y compuestos **5**, **6** y **gefitinib**).

Para determinar la concentración final en la placa de 96 pozos para el ensayo de captura de radical hidroxilo, ya teniendo las disoluciones *stock* de MB y de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, se realizaron experimentos cambiando las proporciones de MB y de los compuestos para encontrar la óptima, como se muestra en la **Tabla 5**. El volumen final en cada pozo fue de 200  $\mu\text{L}$ . La concentración de las disoluciones de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** es de 1 mM, y la concentración de MB es de 10 mM.



**Tabla 5. Diseño experimental para el ensayo de captura de radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).**

Volumen para adicionar ( $\mu\text{L}$ )		Concentración final del compuesto ( $\mu\text{M}$ )
<b>Compuesto 5</b>	<b>MB</b>	
40	160	200
80	120	400
120	80	600
160	40	800
<b>Compuesto 6</b>	<b>MB</b>	
40	160	200
80	120	400
120	80	600
160	40	800
<b>Gefitinib</b>	<b>MB</b>	
40	160	200
80	120	400
120	80	600
160	40	800

#### 9.1.4. Establecimiento de dosis lumínica o fluencia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Para este experimento, se utilizó como fuente de luz una linterna LED azul de 460 nm con 3.7 V, la cual fue adaptada para funcionar con corriente eléctrica directa en lugar de baterías, para eliminar fluctuaciones de energía. La linterna LED fue conectada a una fuente de alimentación de CC variable, ajustando la intensidad de corriente a 1 A y la potencia eléctrica a 3 W. Una vez realizado este ajuste, se midió la irradiancia de la linterna con un medidor, y se registró este dato para los cálculos posteriores. El medidor de irradiancia posee unidades en  $\text{W}/\text{cm}^2$ , mientras que las unidades de dosis lumínica o fluencia son  $\text{J}/\text{cm}^2$ . De esta manera, mientras más tiempo se expongan los compuestos a la luz de la linterna, la dosis lumínica aumentará mientras la irradiancia se mantiene constante. Se establecieron distintos intervalos de dosis lumínica, empezando en  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$  aumentando de 5 en 5 unidades hasta llegar a  $75 \text{ J}/\text{cm}^2$ , de esta manera, se fueron calculando los minutos necesarios para llegar a cada dosis, los cuales se obtienen de dividir la dosis lumínica sobre la irradiancia.

#### 9.1.5. Disposición de la placa e irradiación de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** (experimento sin $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Una vez establecida la concentración de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, la concentración de MB y las dosis lumínicas, se procedió a realizar la irradiación de los compuestos con la linterna LED, el arreglo final se muestra en la **Figura 21**.

Cada ensayo para cada compuesto se realizó por triplicado, en los intervalos de tiempo establecidos. Una vez que se cumplió el primer tiempo para la primera dosis lumínica, se realizó una lectura espectrofotométrica, de los pozos seleccionados, a una longitud de onda de 635 nm y se registraron los 3 datos. Posteriormente se volvió a irradiar la placa para cumplir con el tiempo establecido para la segunda dosis lumínica y así sucesivamente, hasta llegar a la última dosis lumínica.

9.1.6. Disposición de la placa e irradiación de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** (experimento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Una vez establecida la concentración de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, la concentración de MB y las dosis lumínicas, se procedió a realizar la irradiación de los compuestos con la linterna LED.

Cada ensayo para cada compuesto se realizó por triplicado, a los intervalos de tiempo establecidos. Una vez que se cumplió el primer tiempo para la primera dosis lumínica, la placa de 96 pozos se introdujo en un espectrofotómetro placas y se realizó una lectura de los pozos seleccionados a 635 nm y se registraron los 3 datos, posteriormente, se volvió a irradiar la placa para cumplir con el tiempo establecido para la segunda dosis lumínica y así sucesivamente, hasta llegar a la última dosis lumínica.

## 9.2. Resultados y discusión

### 9.2.1. Determinación de los disolventes para el MB y los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

En el caso del MB se determinó que el disolvente en el experimento fuese una mezcla 1:1 de dimetilformamida y agua. Para el caso de los compuestos se utilizó como disolvente dimetilformamida para la disolución *stock* de 10 mM.

### 9.2.2. Determinación de las concentraciones del MB y de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**.

La concentración de MB utilizada fue de 10 mM, mientras que la concentración de la disolución *stock* de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib** fue de 10 mM. De estas disoluciones *stock*, se obtuvieron las disoluciones "B" de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, con una concentración de 1 mM.

### 9.2.3. Determinación del contenido de cada pozo para el ensayo de captura de radical hidroxilo (MB y compuestos **5**, **6** y **gefitinib**).

Una vez realizado los experimentos como se marca en la **Tabla 6**, las proporciones óptimas para el ensayo de captura de radical hidroxilo fueron las que describen a continuación:

**Tabla 6.** Condiciones experimentales para el ensayo de captura de radical hidroxilo.

Volumen para adicionar (µL)		Concentración final del compuesto (µM)
Compuesto <b>5</b>	NBT	
160	40	800
Compuesto <b>6</b>	NBT	
160	40	800
Gefitinib	NBT	
160	40	800

#### 9.2.4. Establecimiento de dosis lumínica o fluencia (J/cm<sup>2</sup>).

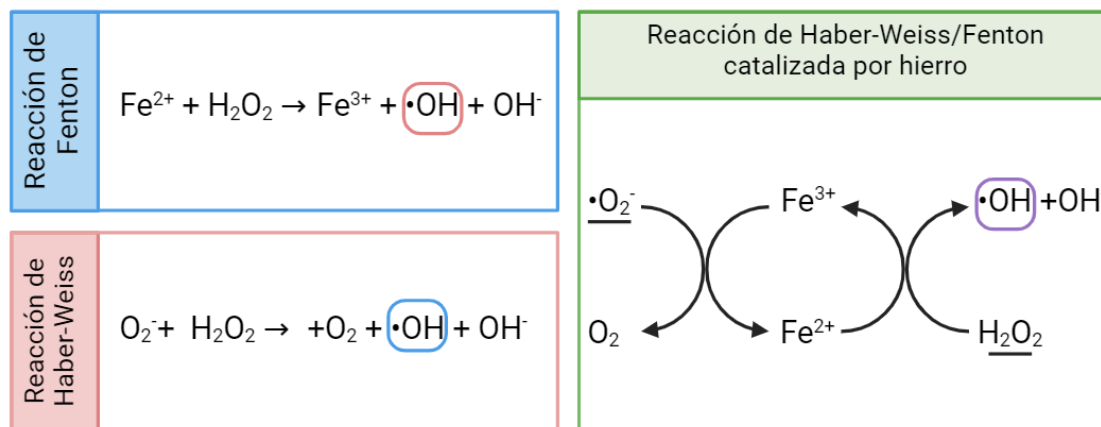
Una vez ajustados los valores de intensidad de corriente a 1 A, la tensión eléctrica a 3 V y la potencia eléctrica a 3 W, con ayuda de la fuente de alimentación, se midió la irradiancia de la linterna LED, el valor obtenido fue de 0.15 W/cm<sup>2</sup>. Una vez obtenido este valor, se calcularon los minutos necesarios para llegar a las dosis lumínicas establecidas en cada intervalo, empezando en 5 J/cm<sup>2</sup>, aumentando de 5 en 5 unidades hasta llegar a 75 J/cm<sup>2</sup>. Los tiempos calculados se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Dosis lumínicas y su tiempo de irradiación para el ensayo de captura de radical hidroxilo.

Dosis (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	Dosis (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	Dosis (J/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)
5	0.6	30	3.3	55	6.1
10	1.1	35	3.9	60	6.7
15	1.7	40	4.4	65	7.2
20	2.2	45	5.0	70	7.8
25	2.8	50	5.6	75	8.3

#### 9.2.5. Disposición de la placa e irradiación de los compuestos **5**, **6** y **gefitinib**, experimento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Este experimento resultó útil para comprender el proceso y características de la descomposición del compuesto **5**, asociadas con la formación del catión ferrocinio después de la irradiación de luz y su posterior descomposición en Fe<sup>2+</sup>, un fragmento de ciclopentadienilo y el resto de quinazolina unida al otro ciclopentadienilo. Este proceso de descomposición ocurre en dos reacciones acopladas: la reacción de Fenton y la reacción de Haber-Weiss. La reacción de Fenton involucra peróxido de hidrógeno y Fe<sup>2+</sup>, para generar radicales hidroxilos, mientras que la reacción de Haber-Weiss involucra la reacción del anión superóxido y peróxido de hidrógeno, para generar oxígeno molecular y radical hidroxilo (**Figura 22**). Ambas reacciones desempeñan papeles importantes en la producción de ROS (37) y se sabe que contribuyen a la actividad fotodinámica general, observada en nuestro sistema experimental.



**Figura 22.** Integración de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

Estas reacciones vinculadas enfatizan el potencial del compuesto **5** obtenido para el tratamiento fotodinámico dirigido a un sitio particular.

Para la identificación de los radicales hidroxilos, se empleó el método de blanqueo con azul de metileno. Cuando hay radicales hidroxilos, el azul de metileno se degrada y pierde su color azul. Esta degradación se nota por la disminución de la absorbancia a 635 nm. Al monitorear los cambios en la absorbancia antes y después de la irradiación de luz, determinamos la formación y reactividad de los radicales hidroxilos durante el experimento. Se llevaron a cabo dos sistemas de reacción para probar esta teoría. En un intento por aprender más sobre la propensión de la molécula a reacciones de tipo Fenton, que producen especies reactivas como los radicales hidroxilos, se añadió peróxido de hidrógeno a la reacción inicial. Esto se logró cuando la sustancia química experimentó una reacción de Haber-Weiss cuando se expuso a la luz para formar  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de  $\text{Fe}^{3+}$ . Por el contrario, la segunda reacción se llevó a cabo sin peróxido de hidrógeno, para evaluar la necesidad de este reactivo, para generar las especies reactivas requeridas para la degradación del azul de metileno.

Para cuantificar indirectamente la formación de radicales hidroxilos, mediante el blanqueo del azul de metileno, se empleó la siguiente ecuación:

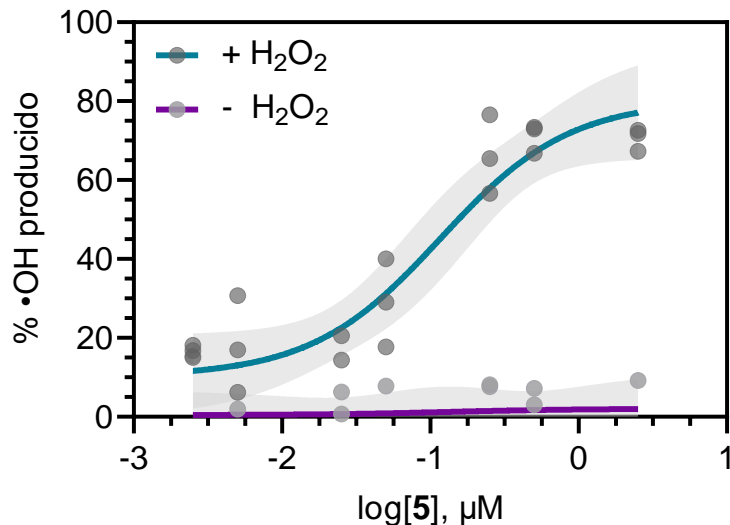
$$\% \bullet OH \text{ producido} = \frac{100}{A_0} (A_0 - A_i)$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia a 635 nm de cada muestra antes de la exposición a la luz y  $A_i$  es la absorbancia final de cada muestra después de la exposición a la luz. Los resultados proporcionan evidencia convincente de que la degradación observada del fotosensibilizador, el compuesto **5**, se correlaciona directamente con la producción de radicales hidroxilos. A medida que aumenta la concentración del compuesto **5**, se observa un comportamiento sigmoideo similar al observado en el ensayo de captura de radical anión superóxido anterior (**Gráfica 2**). Esta tendencia sigmoidea sugiere un efecto acumulativo, donde concentraciones más altas del compuesto **5** dan como resultado una generación amplificada de radicales hidroxilos.

Las condiciones experimentales demostraron que, aproximadamente el 75% de la formación de radicales hidroxilos, se logró con la concentración más alta, como se puede notar en la **Gráfica 3**. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la degradación del fotosensibilizador juega un papel fundamental en la producción de especies reactivas en presencia de peróxido de hidrógeno.

Por otra parte, la ausencia de peróxido de hidrógeno en el medio de reacción dio como resultado una degradación insignificante del azul de metileno, como se muestra en la **Gráfica 3**. Esta observación subraya aún más el papel crucial del peróxido de hidrógeno como componente crítico en la promoción del proceso de degradación. Sin peróxido de hidrógeno, no se cumplieron las condiciones necesarias para generar especies reactivas, como los radicales hidroxilos, lo que provocó una degradación mínima del azul de metileno.

Estos hallazgos resaltan la contribución esencial del peróxido de hidrógeno para facilitar la vía de degradación y enfatizan su importancia para mejorar el potencial citotóxico de nuestro fotosensibilizador en ambientes intracelulares, donde el peróxido de hidrógeno sirve como una fuente crucial de estrés oxidativo.



Gráfica 3. Producción de radical hidroxilo por el compuesto 5.

## 10. Ensayo de viabilidad celular

### 10.1. Metodología

La metodología descrita en este apartado se realizó tanto para conocer los efectos sobre la viabilidad celular de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib** en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.

#### 10.1.1. Solubilidad de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib**.

*Disolución de los compuestos en medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con SFB.* Cada uno de los compuestos se intentó disolver en 4 mL, para llegar a una concentración final de 10 mM después de la disolución. Ninguno de los compuestos logró solubilizarse después de 2 ciclos de media hora en un sonicador. Por lo tanto, se prosiguió con la elección de un disolvente que cumpliera con la función de vehículo de los compuestos.

*Selección del disolvente (vehículo).* Entre los disolventes más utilizados en los ensayos de viabilidad celular como vehículos, se encuentran dimetilsulfóxido (DMSO), etanol y metanol (38). Se determinó que la concentración de la disolución stock fuese de 20 mM, para las diluciones posteriores. Se pesó por triplicado, 9.7 mg del compuesto **5**, 4.3 mg del compuesto **FcCHO** y 9.0 mg de **gefitinib**, posteriormente se intentó disolver estos compuestos en 1 mL de DMSO, etanol y metanol, como se esquematiza en la **Figura 23**.

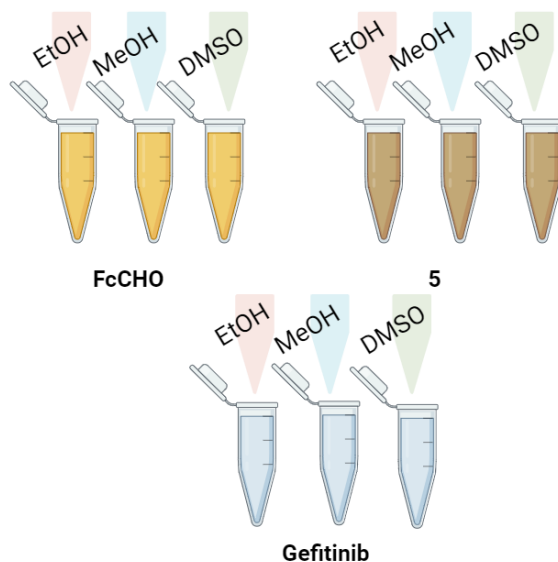


Figura 23. Prueba de solubilidad de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.

#### 10.1.2. Filtración de los compuestos 5, FcCHO y gefitinib para esterilizar.

Una vez teniendo 1 mL de la disolución stock de los tres compuestos, se tomó con una jeringa 0.5 mL de cada disolución y este volumen se transfirió a otro tubo eppendorf.

Los 0.5 mL de disolución de cada compuesto, se hicieron pasar por un filtro para esterilizar. Se tomó aproximadamente 4  $\mu$ L de cada disolución con una micropipeta, que se colocaron para su análisis en un espectrofotómetro de microvolumen *NanoDrop*, como se muestra en la **Figura 24**. De esta manera, se comparó el espectro de cada disolución antes y después de ser filtrada.

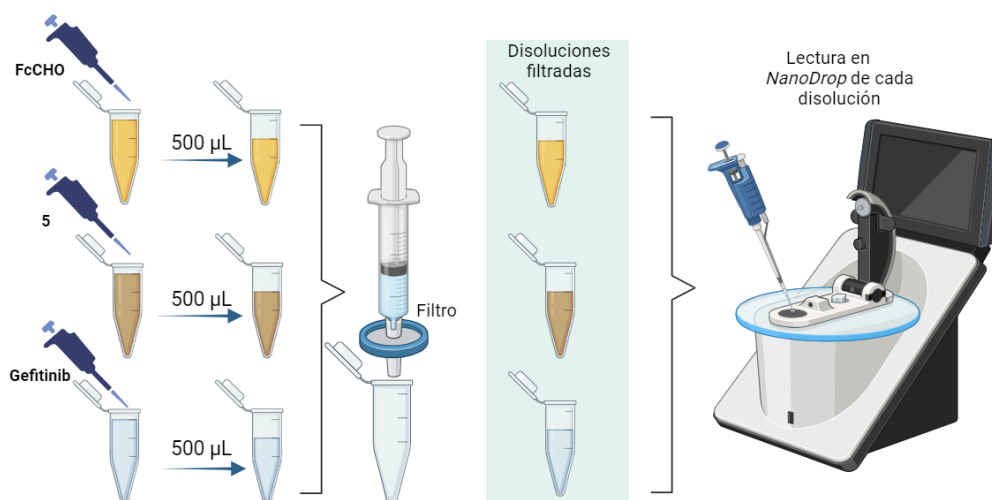


Figura 24. Determinación de espectros de UV-Vis antes y después de filtrar las disoluciones de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.

### 10.1.3. Determinación del efecto del vehículo (DMSO), en la línea celular MCF-7.

Se utilizó una placa de 96 pozos estéril para determinar el efecto del vehículo (DMSO) sobre la viabilidad celular con la prueba de MTT (**ANEXO 2**). En la placa se colocaron 7,000 células por pozo, con un volumen de 100  $\mu$ L.

Cada prueba se realizó por cuadruplicado, y se inició con un porcentaje de 0.8% de DMSO, luego de 0.4%, 0.2% y así sucesivamente hasta llegar a 0.00156%.

La metodología para la descongelación de las células, cuenta celular, tripsinización y mantenimiento de las células se encuentra en **ANEXO 2**.

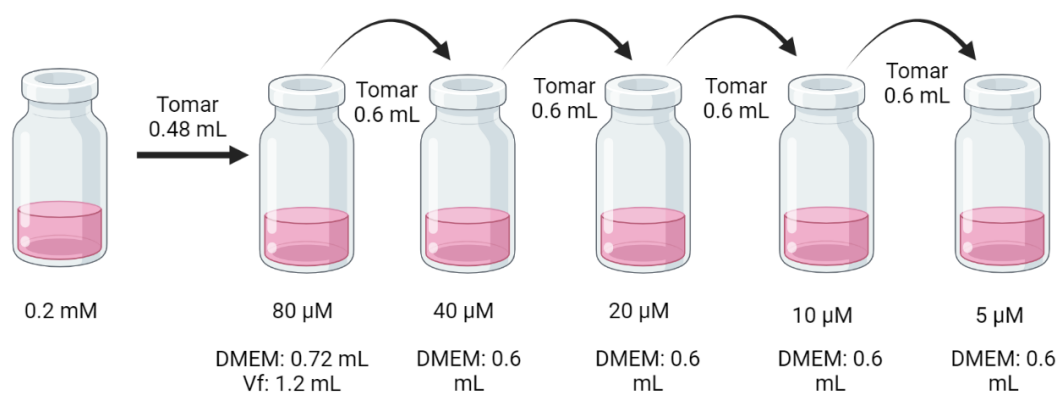
Se siguió el mismo procedimiento para la línea celular HaCaT.

### 10.1.4. Determinación de la concentración de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib** para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7.

Una vez lograda la solubilidad de los compuestos en el medio y establecido un intervalo de porcentaje del vehículo para que pueda utilizarse con seguridad, se procedió a realizar diluciones de la disolución *stock* de cada uno de los compuestos, para determinar la concentración más óptima que se usará en los siguientes experimentos. En una placa de 96 pozos, se colocaron 7,000 células por pozo, con un volumen de 100  $\mu$ L.

Se realizó por cuadruplicado el experimento para cada concentración empezando con 80  $\mu$ M, luego 40  $\mu$ M, y así sucesivamente, hasta llegar a 5  $\mu$ M; para los compuestos **5**, **gefitinib** y **FcCHO** como se muestra en la **Figura 25**. Se determinó que el volumen final fuese de 0.6 mL para cada concentración, ya que la determinación de viabilidad celular se realizó por cuadruplicado y, si en cada pozo se colocan 100  $\mu$ L, entonces se requieren 400  $\mu$ L por cada concentración.

Se siguió el mismo procedimiento para la línea celular HaCaT.



**Figura 25. Disoluciones de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.**

#### 10.1.5. Determinación del número de células por pozo para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7.

El ensayo para determinar el número de células se basó en datos de varios autores (39–41) donde se utilizaban de 1,100 a 10,000 células por pozo. Para el primer experimento se utilizaron 7,000 células, después 1,000 células por pozo y finalmente 3,000 células. Comprendiendo un total de 3 experimentos. Se utilizaron las concentraciones establecidas en **10.1.4**, para realizar la prueba de MTT.

Este procedimiento se realizó también en la línea celular HaCaT.

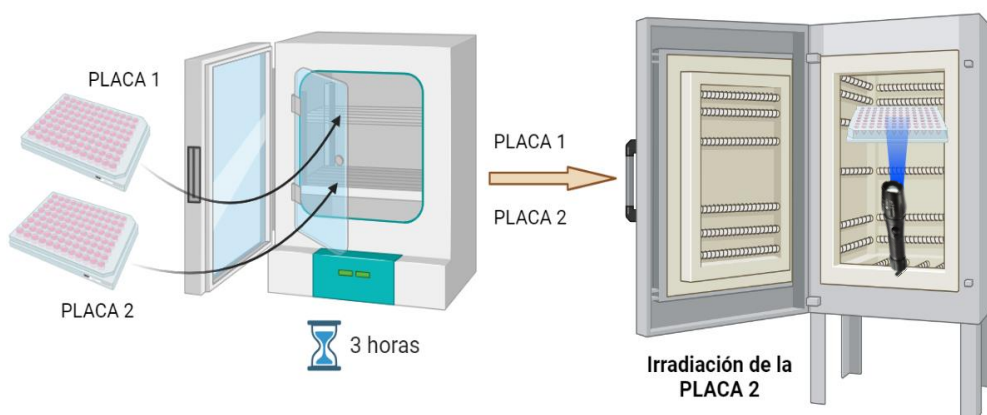
#### 10.1.6. Experimento de exposición a luz de 460 nm (terapia fotodinámica) en la línea celular MCF-7 y HaCaT.

Una vez establecida la concentración de las moléculas a ensayar y el número de células por pozo, se procedió a realizar el experimento con luz. Se utilizaron dos placas por ensayo. Una de ellas fue irradiada con la luz, mientras que la segunda no fue sometida a fuente de irradiación.

Una vez que se les agregaron los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib** a las placas 1 y 2, estas se incubaron a 37 °C, durante 3 horas. Pasado ese tiempo, ambas placas se sacaron de la incubadora y la placa 2 fue sometida a irradiación lumínica, recibiendo una dosis lumínica o fluencia de 75 J/cm<sup>2</sup> (este valor de fluencia se utilizó basándose en experimento de ensayo de captura de radical anión superóxido) a una longitud de onda de 460 nm, como se muestra en la **Figura 26**.

Pasado ese tiempo, ambas placas se colocaron nuevamente en la incubadora durante 21 horas. Al finalizar el experimento, se realizó la prueba de MTT para ambas placas.

Este procedimiento se realizó también en la línea celular HaCaT.



**Figura 26.** Diseño experimental y tiempos de incubación para posterior irradiación.



## 10.2. Resultados y discusión

### 10.2.1. Solubilidad de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib**.

Para la elección del vehículo se había planteado utilizar etanol, metanol o DMSO. Los compuestos **5** y **FcCHO** se disolvieron perfectamente en el metanol y etanol, pero este no fue el caso para **gefitinib**, ya que no se logró su disolución total en esos disolventes. Por este motivo, etanol y metanol se descartaron como vehículos posteriores. En cambio, los tres compuestos se lograron disolver en DMSO, por que se eligió como vehículo para los experimentos posteriores.

Cabe destacar que la concentración final de DMSO, en experimentos de viabilidad celular, debe ser menor al 0.6% para evitar la inhibición de la proliferación celular a causa del disolvente. (38)

Con respecto a la solubilidad, el compuesto **5** mostró un mejor perfil, fue posible disolverlo en etanol, contrariamente el **gefitinib**, que es un fármaco utilizado actualmente en la terapia contra el cáncer, no se disuelve en etanol. Esta información es útil para estudios posteriores de formulación farmacéutica.

### 10.2.2. Filtración de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib** para esterilizar.

Los espectros de las disoluciones stock de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib** son iguales para cada disolución filtrada y no filtrada, es decir, no hay diferencias entre ambos espectros. Se infiere que el filtro disponible no retiene a ninguno de los compuestos y se confirma que no se modifica la concentración de dichos compuestos al hacerlos pasar por el filtro.

Para poder utilizar los compuestos en líneas celulares, estos deben estar completamente disueltos en el vehículo seleccionado. A su vez, cuando la disolución *stock* se incorpora al medio de cultivo empleado, no debe ocurrir precipitación o formación de agregados. Esta condición se procuró para los tres compuestos, como se muestra en la **Figura 27**. La concentración de la disolución *stock* se determinó que fuese 20 mM, mientras que la disolución incorporada con el medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con SFB, se determinó que fuese de 0.2 mM para el caso de los tres compuestos.

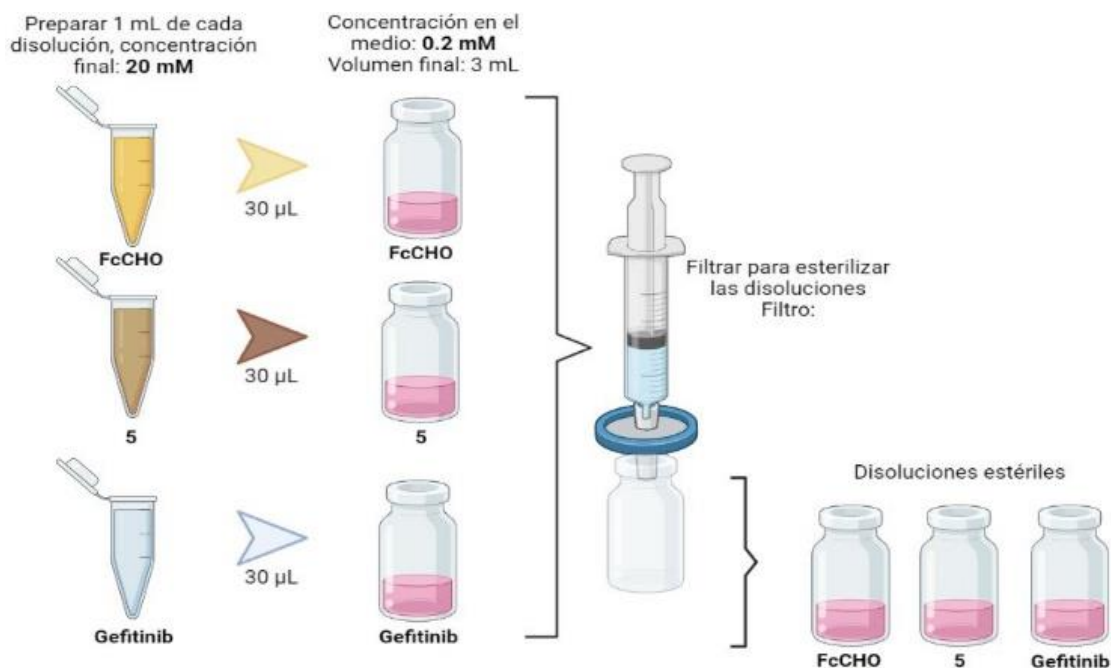


Figura 27. Filtración de las disoluciones en medio DMEM de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO.

#### 10.2.3. Determinación del efecto del vehículo (DMSO) en la línea celular MCF-7.

Al término del tratamiento de los datos, se concluyó que ningún porcentaje de DMSO, en el intervalo estudiado (0.8%- 0.00156%), es citotóxico para las células de la línea MCF-7 y HaCaT, por lo que puede utilizarse en las pruebas posteriores.

#### 10.2.4. Determinación de la concentración de los compuestos 5, FcCHO y gefitinib para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7.

En este experimento se buscó una concentración en la que la actividad del compuesto 5 y del **gefitinib** (control positivo) sea equiparable. En ninguna de las concentraciones se obtuvieron valores mayores al 15% de inhibición, para alguno de los tres compuestos. En este punto se planteó cambiar las concentraciones o la cantidad de células por pozo, pero el primer paso fue intentar con un número distinto de células.

#### 10.2.5. Determinación del número de células por pozo para el ensayo de viabilidad celular en la línea MCF-7.

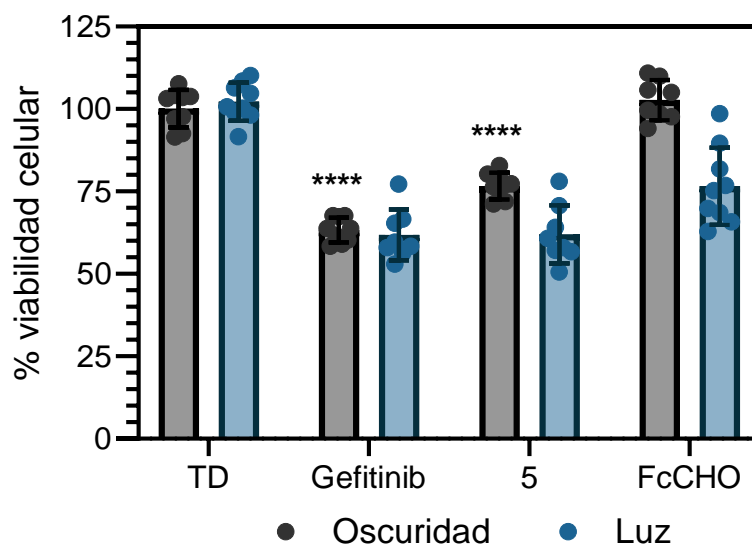
Se repitió el experimento con 7,000 células por pozo, sin obtener los resultados esperados. Posteriormente, en el experimento de 1,000 células se determinó que era un bajo número de células, por lo que en el tratamiento de datos al restar el valor promedio del blanco, se obtenían valores negativos de viabilidad celular. Finalmente, se eligió el valor de 3,000 células por pozo, al estar entre 1,000 y 7,000 células por pozo. En este experimento se buscó encontrar una concentración en la que la actividad del compuesto 5 y del **gefitinib** (control positivo) fuese equiparable.

En la única concentración que se encontró una inhibición celular similar entre el compuesto **5** y del **gefitinib** fue en la concentración de 80  $\mu\text{M}$ , ya que mientras con esta concentración el gefitinib inhibió un 40.25% la viabilidad celular, el compuesto 5 inhibió el 38.26%. En cuanto a la línea celular HaCaT, el experimento se repitió con 7,000 células, pero al encontrar el número de células óptimas para la línea celular de cáncer de mama, se trabajó con 3,000 células en la línea celular HaCaT.

#### 10.2.6. Experimento de exposición a luz de 460 nm (terapia fotodinámica) en la línea celular MCF-7 y HaCaT.

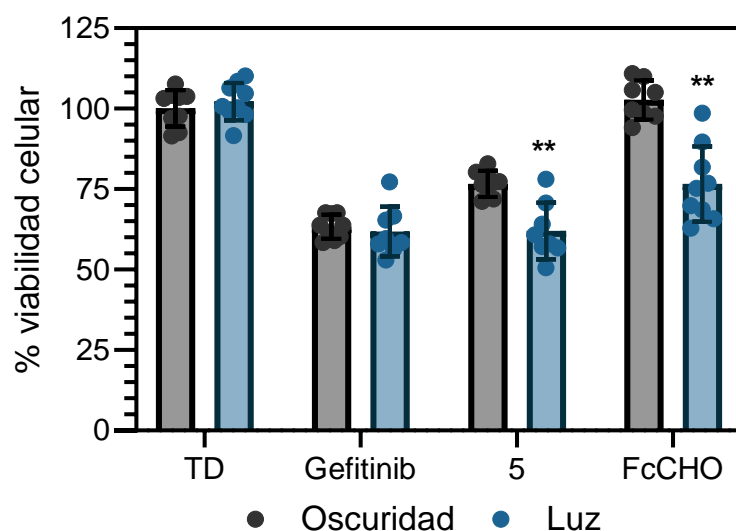
Las condiciones de este experimento, para conocer el efecto de los compuestos **5**, **FcCHO** y **gefitinib** en las líneas celulares MCF-7 y HaCaT, fueron las siguientes, de acuerdo a todos los experimentos previos. La concentración probada fue de 80  $\mu\text{M}$ , el número de células por pozo fue de 3,000 y la fluencia fue de 75  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Los resultados en este experimento fueron satisfactorios para el caso de ambas líneas celulares.

Como se puede observar en la **Gráfica 4**, en la línea celular MCF-7 sin aplicar luz (barras negras), el vehículo (DMSO-0.4%) no tuvo un efecto significativo en la viabilidad celular, por lo cual se puede utilizar este porcentaje (0.4%) a lo largo del experimento, al no presentar actividad que repercute en la viabilidad celular. Asimismo, también se observa que el **gefitinib** (control positivo) tuvo un efecto significativo en la viabilidad celular, esto también ocurre con el compuesto **5**. La explicación a este resultado es que la porción tipo quinazolina del compuesto 5 provoca citotoxicidad de la misma manera que **gefitinib**, lo que sugiere que hay unión a EGFR. De esta forma, se puede decir que en la oscuridad el compuesto **5** ya posee cierta actividad, dada su estructura. Por otro lado, el compuesto **FcCHO** no presentó actividad en esta línea celular en la oscuridad.



Gráfica 4. Inhibición celular de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO sin luz, línea MCF-7. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (99.99%).

Ahora bien, continuando con la línea celular MCF-7, en el experimento aplicando luz (TFD), se puede observar en la **Gráfica 5**, que el vehículo es adecuado para el experimento, ya que el hecho de que el DMSO sea expuesto a las condiciones de irradiación de este experimento, no afecta de manera significativa la viabilidad. En cambio, se observa que hay diferencia significativa entre los tratamientos a oscuras y con luz de los fotosensibilizadores, que, en este caso, son el compuesto **5** y el **FcCHO**. En la **Gráfica 4**, se observa que el control positivo **gefitinib** inhibió de manera significativa la viabilidad celular en el experimento sin luz, mientras que en el experimento con luz el porcentaje de viabilidad no cambió significativamente, por lo que se puede decir que en este compuesto la luz no es un factor determinante en su actividad. Caso contrario al compuesto **5**, que sin luz ya poseía una actividad, pero que con luz esta actividad sobre las células, incrementó de manera significativa.

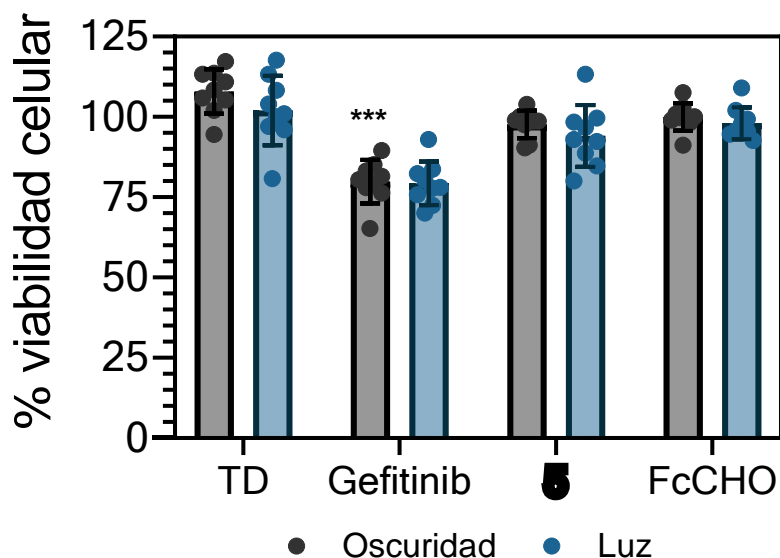


**Gráfica 5.** Inhibición celular de los compuestos **5**, **Gefitinib** y **FcCHO** con luz, línea MCF-7. \*\*  $p < 0.0021$  (97.9%)

Finalmente, se muestran los resultados del experimento de TFD en células HaCaT, en la **Gráfica 6**.

La diferencia entre la viabilidad celular en el experimento con luz y el experimento sin luz de los compuestos **5** y **FcCHO** no fueron significativas, es decir que los compuestos causan estadísticamente la misma muerte celular cuando éstos son sometidos a irradiación lumínica de 460 nm.

Recordando que la línea celular HaCaT proviene de queratinocitos y la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma mamario, y comparando las **Gráficas 4, 5 y 6**, se concluye que el compuesto **5** exhibe una notable selectividad citotóxica hacia las células cancerosas cuando se somete a una irradiación lumínica, ya que este compuesto reduce, en mayor porcentaje, la muerte celular en células de cáncer de mama en comparación con células como los queratinocitos. Se concluye también que el compuesto **5** es más selectivo que el control positivo **gefitinib**, ya que este último compuesto provoca muerte celular en la línea MCF-7, pero también en la línea HaCaT.



Gráfica 6. Inhibición celular de los compuestos 5, Gefitinib y FcCHO, línea HaCaT. \*\*  $p < 0.0021$  (97.9%).

## 11. Acoplamiento molecular

La simulación de acoplamiento molecular es un buen método para predecir las posibles interacciones entre un ligando pequeño y biomoléculas objetivo. Puesto que en el ensayo de captura de radical anión superóxido, el compuesto **6** no generó esta especie reactiva, los estudios de acoplamiento molecular se realizaron únicamente con el compuesto **5**. El compuesto **5** sí fue capaz de producir radical anión superóxido, radical hidroxilo y por consiguiente, provocar disminución de la viabilidad celular en la línea celular de cáncer MCF-7. Como diana para el acoplamiento molecular, se utilizará la proteína EGFR por su importancia descrita anteriormente.

### 11.1. Metodología

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron utilizando el software *Vina 1.2.1* (42). En el acoplamiento se utilizó el dominio de tirosina cinasa en su forma activa e inactiva, para analizar el efecto de cada conformación en la unión del ligando, que en este caso es el compuesto **5**. Las simulaciones del acoplamiento molecular se realizaron utilizando una exhaustividad de 20 conformaciones.

### 11.1.1. Preparación de archivos de entrada para el acoplamiento molecular

#### *Preparación de las proteínas*

En cuanto a la preparación de las proteínas, se utilizó la base de datos del RCSB Protein Data Bank (PDB), para la obtención de la estructura cristalina del dominio de tirosina cinasa del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR-TKD), siendo el PDB ID: 1M17 obtenida por cristalografía de difracción de rayos X, con una resolución de 2.46 Å (43) para la forma activa y el PDB ID: 4HJO obtenida por cristalografía de difracción de rayos X, con una resolución de 2.75 Å (44) para la forma inactiva. Ambas proteínas se prepararon con el software *Chimera 1.17*. (45) A ambas proteínas se les eliminó el ligando con el que fueron cristalizadas, en este caso el Erlotinib ([6,7-bis(2-metoxi-etoxi)quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)amina), también se eliminaron las moléculas de agua, quedando solo las proteínas de interés.

En cuanto a la preparación del receptor, con *AutoDock Tools4* (46), se añadieron átomos de hidrógeno polares, cargas de Gasteiger y parámetros de solvatación.

#### *Preparación del ligando*

El compuesto **5** se preparó utilizando el software *ChemDraw* (47), posteriormente se exportó al software *Gaussian 16* y se preparó usando el nivel teórico funcional de densidad DFT B3LYP 6-31G(d,p). La optimización de la geometría se realizó utilizando los criterios de convergencia predeterminados del programa. Una vez optimizada la estructura, el archivo de salida se convirtió a un archivo PDB, para su posterior utilización en los estudios de acoplamiento molecular.

### 11.1.2. Definición del espacio de acoplamiento molecular.

Para la determinación del espacio exacto en el que se efectuó el acoplamiento molecular, se utilizó el software de *PyRx*. En este software se obtuvo la cuadrícula del sitio activo, con dimensiones de 20 x 20 x 20 Å. Este cubo en el espacio de la proteína representa el lugar en el que se encuentra el ligando co-cristalizado.

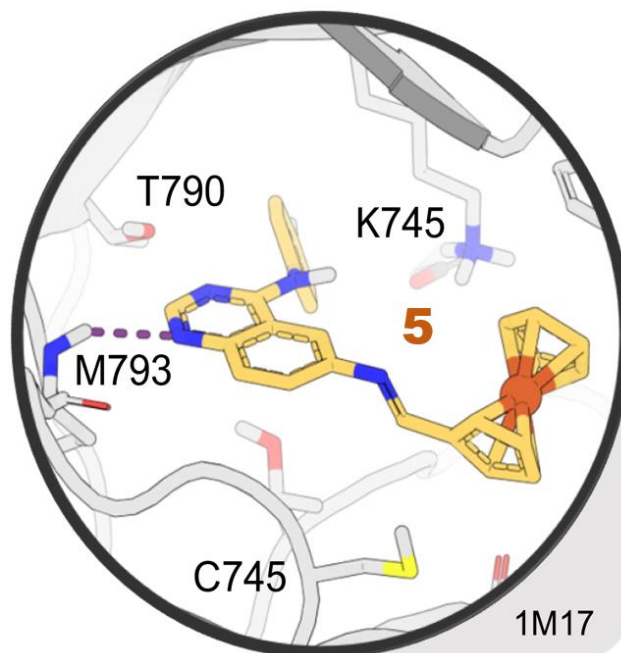
### 11.1.3. Visualización del acoplamiento molecular

Para la inspección visual de los resultados de los acoplamientos moleculares se utilizó el software *PyMOL* (48), logrando apreciar en 3D los complejos proteína-ligando.

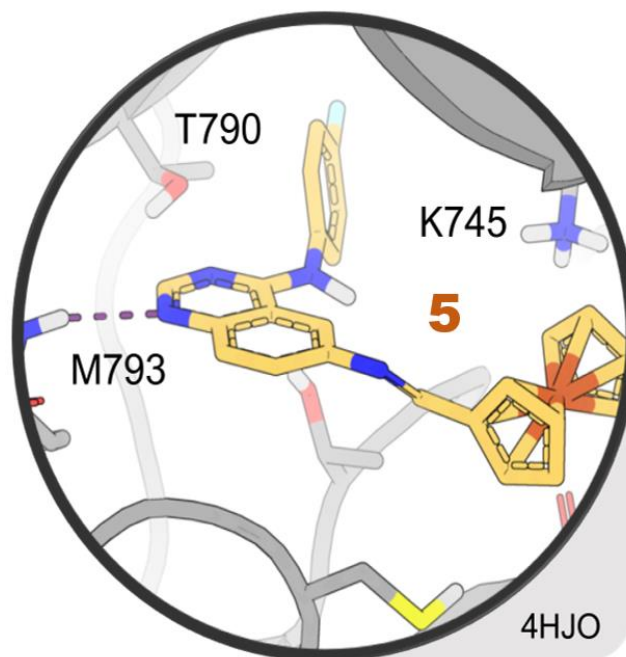
## 11.2. Resultados y discusión

Como se puede observar en la **Figura 28** y la **Figura 29**, el compuesto **5** formó un puente de hidrógeno con la cadena principal de M793, también formó una interacción pi-cación con K745. Además, se observó una interacción de apilamiento  $\pi$  (o interacción  $\pi$ - $\pi$ ) entre el grupo ciclopentadienilo del compuesto **5** y F723, dado que los planos de los anillos aromáticos se apilan paralelos entre sí.

La interacción con M793 y el modo de unión, en general, ya se había reportado con el gefitinib (49), molécula que fue el control positivo en los ensayos de captura de radical anión superóxido, radical hidroxilo y el ensayo de viabilidad celular en células HaCaT y MCF-7. El score de acoplamiento para gefitinib fue de -9.86 mientras que para el compuesto 5 fue de -8.23. También se observa que la presencia del grupo ferroceno en la molécula, no interfiere en el modo de unión, es decir, su presencia no reduce la afinidad del compuesto **5** hacia el sitio de interés de unión en EGFR.



*Figura 28. Acoplamiento molecular del compuesto 5 en la proteína 1M17 (forma activa)*



**Figura 29.** Acoplamiento molecular del compuesto 5 en la proteína 4HJO (forma inactiva)

Al realizar las simulaciones del acoplamiento molecular, se mostró una unión estable del ligando (compuesto **5**) a la proteína (EGFR-TKD), tanto en su forma activa como inactiva, de esta manera se puede decir que existe una regulación más fina de su actividad ya que hay un “doble mecanismo” de inhibición.

La inhibición de la proteína EGFR, en su porción de dominio de tirosina cinasa, detiene múltiples vías de señalización. Además, la capacidad de inhibir la enzima en su forma inactiva puede ser útil para prevenir una activación inapropiada de la enzima en situaciones donde no se requiere su actividad. Asimismo, aunque las estructuras terciarias de los dominios de las proteínas cinasas -catalíticamente activas- son muy similares entre ellas, se ha informado según la estructura cristalina de estas mismas proteínas inactivas, que poseen una gran cantidad de conformaciones distintas entre sí, es decir, entre la familia de las proteínas cinasas en su forma activa son similares, pero en la inactiva son diferentes. Por consiguiente, los compuestos que se dirijan a conformaciones inactivas específicas pueden ser más selectivos que aquellos que se dirijan a la conformación activa (50). Esto se traduce a que gracias a que el compuesto **5** se une a la forma inactiva de la molécula, en un ambiente biológico será capaz de unirse solo a la porción de tirosina cinasa de EGFR, evitando interferir en vías no deseadas. Otra deducción que se surge, es que el hecho de que el compuesto **5** se acople a la forma inactiva en el TKD, hace que se reduzca su tasa de activación, al afectar la cinética de la fosforilación.

La validación del acoplamiento molecular, se realizó con *DockRMSD* (51), la comparación entre el ligando co-cristalizado y la conformación adoptada después del acoplamiento se encuentra en el [ANEXO 3](#).



## 12. Conclusiones y perspectivas.

Se llevó a cabo la síntesis y caracterización completa de las moléculas definidas en el apartado de síntesis molecular. Mediante técnicas de análisis químico, se garantiza la estructura y pureza de las moléculas sintetizadas. Asimismo, se obtuvo el espectro de absorción UV-Vis de la molécula, lo que brindó información sobre su capacidad de absorción de la luz.

Para evaluar la capacidad de la molécula de generar especies reactivas de oxígeno, se realizaron ensayos de captura del radical hidroxilo y ensayos de captura del radical anión superóxido. Los resultados demostraron que una de las moléculas diseñadas (compuesto **5**) es capaz de producir estas especies reactivas una vez excitada con luz azul de 460 nm, lo cual es relevante, debido a su potencial aplicación en terapia fotodinámica.

Adicionalmente, se realizaron estudios *in vitro* en líneas celulares para evaluar la actividad biológica de la molécula (compuesto **5**). Los resultados revelaron una inhibición significativa del crecimiento celular en la línea de cáncer de mama MCF-7 (27.47%), la cual incrementó al irradiar las células con luz de 460 nm (39.18%). Se puede decir que en comparación con la monoterapia (gefitinib), el compuesto sintetizado -que es un conjugado de quinazolina-ferroceno- exhibe una eficiencia y potencia superior para disminuir la viabilidad de células cancerosas.

Mientras tanto, en las células HaCaT, el compuesto **5** no repercutió en la viabilidad celular aun cuando éste fue irradiado con luz, lo que indica que tiene un efecto citotóxico selectivo sobre las células que expresan EGFR.

Por otro lado, los estudios de acoplamiento molecular revelaron una interacción favorable entre el compuesto y la proteína, presentando la interacción con M793 de tipo puente de hidrógeno.

Dentro de las perspectivas para el proyecto se encuentran realizar ensayos para conocer el valor de IC<sub>50</sub> del compuesto **5**, en las líneas celulares MCF-7 y HaCaT, y obtener el índice de selectividad, así como el explorar diferentes tiempos de incubación para determinar aquel tiempo de actividad citotóxica sea máxima. Adicionalmente explorar diferentes tiempos de irradiación, para analizar la posibilidad de disminuir la concentración del compuesto utilizada.

Otros ensayos que pueden realizarse son ensayos de viabilidad celular en otras líneas celulares de cáncer, así como el determinar el tipo de muerte celular en cada experimento, para elucidar el mecanismo desencadenado.

### 13. Referencias

1. Martínez, ¿Qué es el cáncer? - NCI. *Inst. Nac. cancer* (2019), pp. 4–8.
2. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. **144**, 646–674 (2011).
3. B. L. D. M. Brücher, I. S. Jamall, Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm. *BMC Cancer*. **14**, 331 (2014).
4. M. Sheikh, H. Poustchi, A. Pourshams, A. Etemadi, F. Islami, M. Khoshnia, A. Gharavi, M. Hashemian, G. Roshandel, H. Khademi, M. Zahedi, B. Abedi-Ardekani, P. Boffetta, F. Kamangar, S. M. Dawsey, P. D. Pharaoh, C. C. Abnet, N. E. Day, P. Brennan, R. Malekzadeh, Individual and Combined Effects of Environmental Risk Factors for Esophageal Cancer Based on Results From the Golestan Cohort Study. *Gastroenterology*. **156**, 1416–1427 (2019).
5. E. Barone, A. Corrado, F. Gemignani, S. Landi, Environmental risk factors for pancreatic cancer: an update. *Arch. Toxicol.* **90**, 2617–2642 (2016).
6. O. Golubnitschaja, M. Debal, K. Yeghiazaryan, W. Kuhn, M. Pešta, V. Costigliola, G. Grech, Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. *Tumour Biol*. **37**, 12941–12957 (2016).
7. N. Reynoso-Noverón, J. A. Torres-Domínguez, Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Rev. Latinoam. Med. Conduct. / Lat. Am. J. Behav. Med.* **8**, 9–15 (2017).
8. World Health Organization, Mexico Source: Globocan 2020. *Int. Agency Res. Cancer WHO*. **929**, 1–2 (2020).
9. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
10. S. K. Patra, Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. **1785**, 182–206 (2008).
11. T. Regad, Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers (Basel)*. **7**, 1758–1784 (2015).
12. E. Levantini, G. Maroni, M. Del Re, D. G. Tenen, EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers. *Semin. Cancer Biol.* **85**, 253–275 (2022).
13. Q. Liu, S. Yu, W. Zhao, S. Qin, Q. Chu, K. Wu, EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol. Cancer*. **17**, 53 (2018).
14. K. D. Miller, L. Nogueira, A. B. Mariotto, J. H. Rowland, K. R. Yabroff, C. M. Alfano, A. Jemal, J. L. Kramer, R. L. Siegel, Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 363–385 (2019).
15. P. Seshacharyulu, M. P. Ponnusamy, D. Haridas, M. Jain, A. K. Ganti, S. K. Batra, Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*. **16**, 15–31 (2012).

16. D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 380–387 (2003).
17. P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 250–81 (2011).
18. R. Baskaran, J. Lee, S.-G. Yang, Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater. Res.* **22**, 25 (2018).
19. Z. Zou, H. Chang, H. Li, S. Wang, Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis.* **22**, 1321–1335 (2017).
20. J. M. Dąbrowski, "Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation" en *Advances in Inorganic Chemistry* (2017; <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898883817300211>), vol. 70, pp. 343–394.
21. Z. Feng, J. Guo, X. Liu, H. Song, C. Zhang, P. Huang, A. Dong, D. Kong, W. Wang, Cascade of reactive oxygen species generation by polyprodrug for combinational photodynamic therapy. *Biomaterials.* **255**, 120210 (2020).
22. M. Grin, N. Suvorov, P. Ostroverkhov, V. Pogorilyy, N. Kirin, A. Popov, A. Sazonova, E. Filonenko, Advantages of combined photodynamic therapy in the treatment of oncological diseases. *Biophys. Rev.* **14**, 941–963 (2022).
23. Ş. Comşa, A. M. Cîmpean, M. Raica, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Res.* **35**, 3147–3154 (2015).
24. I. Colombo, E. Sangiovanni, R. Maggio, C. Mattozzi, S. Zava, Y. Corbett, M. Fumagalli, C. Carlino, P. A. Corsetto, D. Scaccabarozzi, S. Calvieri, A. Gismondi, D. Taramelli, M. Dell'Agli, HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* **2017**, 7435621 (2017).
25. P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N. E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761–71 (1988).
26. Z. Lei, X. Zhang, X. Zheng, S. Liu, Z. Xie, Porphyrin–ferrocene conjugates for photodynamic and chemodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 8613–8619 (2018).
27. B. Babu, T. Ochappan, T. Asraf Ali, J. Mack, T. Nyokong, M. Gopalakrishnan Sethuraman, Photodynamic activity and photoantimicrobial chemotherapy studies of ferrocene-substituted 2-thiobarbituric acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **40**, 127922 (2021).
28. L. L. Zhou, Q. Guan, W. Li, Z. Zhang, Y. Y. Li, Y. Y. Dong, A Ferrocene-Functionalized Covalent Organic Framework for Enhancing Chemodynamic Therapy via Redox Dyshomeostasis. *Small.* **17**, 2101368 (2021).
29. A. Foucourt, C. Dubouilh-Benard, E. Chosson, C. Corbière, C. Buquet, M. Iannelli, B. Leblond, F. Marsais, T. Besson, Microwave-accelerated Dimroth rearrangement for the synthesis of 4-anilino-6-nitroquinazolines. Application to an efficient synthesis of a microtubule destabilizing agent. *Tetrahedron.* **66**, 4495–4502 (2010).
30. J. Y. Lee, Y. S. Shin, J. Lee, S. Kwon, Y.-H. Jin, M. S. Jang, S. Kim, J. H. Song, H. R.

- Kim, C. M. Park, Identification of 4-anilino-6-aminoquinazoline derivatives as potential MERS-CoV inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **30**, 127472 (2020).
31. V. Chandregowda, G. Venkateswara Rao, G. Chandrasekara Reddy, Convergent Approach for Commercial Synthesis of Gefitinib and Erlotinib. *Org. Process Res. Dev.* **11**, 813–816 (2007).
  32. X. Chen, X.-Y. Zhou, H. Wu, Y.-Z. Lei,, J.-H. Li, Highly efficient reduction of nitro compounds: Recyclable Pd/C-catalyzed transfer hydrogenation with ammonium formate or hydrazine hydrate as hydrogen source. *Synth. Commun.* **48**, 2475–2484 (2018).
  33. M. A. Tike, V. V. Mahajani, Studies in catalytic transfer hydrogenation of soybean oil using ammonium formate as donor over 5% Pd/C catalyst. *Chem. Eng. J.* **123**, 31–41 (2006).
  34. K. Sato, Masaru; Kono, Hiromichi; Shiga, Mikio; Motoyama, Izumi; Hata, A simple modification of Vilsmeier Method for the Preparation of Formylferrocene. *CSJ Journals.* **41**, 1959–1959 (1959).
  35. R. J. Aitken, Nitroblue tetrazolium (NBT) assay. *Reprod. Biomed. Online.* **36**, 90–91 (2018).
  36. A. Y. Satoh, J. E. Trosko, S. J. Masten, Methylene Blue Dye Test for Rapid Qualitative Detection of Hydroxyl Radicals Formed in a Fenton's Reaction Aqueous Solution. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 2881–2887 (2007).
  37. T. Kanti Das, M. R. Wati, K. Fatima-Shad, Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. *Arch. Neurosci.* **2** (2014), doi:10.5812/archneurosci.20078.
  38. S. T. Nguyen, H. T.-L. Nguyen, K. D. Truong, Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther.* **7**, 3855–3859 (2020).
  39. X. Zhang, B. Zhang, J. Liu, J. Liu, C. Li, W. Dong, S. Fang, M. Li, B. Song, B. Tang, Z. Wang, Y. Zhang, Mechanisms of Gefitinib-mediated reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells by inducing ER $\alpha$  re-expression. *Sci. Rep.* **5**, 7835 (2015).
  40. Y. J. Kim, J. S. Pyo, Y.-S. Jung, J.-H. Kwak, Design, synthesis, and biological evaluation of novel 1-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrazino[1,2-a]indole-3-carboxamide analogs in MCF-7 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 607–611 (2017).
  41. B. J. Friedmann, M. Caplin, B. Savic, T. Shah, C. J. Lord, A. Ashworth, J. A. Hartley, D. Hochhauser, Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 209–218 (2006).
  42. J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, S. Forli, AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 3891–3898 (2021).
  43. J. Stamos, M. X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* **277**, 46265–72 (2002).
  44. J. H. Park, Y. Liu, M. A. Lemmon, R. Radhakrishnan, Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem. J.* **448**, 417–423

- (2012).
45. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
  46. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–91 (2009).
  47. D. A. Evans, History of the Harvard ChemDraw Project. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 11140–11145 (2014).
  48. L. L. C. Schrodinger, The PyMOL molecular graphics system. **n.d** (2015).
  49. C. H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, M. J. Eck, Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell.* **11**, 217–227 (2007).
  50. R. Roskoski, Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **94**, 9–25 (2015).
  51. E. W. Bell, Y. Zhang, DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J. Cheminform.* **11**, 40 (2019).

## ANEXO 1. Metodología de síntesis y caracterización de compuestos 5 y 6, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y espectrometría de masas.

### Síntesis del compuesto 2.

**Metodología:** En un matraz de fondo redondo de 100 mL, con boca 14/20, se colocaron 12.0 g de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (73.56 mmol), suspendidos en 45 mL de DMF. Posteriormente, se agregó 9.77 mL de DMF-DMA (73.56 mmol). La mezcla se dejó agitando a 110°C por 6 h en un baño de aceite de silicón, en la boca del matraz se colocó un poco de vaselina para integrar un condensador Graham. Al inicio de la reacción, los componentes de la mezcla son solubles en DMF. El avance de la reacción, se fue monitoreando con CCF (sistema de elución: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 80:20), con ayuda de una lámpara de UV, de esta forma se fue observando la desaparición del 2-amino-5-nitrobenzonitrilo y, por consiguiente, la aparición del compuesto **2** como un punto de color amarillo fosforescente. Una vez que los reactivos se consumieron, el calentamiento se detuvo, con el paso del enfriamiento el producto de reacción se precipitó (color amarillo). La mezcla de reacción fue filtrada en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se lavó con metanol hasta que el filtrado resultante fuera incoloro. Finalmente, la masa del sólido amarillo obtenido fue de 13.09 g (59.99 mmol), con un rendimiento de 81.6%. El Rf obtenido utilizando como fase móvil CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:20 fue de 0.73, mientras que el punto de fusión (pf) fue de 143-144 °C.

### Síntesis del compuesto 3.

**Metodología:** En un matraz de fondo redondo de 100 mL, con boca 14/20, se colocaron 7.0 g de (E)-N-(2-ciano-4-nitrofenil)-N,N-dimetilformimidamida (32.08 mmol), posteriormente se agregaron 50 mL de una mezcla de ácido acético al 30% en acetonitrilo. Luego se agregaron 3.65 mL de 4-fluoranilina (38.49 mmol) y la mezcla de reacción se colocó en agitación con reflujo, durante 4 h en un baño de aceite de silicón con un condensador Graham. Al ir incrementando la temperatura de la mezcla, todos los componentes se solubilizan. La reacción se siguió por CCF hasta observar la desaparición del compuesto 2. Cuando terminó la reacción, se apagó el calentamiento y se observó gradualmente la aparición de un precipitado de color amarillo. La mezcla de reacción se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se hicieron lavados con acetonitrilo hasta resultar incoloro el acetonitrilo filtrado. El sólido se dejó secar por arrastre con vacío por una noche. Finalmente, la masa del sólido amarillo fue de 7.69 g (27.05 mmol), con un rendimiento de 84.3%. El Rf obtenido utilizando como fase móvil CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:20 fue de 0.74, mientras que el punto de fusión (pf) fue de 270-271°C.

### Síntesis del compuesto 4.

**Metodología:** En un matraz de fondo redondo de 100 mL, con boca 14/20, se colocaron 7.0 g de N-(4-fluorofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (24.63 mmol) y 0.7 g de Pd/C. El matraz se agitó en seco suavemente hasta la total incorporación de ambos componentes. Posteriormente y con cuidado se agregó, por las paredes del matraz, 25 mL de metanol, se agitó suavemente y luego se agregaron 25 mL más. El matraz se mantuvo en agitación a reflujo durante 1 h en un baño de aceite de silicón, pero antes de colocarle el condensador tipo Graham, a la mezcla de reacción se agregaron 9.32 g de formiato de amonio (147.76 mmol). La reacción se monitoreó con CCF, y fue detenida cuando se observó la desaparición del compuesto **3**.

Al finalizar la reacción, los componentes de la misma se disolvieron en la mezcla, a excepción del Pd/C. El matraz se retiró del calentamiento, y cuando llegó a temperatura ambiente, la mezcla se filtró con un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo de vidrio poroso, además se colocó en el embudo papel filtro y una capa de celita, de esta manera se realizaron lavados con metanol hasta que el líquido filtrado fue incoloro. La disolución filtrada se llevó a un rotaevaporador para eliminar el disolvente. El compuesto **4** se colocó en un embudo Büchner y con ayuda de un matraz Kitasato se realizaron lavados con una disolución de NaHCO<sub>3</sub>. De esta manera se obtuvo un sólido de color amarillo pálido/beige de masa de 5.58 g (21.95 mmol), teniendo un rendimiento de la reacción de 89.1%. El R<sub>f</sub> obtenido utilizando como fase móvil CHCl<sub>3</sub>/MeOH 70:30 fue de 0.42, mientras que el punto de fusión (pf) fue de 259-261 °C.

#### Síntesis del **FcCHO**.

Metodología: En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se colocaron 12.0 g de ferroceno (64.50 mmol), 10.0 mL de DMF (129.0 mmol), finalmente se colocaron y 50 mL cloroformo anhidro. Esta mezcla se agitó en un baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno por 10 min. Luego, se añadió gota a gota a la mezcla 12 mL de cloruro de fosforilo (129 mmol), una vez completada la adición, la mezcla de reacción se puso en agitación por 20 h con un calentamiento en un baño de aceite de silicón a una temperatura de 55 °C. Finalizado el tiempo, la mezcla de reacción se llevó a un rotaevaporador y el residuo se vertió en una mezcla de hielo y agua. Los precipitados sólidos que fueron principalmente ferroceno sin reaccionar se separaron mediante filtración al vacío con ayuda de un embudo Büchner y papel filtro. El filtrado resultante se neutralizó poco a poco y cuidadosamente con carbonato de sodio en polvo y luego se extrajo con éter tres veces. Cada uno de los extractos se combinaron y se les eliminó el agua agregando sulfato de magnesio anhidro. Todos los extractos conjuntos se llevaron a un rotaevaporador, obteniendo un producto puro en forma de cristales color marrón rojizo. Con tres extracciones se obtuvo un sólido de masa de 4.43 g (20.70 mmol), de rendimiento de 32.1%. El rendimiento es bajo dado que solo se realizaron 3 extracciones con éter.

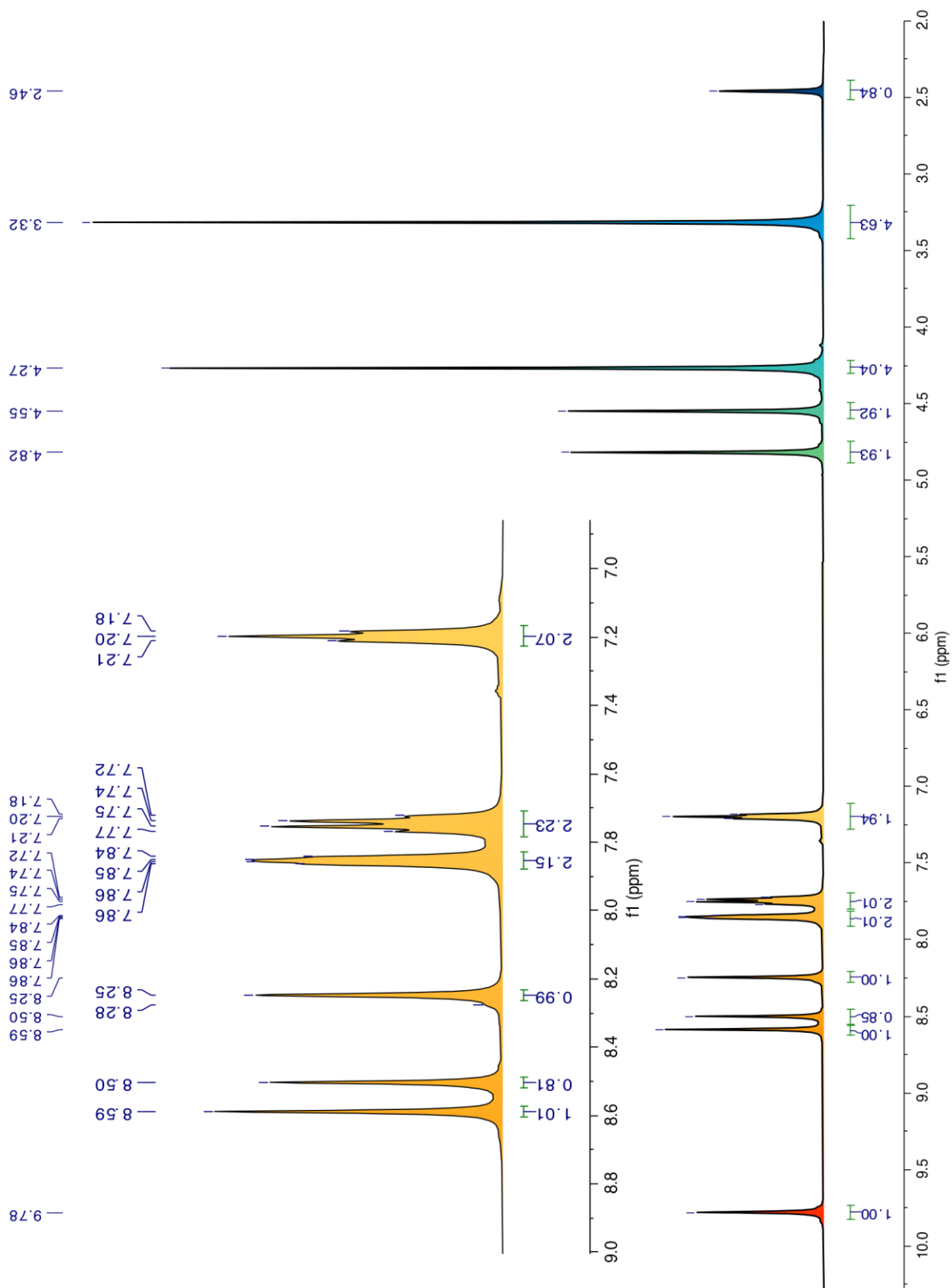
#### Síntesis del compuesto **5**.

Metodología: En un recipiente para microondas *Anton Par G10* se colocaron 0.25 g del compuesto **4** (0.983 mmol) y 0.252 g de formilferroceno (FcCHO, 1.18 mmol). La reacción se llevó a cabo sin disolvente a una temperatura de 120°C y se dejó reaccionar durante 20 min. Una vez completada la reacción, el sólido obtenido fue recristalizado con una mezcla de EtOH/H<sub>2</sub>O, para la eliminación de las impurezas. Una vez obtenidos los cristales, se realizó una filtración de los mismos con ayuda de un embudo Büchner y papel filtro. Finalmente se obtuvieron los cristales color naranja del compuesto **5**, con una masa de 0.354 g (0.786 mmol), teniendo un rendimiento de 80.0%. El punto de fusión del compuesto **5** fue de 214-215 °C.

#### Síntesis del compuesto **6**.

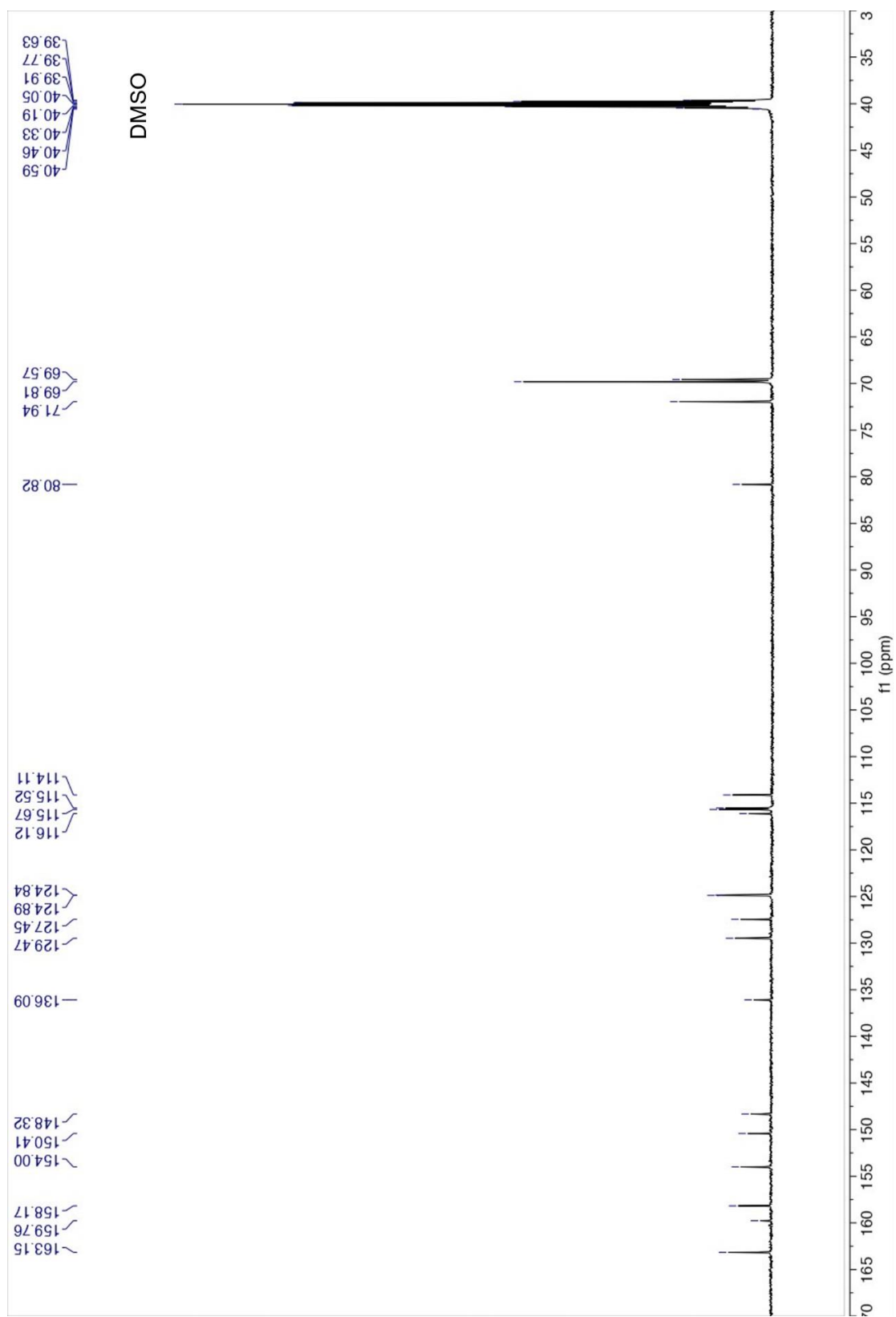
Metodología: El compuesto **6** se sintetizó suspendiendo, en un matraz de fondo redondo, 0.450 g del compuesto **5** (1 mmol) en 25 mL de MeCN y se añadió lentamente 0.125 mg de NaBH<sub>3</sub>CN (2 mmol), permitiendo que la reacción se desarrollara a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de completarse la reacción, la mezcla resultante se volvió amarilla. Luego el sólido resultante se filtró y recristalizó en una mezcla de EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1), obteniendo cristales amarillos, el rendimiento fue de 85.4%. El punto de fusión del compuesto **6** fue de 182-183 °C.

# <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 5.

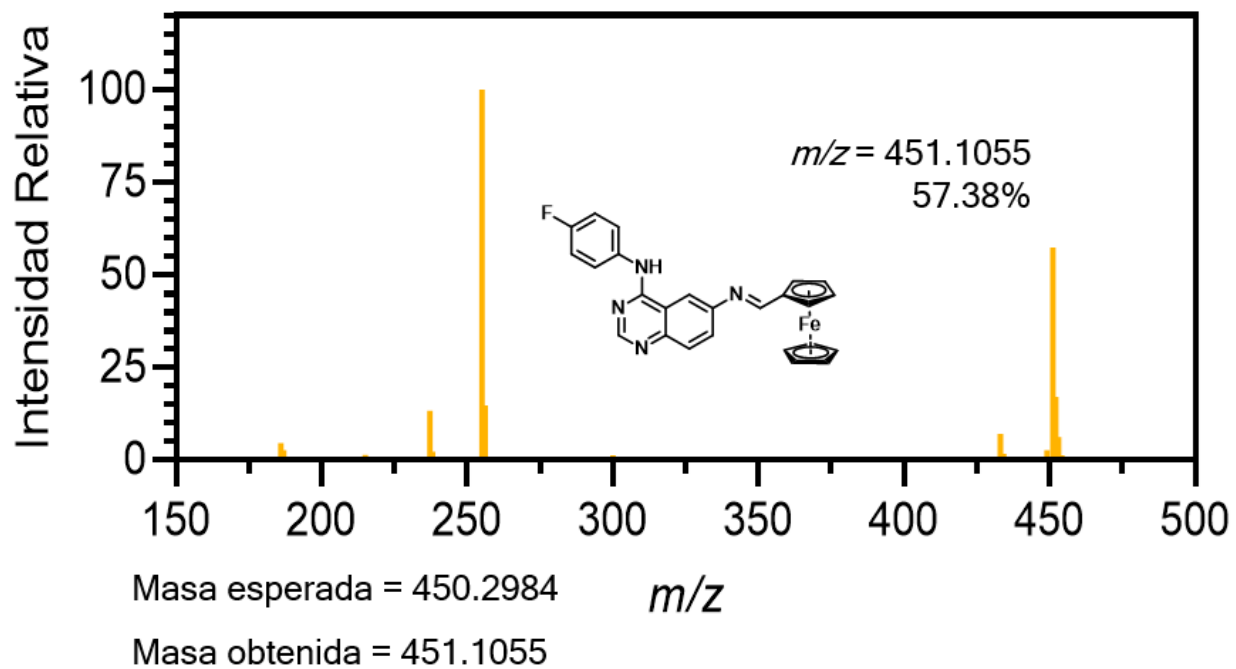




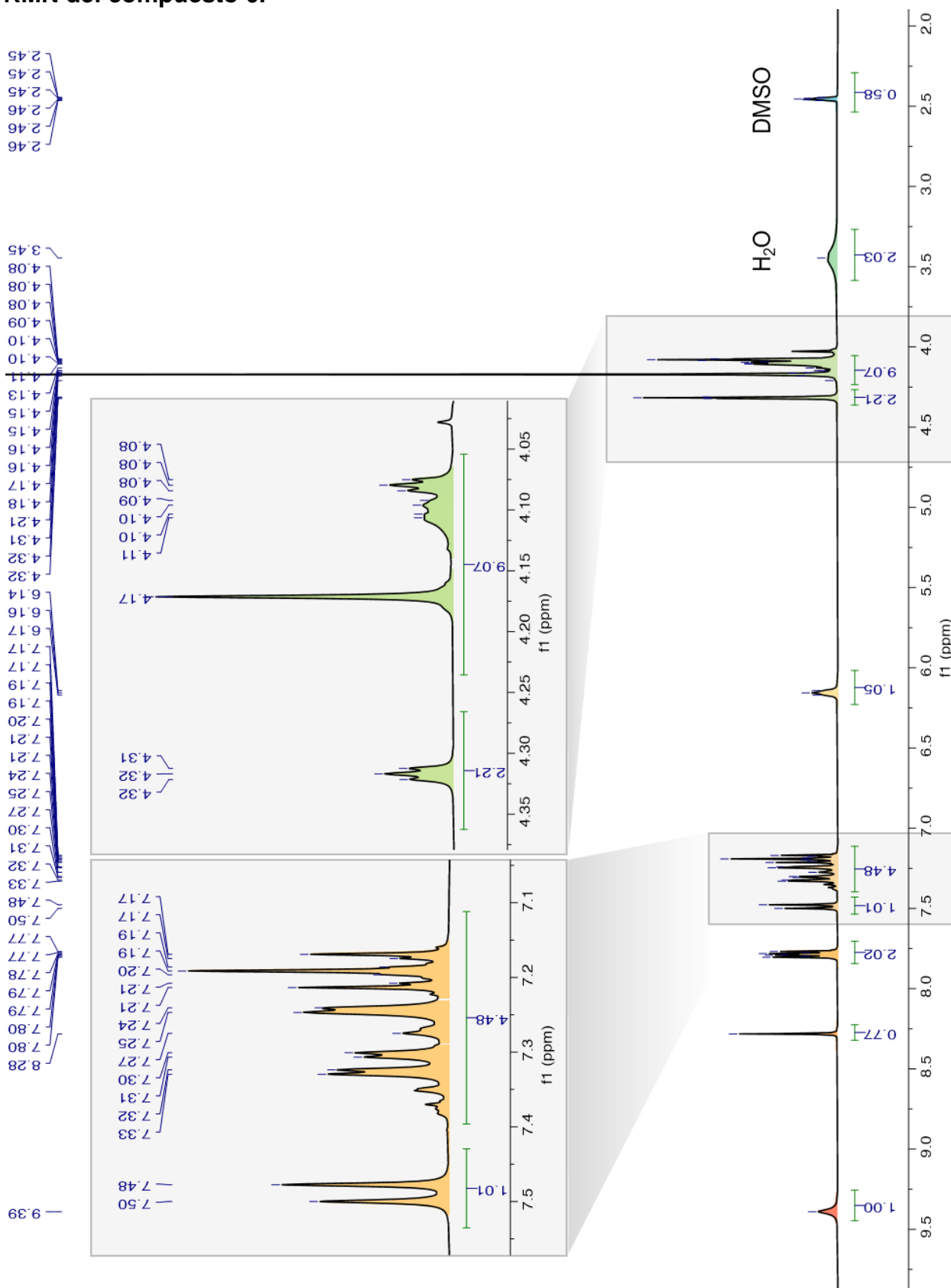
# <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 5.



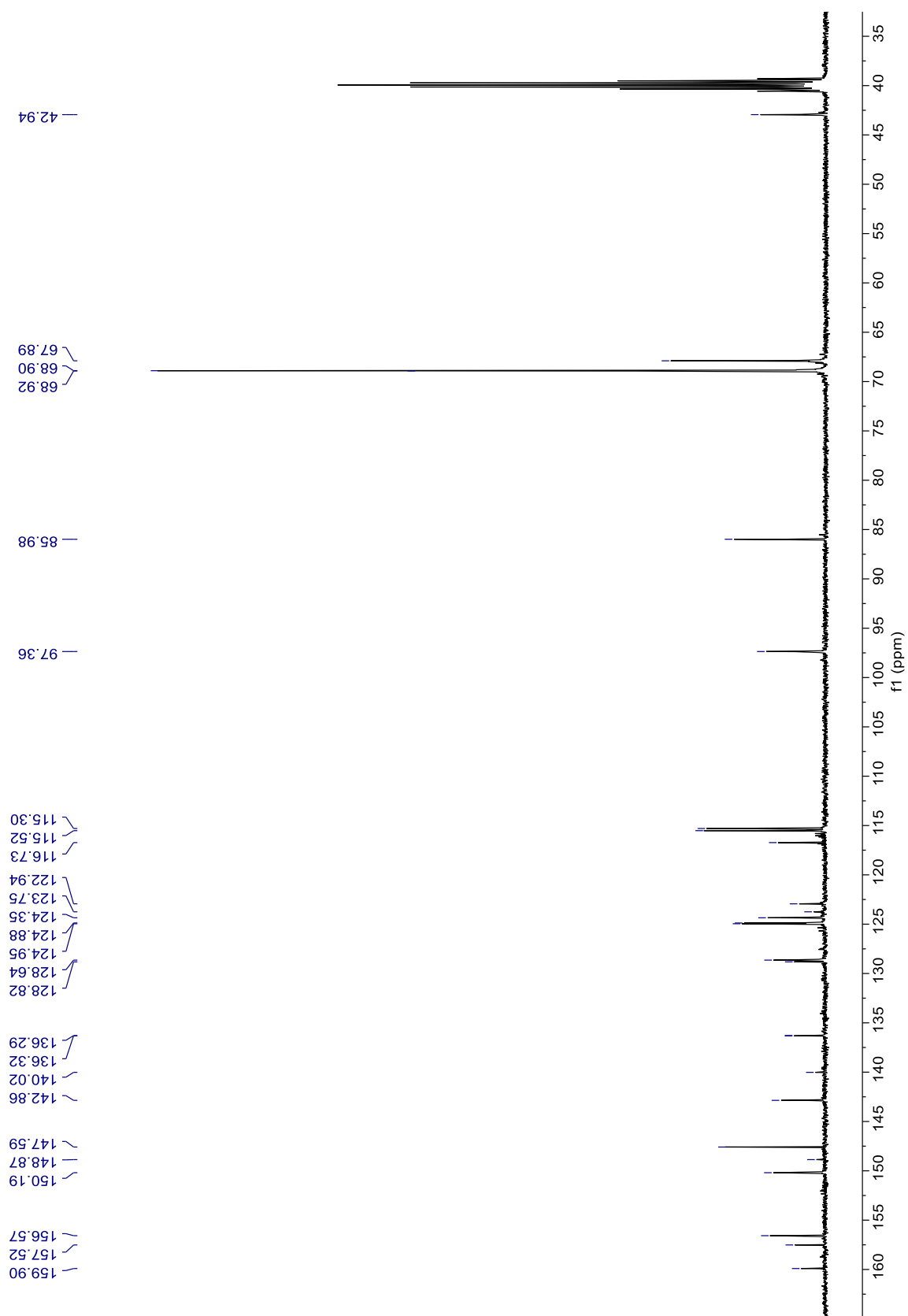
**Espectro de masas del compuesto 5 (APCI).**



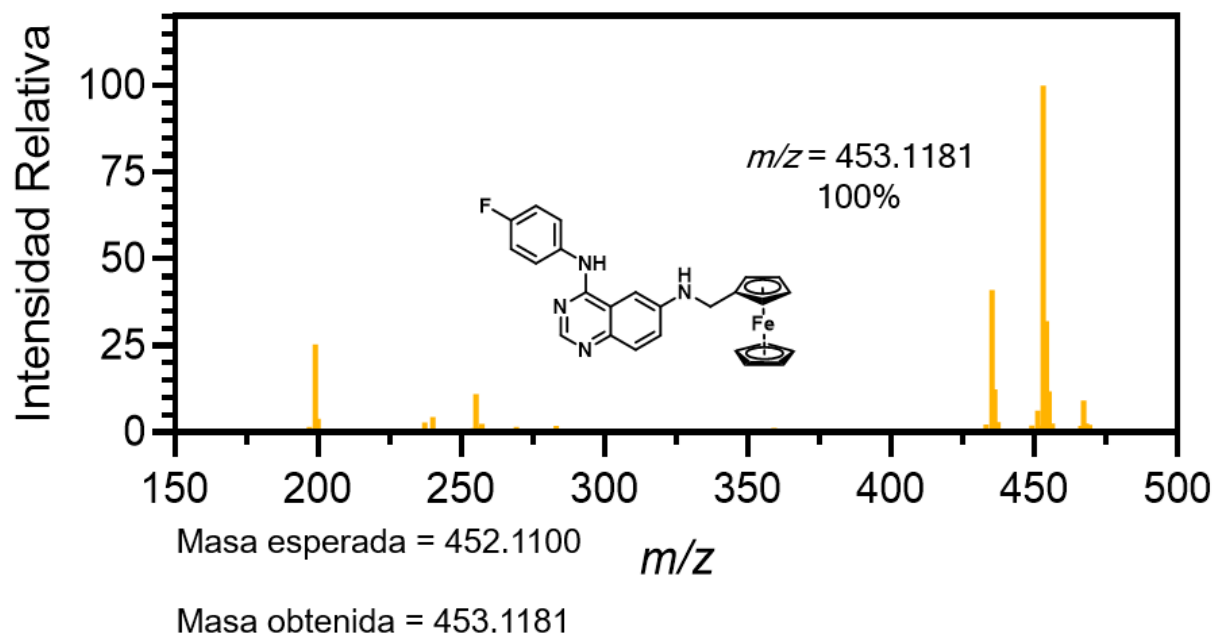
**<sup>1</sup>H-RMN del compuesto 6.**



**$^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 6.**



Espectro de masas del compuesto 6 (APCI).



## **ANEXO 2. Metodología de prueba de MTT, descongelación de células, tripsinización, cuenta celular, y mantenimiento celular.**

### **Prueba de MTT.**

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

1. Utilizando tripsina-verseno, disociar las células y resuspenderlas en medio de cultivo DMEM, suplementado al 10 % de SFB y antibiótico al 1%.
2. Realizar la cuenta celular.
3. Determinar el número de células requeridas en el experimento, este cálculo se realiza multiplicando el número de células por pozo por el total de pozos a utilizar. También se debe tomar en cuenta que en cada pozo se colocan 100  $\mu$ L de suspensión celular.
4. Utilizando placas de 96 pozos, sembrar células acordes al paso anterior, por pozo.
5. Se incuban a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, para permitir su adherencia.
6. Se prepara el compuesto químico de tal manera que, al añadir 100  $\mu$ L al pozo, tenga la concentración deseada.
7. Eliminar el medio con pipeta para solo dejar la monocapa celular en cada pozo.
8. Añadir 100  $\mu$ L de la disolución de los compuestos por pozo, tomar en cuenta los pozos que son del blanco, los pozos para el control del vehículo y los pozos para el control de viabilidad.
9. Incubar a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, para permitir que los compuestos actúen en todas las células, en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo.
10. Descartar el medio.
11. Añadir 100  $\mu$ L de MTT disuelto en medio DMEM, suplementado al 10% con SFB, la concentración del MTT en cada pozo debe ser de 100  $\mu$ g/mL. En este paso, en los pozos del blanco no se coloca MTT.
12. Incubar por 3.5 horas a 37 °C, para permitir la formación de cristales de formazán.
13. Eliminar el sobrenadante de cada pozo
14. Añadir 100  $\mu$ L de isopropanol ácido a cada pozo.
15. Colocar la placa en un agitador durante 8 minutos a 100 rpm, a temperatura ambiente, cubiertos de la luz.
16. Realizar la lectura de densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

### **Descongelación de las células.**

1. Tomar los criotubos con las células MCF-7 o HaCaT del congelador de ultra baja temperatura (- 70 °C) o de nitrógeno líquido (-195.8 °C)
2. Transferir el criotubo o ampollita rápidamente, a un primer baño de agua a 37 °C, mientras es transportado y a los 3 min a un segundo baño a 37 °C.
3. Agitar suavemente el criotubo hasta que el contenido se descongele.

4. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, en la campana de flujo laminar, abrir el recipiente y con la ayuda de una pipeta de 1 mL, transferir las células a un tubo de centrifuga de 15 mL, posteriormente, se le agrega un volumen igual de medio de crecimiento DMEM suplementado al 10%.
5. Agitar suavemente las células durante aproximadamente 30 segundos.
6. Rotular el cultivo y centrifugar a 800-1000 rpm por 5 min.
7. En condiciones de esterilidad, se elimina el sobrenadante por el lado contrario al botón o pellet, procurando eliminar todo el medio.
8. Resuspender el botón o pellet en 5 mL, si el botón es pequeño (1-3 mm de diámetro,) o en 13 mL si está arriba de 3 mm de diámetro. Nota: en este paso se puede hacer la cuenta celular y colocar  $2-3 \times 10^6$  células, por botella de 25 cm<sup>2</sup>, y de  $4-5 \times 10^6$  por botella de 75 cm<sup>2</sup>.
9. Transferir la suspensión celular a una botella de 25 o 75 cm<sup>2</sup>
10. Incubar el cultivo a 36.5 °C, hasta que éste adquiera del 80 a 90 % de confluencia.

### **Trypsinización.**

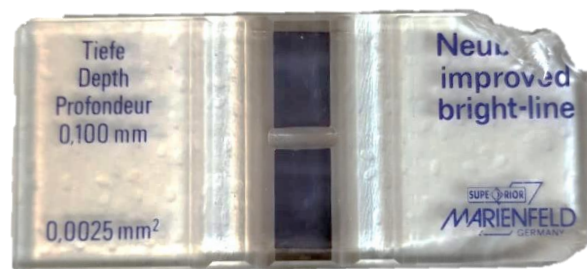
Después de que se logra que las células crezcan a un 80-90 % de confluencia, se prosigue a trypsinizar para obtener células disgregadas y que éstas puedan cultivarse en placas de 96 pozos. La técnica que se utiliza para este propósito es la siguiente.

1. Decantar el medio de cultivo agotado por la cara opuesta a la monocapa.
2. Adicionar 1 mL de una solución tripsina-verseno, para las botellas de 25 cm<sup>2</sup>, y 2 mL para las de 75 cm<sup>2</sup>, con ella lavar la monocapa. Esto se realiza rápidamente.
3. Decantar la solución por la cara opuesta a la monocapa. Y retirar perfectamente todo el líquido con ayuda de una pipeta. Nota: Solo en este paso se elimina la tripsina-verseno.
4. Adicionar nuevamente 1 o 2 mL de la solución tripsina-verseno, como en el inciso 2, bañando al cultivo suavemente y dejar actuar dicha solución hasta que la monocapa empiece a opalescer. No eliminar la tripsina.
5. Incubar los cultivos a 36.5 °C, durante 5 a 10 minutos, a este tiempo las células que estaban unidas se deben ver separadas y más redondas, la monocapa da la apariencia de arena o polvo observada contra la luz cuando las células se desprenden de la botella.
6. Dar unos golpes suaves sobre las caras laterales del recipiente, haciendo resbalar los residuos de las soluciones tripsina-verseno sobre la cara donde se encuentran las células, girar el recipiente y colocarlo en forma vertical.
7. En campana de flujo laminar, adicionar aproximadamente, el doble del volumen más 1 mL de medio de crecimiento, bañando la cara del recipiente donde crecieron las células en cultivo (para botellas de 25 cm<sup>2</sup> 3 mL y para botellas de 75 cm<sup>2</sup> 5 mL).
8. Homogeneizar la suspensión celular con una pipeta expulsado el líquido suavemente (~ 4 veces) suavemente sobre la cara del recipiente donde crecieron las células, para tratar de incorporar a la suspensión, aquellas células que aún permanezcan adheridas al recipiente.
9. Transferir la suspensión celular a un tubo cónico con tapa de rosca y centrifugar a 800-1000 rpm por 5 min.
10. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón o pellet a un volumen conocido, según el tamaño del botón.

## Cuenta celular.

Para realizar una buena cuenta celular es indispensable haber realizado una buena tripsinización. Para esta técnica se utilizó el método del hemocitómetro que se describe a continuación:

1. Se limpia perfectamente la parte plateada de una cámara de Neubauer y el cubreobjeto de la misma.
2. De una botella de cultivo con una confluencia del 80 al 90 %, se tripsiniza la monocapa, lo que implica la obtención de la suspensión de células.
3. Se le adiciona 5 mL de DMEM, suplementado al 10% con SFB, y se centrifuga a 800-1000 rpm por 5 minutos.
4. Decantar el medio y resuspender el paquete de células en 3 mL de DMEM suplementado al 10% con SFB
5. Se toman 10  $\mu$ L de la suspensión celular a contar y se diluye con 90  $\mu$ L de azul de tripano (dilución 1:10), se mezcla bien (éste es un punto crítico) y se toma un volumen suficiente para cubrir las 2 cuadrículas del hemocitómetro (**Figura 30**), se deja reposar 3 minutos y se procede a realizar la lectura.



*Figura 30. Cámara de Neubauer.*

En cada cuadrículado de la cámara hay 9 cuadros grandes. Tomar en cuenta las de las esquinas, se cuenta el número de células presentes en estos cuatro cuadrantes, se calcula un promedio y éste se multiplica por  $10^4$ , que es el factor de la cámara y por la dilución realizada, de esta forma se obtiene el número de células por mililitro.

#Células/mL: Promedio de los 4 cuadrantes  $\times 10^4$  \*Factor de dilución (100/10)

Reglas de control de calidad para realizar una buena cuenta celular: es conveniente considerar los siguientes cuidados en la cuenta celular:

- El número de células de los cuadros grandes de la cámara de Neubauer no debe sobrepasar de 30-40 células en promedio.
- La diferencia entre el número de células de los cuadros no debe ser mayor a 10 células.
- Cada cuadro grande tiene como límites 3 líneas, cuando las células se encuentran sobre éstas, solo se cuentan las células que estén sobre la línea interna, las que estén en el centro de las 3 líneas o sobre la línea externa no se consideran.
- Cuando se encuentran células en grupo, lo cual indica una mala tripsinización o que es la naturaleza de la línea celular, solo contar los grupos de máximo 3 células, si existieran grupos mayores conviene no usar ese cultivo.

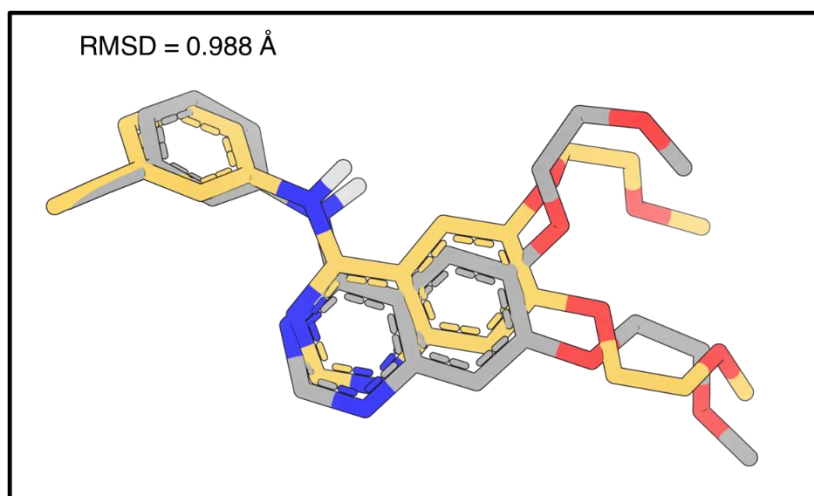


### Mantenimiento de las células.

La línea celular de cáncer de mama humano, MCF-7 y la línea celular de queratinocitos HaCaT, se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de Gibco™, que contenía suero fetal bovino al 10 % y 1% de una mezcla de penicilina y estreptomicina, a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

## ANEXO 3. Validación del acoplamiento molecular.

### Validación del acoplamiento molecular.



Mediante la herramienta de DockRMSD, se realizó la validación del acoplamiento molecular, con el ligando co-cristalizado, en la forma inactiva de la proteína de interés (PDB ID: 4HJO). El ligando co-cristalizado se representa en color gris, mientras que la conformación acoplada, usando Vina 1.2.1 en colores. Como puede observarse, en ambas conformaciones se conserva la posición de cada componente de la molécula, y puede notarse que los grupos 2-metoxietoxi son los que presentan mayor modificación, dada su posibilidad de rotación. Este resultado refleja la precisión y confiabilidad del método utilizado en el acoplamiento, para predecir la unión del ligando dentro del sitio activo del receptor.