

**“DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA  
ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO:  
ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE  
SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**M. EN C. DIANA LÓPEZ LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ LÓPEZ**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FECHA: MAYO 2024**



**EL TRABAJO EXPERIMENTAL DE LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 12 DE QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ LÓPEZ, Y EN EL LABORATORIO DE QUIMIOINFORMÁTICA Y DISEÑO DE FÁRMACOS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR PERTENECIENTE AL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS, EN COLABORACIÓN Y BAJO LA ASESORÍA DEL DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ.**

**EL PRESENTE PROYECTO CONTÓ CON EL APOYO DE LA BECA CON NÚMERO DE REGISTRO 667926 Y DEL PROYECTO CON NÚMERO DE REGISTRO 319550, OTORGADOS POR EL CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES, CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS (CONAHCyT).**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	1
1.1.1. Cáncer cervicouterino	1
1.1.2. Cáncer de mama	2
1.1.3. Cáncer cervicouterino y cáncer de mama en México y el mundo	2
1.1.4. Cáncer cervicouterino y su relación con el VPH	4
1.1.5. Diagnóstico de cáncer cervicouterino y cáncer de mama	8
1.1.6. Tratamientos contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama	8
1.2. Productos naturales contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama	10
1.3. Descubrimiento y desarrollo de fármacos	15
1.4. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)	17
1.4.1. Principales métodos de diseño de fármacos	17
1.4.2. Propiedades de un compuesto líder	19
1.4.3. SAR ( <i>Structure-Activity Relationships</i> )	21
1.4.4. Papel de unión de grupos funcionales	22
1.4.5. QSAR ( <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> )	24
1.4.6. Similitud molecular	25
1.4.7. Modelamiento molecular	26
1.4.8. Propiedades moleculares	27
1.5. Compuestos anticancerígenos descubiertos mediante DIFAC	28
2. ANTECEDENTES	29
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35

5.1. Objetivo general	35
5.2. Objetivos particulares	35
6. METODOLOGÍA	36
6.1. Cultivo de las líneas celulares	36
6.2. Evaluación del potencial citotóxico de los compuestos	36
6.3. Búsqueda de iridoides con reporte de citotoxicidad en cáncer cervicouterino	38
6.4. Análisis SAR de iridoides activos contra cáncer cervicouterino	38
6.5. Análisis conformacional, optimización geométrica y cálculo de energía	38
6.6. Descriptores moleculares	38
6.7. Gráficos del potencial electrostático molecular	39
6.8. Análisis de similitud molecular de iridoides	39
6.9. Construcción y validación del QSAR	39
6.9.1. Descriptores moleculares	39
6.9.2. Generación del modelo matemático	39
6.9.3. Validación estadística	40
6.9.4. Validación interna de la predicción	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1. Efecto citotóxico de los iridoides en las líneas celulares	42
7.2. Análisis SAR de diversos iridoides contra cáncer cervicouterino	53
7.3. Análisis de similitud molecular	58
7.4. Análisis QSAR de iridoides simples	67
7.5. Análisis QSAR de iridoides simples y glicosilados	70
7.6. Diseño de fármacos basado en el ligando de derivados de genipina	76
8. CONCLUSIONES	88
9. PERSPECTIVAS	89
10. REFERENCIAS	90
11. ANEXOS	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

#	Título	Pág.
1.	Cáncer cervicouterino. A) Estadio IB1, B) Estadio IB2.	1
2.	Esquema representativo de cáncer de mama en la mujer.	2
3.	Incidencia y mortalidad por distintos tipos de cáncer en mujeres mexicanas.	3
4.	Incidencia y mortalidad por distintos tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial.	4
5.	Desarrollo de cáncer por infección de VPH.	5
6.	Infección por VPH, desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical y su progresión a cáncer invasivo.	6
7.	Estructuras químicas de algunos flavonoides con actividad contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama.	13
8.	Estructuras químicas de algunos terpenoides y alcaloides con actividad contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama.	15
9.	Etapas principales del descubrimiento y desarrollo de fármacos.	16
10.	Diagrama general del diseño de fármacos con base en la estructura.	18
11.	Diagrama general del diseño de fármacos con base en el ligando.	20
12.	Ejemplo de SAR, de inhibidores del receptor tirosina cinasa VEGFR-2.	21
13.	Interacciones de unión que son posibles por un grupo carbonilo.	22
14.	Interacciones de enlace de hidrógeno posibles con las amidas.	22
15.	Interacciones de enlace de hidrógeno posibles con el ácido carboxílico.	23
16.	Análogos para evaluar las interacciones de unión por un ácido carboxílico.	23
17.	Interacciones de unión posibles por un éster.	24
18.	Ejemplo de correlación de la actividad biológica contra el log P y log P <sup>2</sup> .	25
19.	Diversas representaciones para visualizar estructuras químicas en 3D con el programa Spartan.	27
20.	Clasificación de iridoides.	29

<b>21.</b>	Modulación del cáncer por genipósido y genipina.	32
<b>22.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular CaLo.	43
<b>23.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular INBL.	44
<b>24.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular CaSki.	45
<b>25.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular HaCaT.	46
<b>26.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular MCF-7.	47
<b>27.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular BT-549.	48
<b>28.</b>	Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular MDA-MB-231.	49
<b>29.</b>	Micrografías de las líneas celulares evaluadas con genipina por 72 h a la concentración más alta probada.	50
<b>30.</b>	Estructuras químicas 2D de los iridoides ensayados contra la línea celular HeLa, de los cuales genipina y genipósido son los iridoides centrales en este trabajo.	55
<b>31.</b>	Estructuras 2D y 3D de iridoides simples incluyendo genipina evaluados contra la línea celular HeLa.	56
<b>32.</b>	Estructuras 2D y 3D de la genipina y genipósido evaluados contra la línea celular HeLa.	56
<b>33.</b>	Estructuras 2D de los iridoides glicosilados.	57
<b>34.</b>	Estructuras 3D de iridoides simples incluyendo genipina.	59
<b>35.</b>	Iso-superficie del mapa del potencial electrostático de -10 kcal/mol de iridoides simples.	60
<b>36.</b>	Mapa del potencial electrostático de los iridoides simples.	61
<b>37.</b>	Estructuras 3D de la genipina y genipósido.	62
<b>38.</b>	Iso-superficie del potencial electrostático molecular de -10 kcal/mol de (A) Genipina, (B) Genipósido.	63

<b>39.</b>	Mapa del potencial electrostático molecular de (A) Genipina, (B) Genipósido.	64
<b>40.</b>	Enlaces de hidrógeno intramoleculares en (A) Genipina, (B) Genipósido.	64
<b>41.</b>	Alineamiento de genipina con iridoides simples eufrasina, campsinol, artselaenina A y artselaenina B.	67
<b>42.</b>	Correlación lineal de la actividad calculada ( $CI_{50calc}$ ) contra la actividad experimental ( $CI_{50exp}$ ).	69
<b>43.</b>	Correlación lineal de la actividad calculada ( $Y_{calc}$ ) contra la actividad experimental ( $Y_{exp}$ ).	73
<b>44.</b>	Correlación lineal de la actividad predicha ( $Y_{pred}$ ) contra la actividad experimental ( $Y_{exp}$ ).	74
<b>45.</b>	Gráfico de William de los residuales de predicción contra los valores de apalancamiento de iridoides.	75
<b>46.</b>	Primera estrategia en el diseño de derivados de genipina.	76
<b>47.</b>	Segunda estrategia en el diseño de derivados de genipina.	78
<b>48.</b>	Tercera estrategia en el diseño de derivados de genipina.	79
<b>49.</b>	Cuarta etapa en el diseño de derivados de genipina.	80
<b>50.</b>	Quinta etapa en el diseño de derivados de genipina.	81
<b>51.</b>	Sexta etapa en el diseño de derivados de genipina.	81
<b>52.</b>	Séptima etapa en el diseño de derivados de genipina.	82
<b>53.</b>	Octava estrategia en el diseño de derivados de genipina.	82
<b>54.</b>	Novena etapa en el diseño de derivados de genipina.	83
<b>55.</b>	Estructuras químicas de los mejores iridoides diseñados con base en genipina.	84
<b>56.</b>	Alineamiento de artselaenina A con los mejores iridoides diseñados.	86

## ÍNDICE DE TABLAS

#	Título	Pág.
1.	Concentraciones medias inhibitorias ( $CI_{50}$ : $\mu M$ ) de los compuestos ensayados contra las líneas celulares de cáncer cervicouterino y de cáncer de mama.	43
2.	Iridoides con actividad citotóxica contra la línea celular HeLa.	53
3.	Descriptores moleculares de iridoides simples con actividad citotóxica reportada contra HeLa.	58
4.	Descriptores moleculares de genipina y genipósido.	62
5.	Descriptores moleculares de iridoides glicosilados y genipósido probados contra la línea celular HeLa.	65
6.	Coordenadas esféricas polares y magnitud del vector del dipolo de los iridoides simples activos y sus valores de actividad biológica experimental ( $CI_{50}$ ).	68
7.	Valores de los descriptores moleculares presentes en el modelo QSAR y la actividad biológica ( $CI_{50}$ ) de iridoides simples y glicosilados.	71
8.	Valores de las actividades experimental citotóxica $Y_{exp}$ , calculada $Y_{calc}$ , y predicha $Y_{pred}$ , y los valores residual $_{calc}$ y residual $_{pred}$ .	72
9.	Descriptores moleculares de los mejores iridoides diseñados.	85

## RESUMEN

Los iridoides genipósido y su aglicona genipina han sido evaluados en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer; sin embargo, éstos no habían sido probados contra diversas líneas celulares de cáncer cervicouterino y cáncer de mama. Ante la necesidad de descubrir nuevas moléculas con actividad citotóxica contra el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, que son los principales tipos de neoplasias que afectan a las mujeres a nivel mundial y en México, se propuso la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de genipósido y genipina contra tres líneas de cáncer cervicouterino y tres líneas de cáncer de mama. De las líneas ensayadas, las líneas celulares más sensibles a genipina, fueron CaSki, CaLo, MCF-7 y BT-549, cuyo valor de  $CI_{50}$  se encontró en un intervalo de concentración de 66-75  $\mu$ M. Sin embargo, genipósido no fue activo contra ninguna de las líneas celulares evaluadas.

Debido a que no existen reportes del blanco biológico de estos dos iridoides contra estos tipos de cáncer, se decidió hacer un estudio computacional con base en el ligando, con métodos *in silico*, tales como un análisis de relación estructura-actividad (SAR), análisis de similitud molecular y estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR). Para lo cual se buscaron iridoides evaluados en las líneas celulares ensayadas en el presente trabajo; sin embargo, se seleccionaron iridoides evaluados contra HeLa, dado el número de moléculas encontradas y la similitud estructural con genipina y genipósido. Derivado del SAR se encontró que sustituyentes como aldehído o ácido carboxílico, hidroxilos en C5, C6, C7 y C8, así como la ausencia del doble enlace en C7-C8 eran relevantes para la actividad citotóxica de iridoides similares a genipina y genipósido. Con respecto a los análisis de similitud molecular se encontró que el momento dipolar es de gran relevancia para la actividad citotóxica de los iridoides, así como descriptores asociados a la polaridad de las moléculas. Por otro lado, derivado del estudio QSAR, se obtuvo un modelo matemático que permite predecir la actividad biológica contra HeLa, y que confirma, una vez más, que el momento dipolar es el descriptor molecular principal que afecta de manera positiva la actividad citotóxica de los iridoides. Hasta nuestro conocimiento, no se había realizado previamente ningún diseño racional de fármacos con base en el ligando, por lo que en el presente trabajo se propuso el diseño y optimización de nuevos iridoides con base en la estructura de genipina como compuesto líder, que dio como resultado 12 nuevos iridoides diseñados con potencial actividad predicha.

## ABSTRACT

The iridoids geniposide and its aglycone genipin have been evaluated in cell lines of different types of cancer; however, they had not been tested against several cervical and breast cancer cell lines. Given the need to discover new molecules with cytotoxic activity against breast and cervical cancer—two of the main neoplasms affecting women worldwide and in Mexico—the present study proposed an *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of geniposide and genipin against three cervical cancer lines and three breast cancer lines was proposed. Of the lines tested, the cell lines most sensitive to genipin were CaSki, CaLo, MCF-7 and BT-549, whose  $IC_{50}$  value was found in a concentration range of 66-75  $\mu$ M. However, geniposide was not active against any of the cell lines tested.

Since there are no reports of the biological target of these two iridoids against these types of cancer, it was decided to perform a ligand-based computational study with *in silico* methods, such as a structure-activity relationship (SAR) analysis, molecular similarity analysis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies. For which iridoids evaluated in the cell lines tested in the present work were sought; however, iridoids evaluated against HeLa were selected, given the number of molecules found and the structural similarity with genipin and geniposide. Derived from a SAR it was found that substituents such as aldehyde or carboxylic acid, hydroxyls at C5, C6, C7 and C8, as well as the absence of the double bond at C7-C8 were relevant for the cytotoxic activity of iridoids similar to genipin and geniposide. With respect to molecular similarity analyses, it was found that the dipole moment is of great relevance for the cytotoxic activity of iridoids, as well as descriptors associated with the polarity of the molecules.

On the other hand, derived from the QSAR study, a mathematical model was obtained that allows predicting the biological activity against HeLa, and confirms, once again, that the dipole moment is the main molecular descriptor that positively affects the cytotoxic activity of iridoids. To our knowledge, no rational ligand-based drug design had been previously performed, so in the present work we proposed the design and optimization of new iridoids based on the genipin structure as the lead compound, which resulted in 12 new designed iridoids with potential predicted activity.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas que pueden tener su origen en prácticamente cualquier órgano o tejido del cuerpo, y que se caracteriza por la proliferación sin control de células anormales (OMS, 2024). Cuando estas células anormales sobrepasan sus límites normales e invaden tejidos adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos del cuerpo, entonces se dice que ocurre un proceso denominado metástasis.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Los tipos de cáncer más frecuentes entre los hombres son el cáncer de pulmón, de próstata, colorrectal, de estómago y de hígado; y los más frecuentes en las mujeres son el cáncer de mama, colorrectal, de pulmón, cervicouterino y de tiroides (OMS, 2024).

### 1.1.1 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad neoplásica maligna que tiene su origen en el cuello uterino o cérvix, que es la entrada al útero a través de la vagina (Figura 1).

La progresión natural de esta enfermedad puede conducir a la muerte y cerca del 85% de muertes por este tipo de cáncer ocurren en países en desarrollo o de bajos recursos (Denny & Prendiville, 2015). El CaCu es una enfermedad completamente prevenible y curable, a un costo y riesgo bajo (siempre y cuando se ejecuten métodos de tamizaje para mujeres asintomáticas, a la par con un diagnóstico, tratamiento y seguimiento acertados).

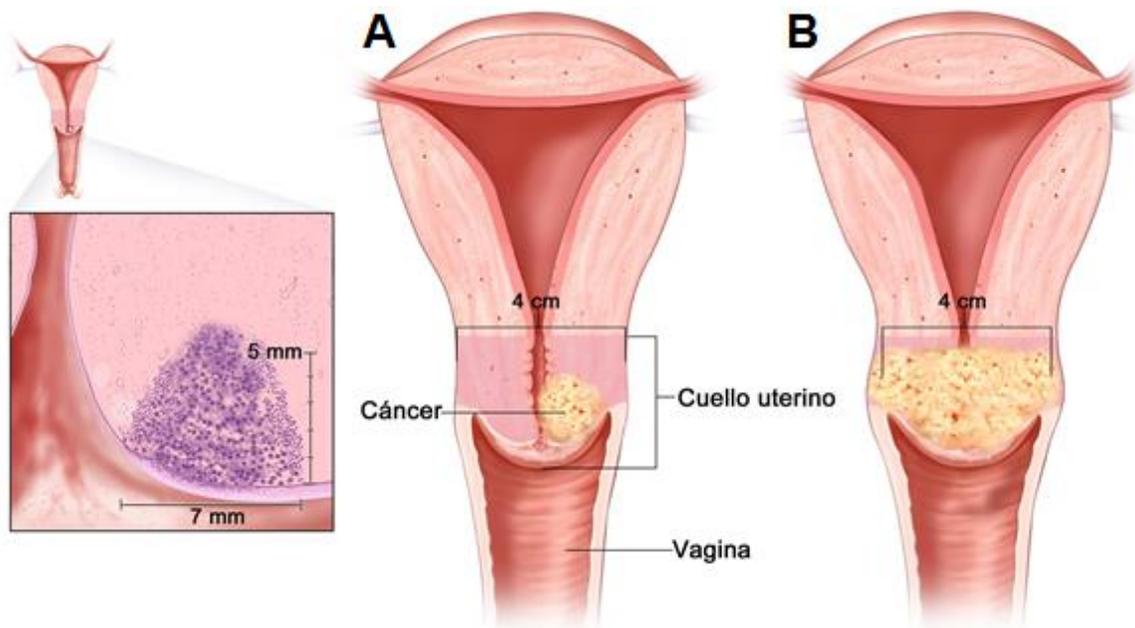


Figura 1. Cáncer cervicouterino. A) Estadio IB1, B) Estadio IB2.

### 1.1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa) es un tipo de neoplasia que se forma en las células de las glándulas mamarias (Figura 2) y es la morbilidad por cáncer más común en mujeres en todo el mundo (OMS, 2024). Actualmente, se presenta tanto en mujeres como en hombres, aunque sigue siendo más prevalente en mujeres. Este tipo de cáncer en etapas tempranas se considera potencialmente curable.

El cáncer de mama se puede clasificar en 3 principales subtipos con base en la presencia o ausencia de marcadores moleculares: para receptores de las hormonas estrógeno o progesterona y del factor de crecimiento humano epidermal 2 (ERBB2, antes llamado HER2), de los cuales el 65% de los pacientes resultan positivos al receptor hormonal estrógeno (ER+) o progesterona (PR+) y negativo para ERBB2, el 20% positivo para ERBB2+, y el 15% triple negativo, es decir, se trata de tumores que carecen de los 3 marcadores moleculares estándar (ER-, PR-, ERBB2-) (Barzaman *et al.*, 2020).

El CaMa triple negativo es el subtipo más agresivo, que se caracteriza por las tasas más altas de recurrencia y muerte (Leon-Ferre & Goetz, 2023).

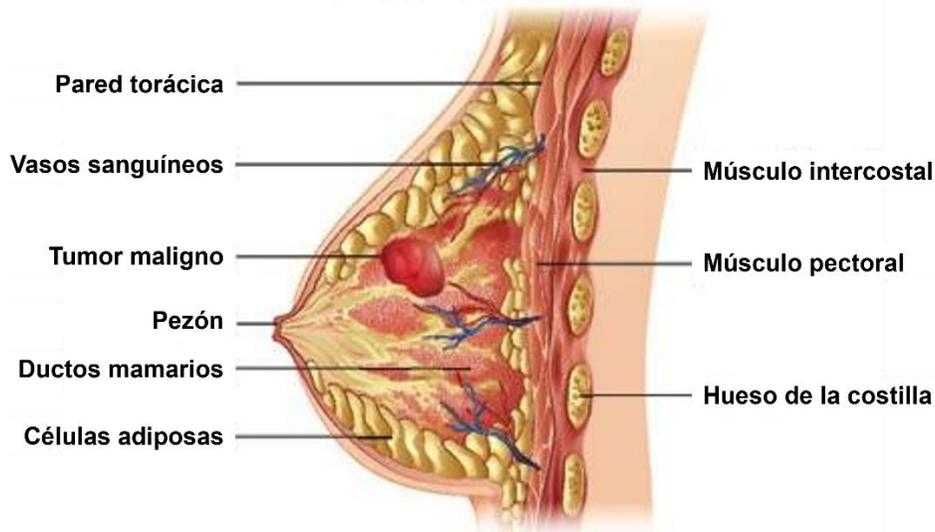
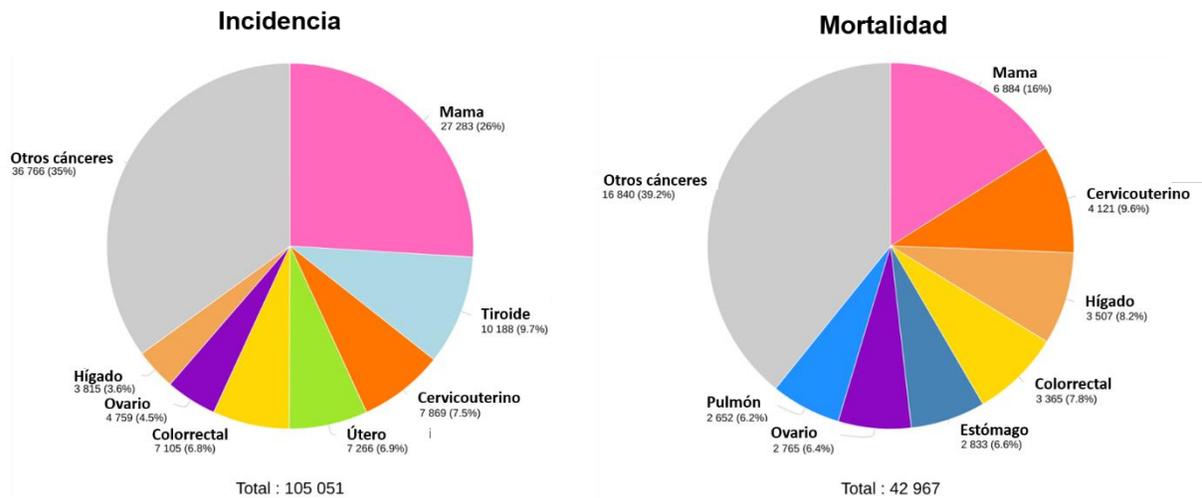


Figura 2. Esquema representativo de cáncer de mama en la mujer.

### 1.1.3 Cáncer cervicouterino y cáncer de mama en México y el mundo

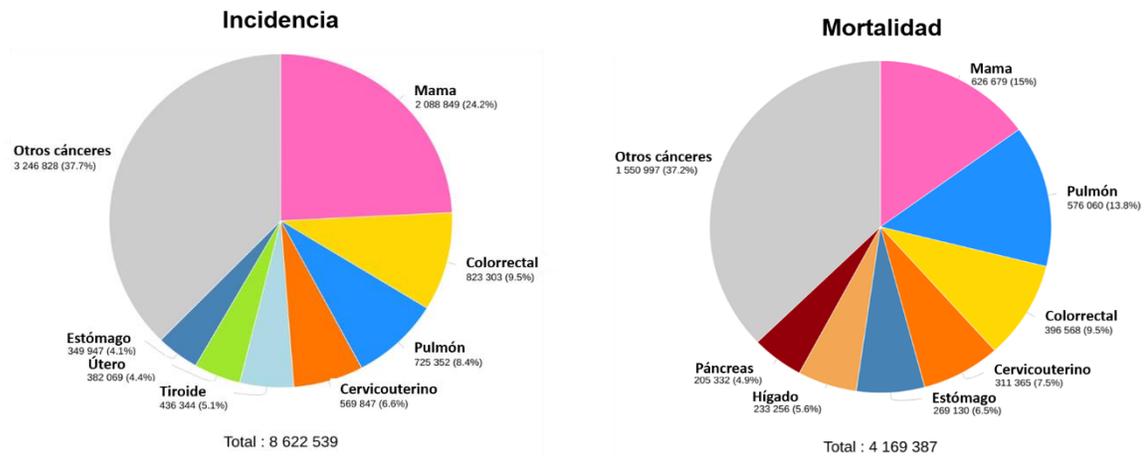
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2022 en nuestro país el cáncer cervicouterino ocupó el tercer lugar en incidencia (7.5%) y el segundo lugar en mortalidad (9.6%), de un total de 105,051 nuevos casos de cáncer y 42,967 muertes por cáncer en mujeres (Figura 3); el tipo de neoplasia que ocupa el primer lugar es el cáncer de mama tanto en incidencia (26%) y en mortalidad (16%) (Cancer Today, 2022).

La edad promedio en incidencia de CaCu es de 49 años, mostrando una mayor incidencia en mujeres entre los 50-59 años, y la edad promedio de mortalidad es de 59 años. Se estima que el 40% de los casos de CaCu son diagnosticados en etapas tempranas, y 6 de cada 10 casos de CaCu son detectados en etapas avanzadas (SPPS, 2016). En cuanto al cáncer de mama, éste tiene mayor incidencia y un mayor número de casos con invasividad en mujeres con edad entre 60-69 años, y una mayor tasa de mortalidad en mujeres mayores de 80 años (DeSantis *et al.*, 2019).



**Figura 3.** Incidencia y mortalidad por distintos tipos de cáncer en mujeres mexicanas [Tomada de Cancer Today, 2022].

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino ocupó en el 2022 el cuarto lugar en incidencia (6.6% de un total de 8,622,539 nuevos casos de cáncer) y en mortalidad (7.5% de un total de 4,169,387 muertes por cáncer) entre las neoplasias más comunes en mujeres (Figura 4); el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia (24.2%) y mortalidad (15%) a nivel mundial (Cancer Today, 2022).



**Figura 4.** Incidencia y mortalidad por distintos tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial [Tomada de Cancer Today, 2022].

#### 1.1.4 Cáncer cervicouterino y su relación con el VPH

El cáncer cervicouterino se encuentra asociado a la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH). Existen más de 100 genotipos de VPH caracterizados a nivel genético, de los cuales 15 genotipos de este virus están relacionados con CaCu (Burk *et al.*, 2009); a estos genotipos se les llama carcinogénicos o de alto riesgo (Scarinci *et al.*, 2010).

#### Virus del Papiloma Humano

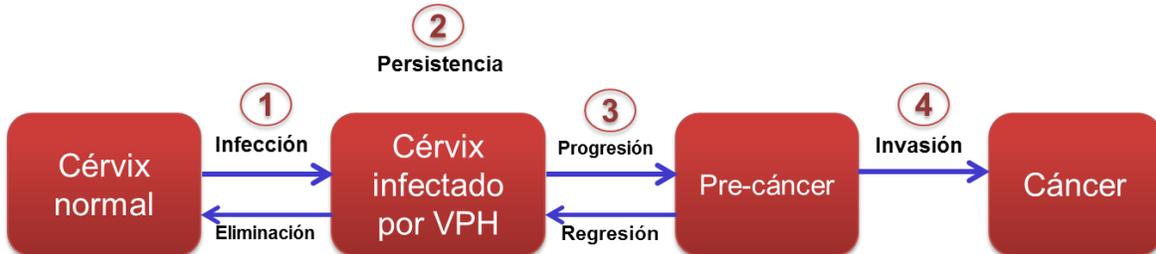
El Virus del Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae* e infecta células epiteliales del ser humano. El VPH actúa interrumpiendo el control normal del ciclo celular, promoviendo la división celular descontrolada y la acumulación del daño genético (Crosbie *et al.*, 2013).

La partícula viral del VPH tiene una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro cercano a 55 nm y que contiene el DNA viral. Los capsómeros están formados por dos proteínas estructurales: L1 en su mayoría y L2. El VPH es relativamente estable y, ya que no tiene envoltura, puede permanecer infeccioso en un ambiente húmedo por meses, tal como lo es el cérvix (Doorbar, 2005).

Los VPH de alto riesgo incluyen los tipos virales 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 y 69, también llamados oncogénicos o carcinogénicos, por su detección en mujeres con cáncer cervicouterino (Muñoz *et al.*, 2004; Salcedo *et al.*, 2014), de los cuales se sabe que los tipos 16 y 18 son los causantes del 70% de CaCu a nivel mundial y de las lesiones precancerosas en el cérvix (Crosbie *et al.*, 2013). En México, la genotipificación del VPH en 2,956 muestras cervicales mostró una prevalencia del 39.4%

para VPH16 y 7.5% para VPH18, y se reportaron otros genotipos con alta prevalencia como son el VPH31 con 7.1%, el VPH59 con 4.9% y el VPH58 con 3.2% que no habían sido reportado antes a nivel mundial (Salcedo et al, 2014). Los genotipos de VPH de bajo riesgo que se han reportado son: 6, 11, 26, 30, 42, 43, 54, 55, 61, 62, 66, 67, 67, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 91 y 97 (Salcedo et al., 2014).

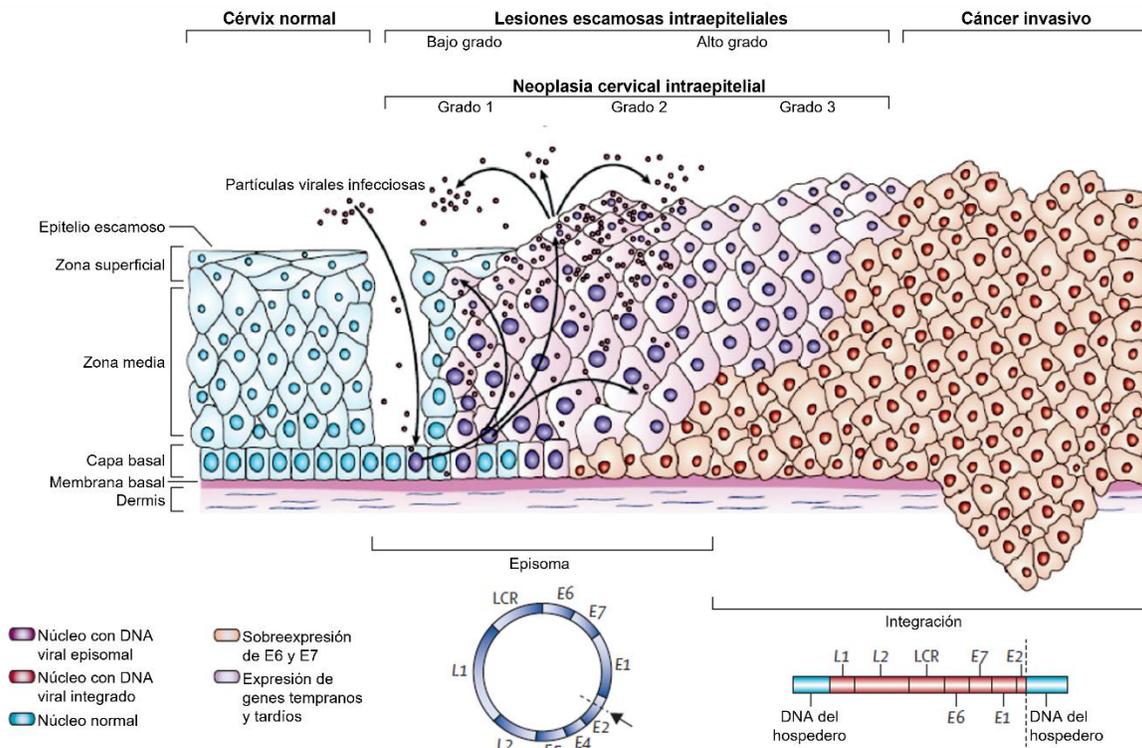
El nuevo modelo de carcinogénesis cervical por infección de VPH está representado por: 1) la infección con VPH, 2) la persistencia del VPH, 3) la progresión de la infección persistente a una lesión precancerosa cervical y 4) la invasión del cáncer (Scarinci *et al.*, 2010; Dasari *et al.*, 2015). Después de la infección por VPH puede haber una regresión espontánea en menos de un año después de la infección; sin embargo, una proporción de las infecciones por VPH de alto riesgo pueden volverse persistentes y progresar a lesiones precancerosas de alto grado y, consecuentemente, convertirse en un cáncer invasivo (Figura 5).



**Figura 5.** Desarrollo de cáncer por infección de VPH [Adaptada de Dasari *et al.*, 2015].

De acuerdo con Crosbie y colaboradores (2013) las células basales en el epitelio cervical se encuentran en la membrana basal, la cual es sostenida por la dermis. El VPH ingresa a las células basales mediante microabrasiones en el epitelio cervical. Después de la internalización de la infección, el DNA viral se libera de la cápside y se transporta al núcleo como material genético libre o episomas cromosomales. La expresión de los genes tempranos se controla en las células epiteliales basales con la amplificación del DNA viral. La replicación ocurre sólo en las células en diferenciación que madurarán y envejecerán. El VPH codifica dos proteínas, E6 y E7, que promueven la proliferación celular, prolonga la progresión del ciclo celular y previene la apoptosis (o muerte celular). La célula se vuelve entonces permisiva para la replicación viral y cientos o aún miles de copias del DNA del VPH se producen en una sola célula. Las proteínas de la cápside L1 y L2, se expresan en las capas más superficiales del epitelio, donde ocurre el ensamblaje del virus, y así es como las nuevas partículas virales (llamadas viriones) se liberan desde la superficie epitelial. Este ciclo viral requiere de 2-3 semanas, durante este tiempo una célula cervical se traslada de la capa basal a las capas más superficiales del epitelio, donde madura, envejece y luego muere (Figura 6).

Las lesiones intraepiteliales de bajo grado apoyan la replicación viral productiva; en ocasiones las infecciones con VPH de alto riesgo progresan a neoplasias intraepiteliales de alto grado. La progresión de las lesiones no tratadas a cáncer microinvasivo e invasivo se asocia con la integración del DNA del VPH a los cromosomas del organismo hospedero (células con núcleo rojo en la Figura 4), además de la relación con la pérdida de E2, y la subsecuente sobreexpresión de la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Figura 6).



**Figura 6.** Infección por VPH, desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical y su progresión a cáncer invasivo [Tomada de Crosbie *et al.*, 2013].

El esquema de la Figura 6 muestra el desarrollo de distintos grados de neoplasia intraepitelial cervical (GPC, 2010), los cuales son:

- **NIC1** (Grado 1) es el tipo de menor riesgo, representa sólo una displasia leve o crecimiento celular anormal 1 y es considerado una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL). Se caracteriza por cubrir al 1/3 basal del epitelio cervical.
- **NIC2** (Grado 2) es considerado una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL) y representa una displasia moderada que cubre los 2/3 basales del epitelio cervical.
- **NIC3** (Grado 3), este tipo de lesión escamosa intraepitelial de alto grado o riesgo representa una displasia severa y cubre más de los 2/3 de todo el epitelio cervical,

en algunos casos cubre todo el grosor del revestimiento cervical. Se considera un carcinoma *in situ*.

### **Factores de riesgo para la infección del VPH y su progresión a CaCu**

De acuerdo con López-Saavedra & Lizano-Soberón (2006), el riesgo de ser infectado por VPH y desarrollar CaCu está directamente influenciado por la actividad sexual, algunos factores de riesgo son:

- a. Promiscuidad: Existe una fuerte relación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero sexual a lo largo de su vida y la adquisición del VPH.
- b. Haber comenzado su actividad sexual a edad temprana (antes de los 18 años).
- c. Poseer un historial de otras enfermedades de transmisión sexual.
- d. Tener verrugas genitales o examen de Papanicolaou con resultados anormales.
- e. Edad: La infección con VPH es común en mujeres sexualmente activas de 18-30 años, después de los 30 años disminuye la prevalencia de la infección. El cáncer cervicouterino comúnmente aparece después de los 35 años, lo que parece indicar una infección a edad temprana y su consecuente progresión lenta a cáncer.
- f. Tener una pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
- g. Persistencia viral: Los VPH de alto riesgo tienden a persistir, conllevando a la progresión a cáncer.
- h. Haber usado de forma prolongada anticonceptivos orales combinados. Se ha reportado la relación del uso de estos anticonceptivos y la alta positividad al DNA del VPH.
- i. Tener coinfección con otros virus, tal como el herpes simple tipo 2, citomegalovirus, herpesvirus humanos tipo 6 y 7, detectados en el cuello uterino.
- j. Carga viral. Los virus de alto riesgo como el VPH 16 pueden alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales.
- k. Tabaquismo, tiene un papel comprometedor del sistema inmunológico en la mujer.
- l. Inmunodeficiencia (mujeres con VIH y que hayan recibido un trasplante).

Además de estos factores, también las mujeres sexualmente activas menores de 30 años sin antecedente de control citológico, mujeres que tuvieron exposición al dietil-estilbestrol en útero y aquellas que también tienen deficiencia de ácido fólico tienen la posibilidad de tener cáncer cervicouterino (GPC, 2010).

## **Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama**

Entre los principales factores de riesgo se encuentra principalmente la edad, seguido de una baja paridad y bajas tasas de amamantamiento (Becker, 2015).

### **1.1.5 Diagnóstico de cáncer cervicouterino y de cáncer de mama**

La citología cervical convencional que consiste en la colposcopia y papanicolaou sigue siendo el método de elección de tamizaje debido a su bajo costo, y debe realizarse dentro de los tres años después de la primera relación sexual. Esta citología se realiza anualmente hasta que se acumulen tres pruebas negativas técnicamente satisfactorias en una paciente, y posteriormente se recomiendan cada dos o tres años; mujeres tratadas previamente por NIC2, NIC3 o cáncer continúan en riesgo de persistencia de la enfermedad o recurrencia por lo menos 20 años después del tratamiento y deben continuar con el tamizaje anual por lo menos durante 20 años (GPC, 2010).

Para el diagnóstico del cáncer de mama, se emplea una mamografía, un ultrasonido mamario, así como una imagen por resonancia magnética de la mama, previamente con el hallazgo de una masa palpable en la mama. Otras presentaciones menos comunes del cáncer de mama son: masa axilar palpable, secreción del pezón, pezón invertido, asimetría en la mama, eritema en la piel de la mama, y engrosamiento de la piel de la mama.

Se requiere realizar la confirmación histológica o exclusión de la malignidad, para lo cual se requiere realizar una biopsia guiada por ultrasonido. Actualmente, se tienen dos blancos moleculares principales: el receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ), el cual se expresa en aproximadamente el 70% de los cánceres de mama invasivos. La expresión del receptor de progesterona (PR), el cual es también un marcador de la señalización de  $ER\alpha$ ; el segundo principal blanco molecular es el factor de crecimiento epidermal 2 (ERBB2). El cáncer de mama triple negativo comprende el 15% de los tumores de mama, y se caracteriza por la falta de expresión de ER, PR, o ERBB2 (Waks & Winer, 2019).

### **1.1.6 Tratamientos contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama**

De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social, toda paciente con sospecha de tener cáncer cervicouterino debe realizarse una colposcopia para ser corroborado, además de la toma de estudio histopatológico como lo es la biopsia dirigida, curetaje endocervical y/o como diagnóstico (GPC, 2017). Para efectuar la estadificación del cáncer, se debe considerar el tamaño tumoral, la infiltración a parametrios, extensión a pared vaginal, extensión a pared pélvica, evaluación ganglionar, así como la enfermedad a distancia; se recomienda utilizar los criterios emitidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO, 2010). Cuando se produce metástasis en CaCu en etapas localmente

avanzadas, el porcentaje de metástasis en los órganos son: pulmonares (5-21%), óseas (16%), ganglios paraórticos (15-25%), cavidad abdominal (8%) y ganglios supraclaviculares (7%).

Con el fin de determinar el tratamiento adecuado para el cáncer de mama se deben de considerar algunos puntos, como lo es la ubicación y tamaño del tumor, la histología, y las propiedades específicas del tumor (Becker, 2015); además, si el cáncer se ha propagado a los nódulos y ganglios linfáticos, y si el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo

Algunos tratamientos para pacientes con cáncer cervicouterino y cáncer de mama de acuerdo con el estadio son:

- a. **Cirugía:** Consiste en un procedimiento en el cual un médico cirujano remueve el tumor del cuerpo de la paciente afectada. Como cervical en los primeros estadios del CaCu. Histerectomía PIVER I o tipo A, o PIVER II o tipo B, o PIVER III o tipo C, dependiendo el estadio del CaCu. Traquelectomía Pélvica Bilateral. Éstos normalmente se efectúan en estadios iniciales del cáncer (GPC, 2017).

Con respecto al cáncer de mama, se tiene como estándar de cuidado, la conservación de la mama en caso de ser posible, y su reconstrucción, en caso de extirpar la mama, entonces se busca su reconstrucción.

- b. **Quimioterapia:** Este tipo de tratamiento emplea fármacos para eliminar a las células cancerosas, generalmente se administran de forma intravenosa o por vía oral, de esta manera el fármaco llegará al torrente sanguíneo y a todas las partes del cuerpo; o bien, dependiendo el destino del fármaco, de forma intraperitoneal o intra-arterial (NIH, 2017). La quimioterapia es más eficaz cuando se administran combinaciones de fármacos (ACS, 2017). Se realiza en estadios clínicos avanzados, y se administra concomitante con la radioterapia. También se administra en enfermedades recurrentes, que consisten en el recrecimiento local del tumor o el desarrollo de metástasis a distancia, seis meses o más después de la regresión completa de la lesión tratada. En el Instituto Mexicano del Seguro Social se administran diversos fármacos para tratar cáncer cervicouterino tales como el ácido zolendróico, bevacizumab, hidralazina con valproato de magnesio e ifosfamida éstos son los que se encuentran en el Cuadro Básico de Medicamentos (GPC, 2017; CNIS, 2023). Para cáncer de mama, se indica idarubicina, ifosfamida, lapatinib, letrozol, megestrol, melfalán, entre otros (CNIS, 2023).

- c. **Radioterapia:** Consiste en el uso de dosis altas de radiación para matar las células cancerosas o disminuir tumores (NIH, 2017). Puede ser externa, además de una braquiterapia que consiste en la aplicación de una fuente de radiación sólida en el sitio de afección tumoral y es parte del tratamiento de CaCu localmente avanzado, ya que permite alcanzar una dosis mayor de radiación al cuello uterino, evitando el tejido sano adyacente (GPC, 2017). Cuando la fuente de radiación es líquida el

tratamiento se llama terapia sistémica, ya que viaja en la sangre a los tejidos a través del cuerpo (NIH, 2017).

- d. **Inmunoterapia:** Este tipo de tratamiento fortalece el sistema inmunológico para combatir el cáncer. Una opción es la administración de anticuerpos monoclonales que se unen a blancos específicos del cuerpo para causar una respuesta inmune que destruya las células cancerosas, o de citocinas que son proteínas producidas por las células del organismo y que también participan en la respuesta inmune normal del cuerpo (pueden ser interleucinas o interferones). También se pueden administrar vacunas terapéuticas (concomitante a la quimioterapia y radioterapia), las cuales promueven la respuesta del sistema inmune a las células cancerosas (NIH, 2017), que pueden ser vacunas basadas en péptidos/proteínas, o en RNA/DNA, además de vectores virales/bacterianos, y aquéllas producidas por derivados de plantas (Vici *et al.*, 2014).

## 1.2 Productos naturales contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama

Las plantas se han empleado para prevenir y tratar diversas enfermedades por miles de años, y son fuentes ricas en componentes bioactivos con efectos benéficos para la salud (Wang *et al.*, 2012). Muchos de los compuestos obtenidos de plantas han sido activos contra el cáncer. Existen diversos productos naturales que han sido evaluados contra cáncer cervicouterino en ensayos *in vitro* y de los cuales se conoce sus mecanismos principales (He, Xia & Li, 2021).

Por otro lado, existen diversos productos naturales caracterizados por su diversidad estructural, que han sido aislados de varias especies y que han mostrado ser activos contra el cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2020).

### FLAVONOIDES:

La Figura 7 muestra las estructuras de algunos flavonoides con actividad contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama evaluados en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*.

A continuación, se enlistan algunos flavonoides evaluados contra cáncer cervicouterino:

- La baicaleina es un flavonoide derivado de las raíces de *Scutellaria baicalensis* que es una de las plantas usada en la medicina tradicional de China, y ha mostrado diversas actividades farmacológicas como la inhibición de la proliferación celular y de la migración, la inducción de apoptosis y el arresto de ciclo celular. Este producto natural inhibe la sobreexpresión de la ciclina D1 y arresta a las células en la fase G0/G1 a través de las vías de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y AKT/GSK-3 $\beta$  para suprimir la proliferación e inducir apoptosis en las líneas celulares HeLa y SiHa (Wu *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2019). En células HeLa, se evaluó a una concentración de

100  $\mu\text{M}$  incrementó la activación de la caspasa 3, la escisión de PARP y disminuyó la expresión de cIAP-1, cIAP-2, FLIP, Bcl-2, MMP2, MMP9, caspasa 8, Fas, FasL, VEGF, COX-2, ciclina D1, IL-8, MCP1. Inhibió NF- $\kappa$ B, ERK1/2 y bloqueó la fase G1 del ciclo celular (Peng *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). En ratones hembra BALB/c se implantaron células HeLa y fueron tratados con 10 mg/kg por 28 días obteniendo una disminución del crecimiento del tumor (Yu *et al.*, 2018).

- La wogonina es un monoflavonoide, el cual ha sido evaluado en células SiHa y CaSki en un intervalo de concentración de 0-100  $\mu\text{M}$ , en las cuales incrementó la expresión de Bax, activó las caspasas 3 y 9, la liberación de Cyt c, así como la escisión de PARP (Kim *et al.*, 2013). También provocó la disminución de la expresión de MMP y Bcl-2. Otro estudio evaluó también en células SiHa y CaSki en un intervalo de concentración de 40-160  $\mu\text{M}$ , y se obtuvo un incremento de Bax, p53, p21, p27, pRB y una disminución de E6 y E7 (Yang *et al.*, 2009). Por otro lado, mejoró el efecto de cisplatino en la inducción de apoptosis a través del mecanismo dependiente de las especies reactivas de oxígeno (ROS; He *et al.*, 2012).
- La apigenina es un flavonoide natural encontrado en muchas plantas comestibles, así como vegetales y frutas, fue probado en cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa (CI<sub>50</sub>: 10  $\mu\text{M}$ ), SiHa (CI<sub>50</sub>: 68  $\mu\text{M}$ ), CaSki (CI<sub>50</sub>: 76  $\mu\text{M}$ ) y C33A (CI<sub>50</sub>: 40  $\mu\text{M}$ ). En estas líneas celulares incrementó los niveles de ROS, y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y disminuyó los niveles de MMP (Souza *et al.*, 2017). En un modelo *in vivo* de ratones hembra BALB/c con desarrollo de tumor de células HeLa a una dosis de 100 mg/kg por 30 días se obtuvo una disminución de Er $\beta$ /Era, así como una disminución del crecimiento del tumor (Zhang *et al.*, 2020).
- La 7-glucósido de apigenina que es un derivado glucosilado de la apigenina, fue evaluado en células HeLa, y su CI<sub>50</sub> fue de 47.26  $\mu\text{M}$ , en las cuales incrementó los niveles de ROS, Fas, FasL, TNF- $\alpha$ , TNF-r1, FADD, RADD, la activación de caspasas 3 y 9; disminuyó los niveles de Bcl-2, Bcl-xl, ciclinas (A, D, E), CDK2/6, MMP, e inhibió PTEN, PI3K y AKT (Zhang *et al.*, 2020).
- La naringina es un flavonoide glicosilado que puede ser aislado de frutas cítricas tales como la naranja, la toronja, el limón y la lima, y ha sido probado en células SiHa (CI<sub>50</sub>: 750  $\mu\text{M}$ ), en las cuales incrementó p53, Bax, Fas, FADD, y activó las caspasas 3, 8 y 9 (Ghanbari-Movahed *et al.*, 2021).
- La *silibinina* es un flavonoide polifenólico aislado de frutas y semillas de *Silybum marianum*, ha sido evaluada en células HeLa (CI<sub>50</sub>: 250  $\mu\text{M}$ ), y SiHa (CI<sub>50</sub>: 195  $\mu\text{M}$ ). En estas líneas celulares produjo un incremento en la activación de Drp1, y una disminución de ATP, MMP, ROS, CDK1, Cdc25C, ciclina B1 y condujo un arresto en G2/M (You *et al.*, 2020).
- El kaempferol es un flavonol natural que se encuentra en muchas familias de plantas, y ha mostrado tener actividad antitumoral, anti-inflamatoria y antioxidante. En células HeLa (CI<sub>50</sub>: 10.48  $\mu\text{M}$ ), provocó un incremento en la expresión de Bax y p53, y una disminución en Bcl-1, hTERT, así como la inhibición de PI3K/AKT (Kashafi *et al.*, 2017).

- La quercetina es un compuesto polifenólico presente en vegetales y frutas con diversas actividades antialérgicas, anti-inflamatorias y antitumorales. Este producto natural ha sido evaluado en células HeLa ( $CI_{50}$ :  $110.38 \pm 0.66 \mu\text{M}$ ), en las cuales incrementó los niveles de Bax, p53, ROS y activó las caspasas 3, provocó la liberación de Cyt c, y disminuyó Bcl-2, AKT, MMP, así también bloqueó el ciclo celular en la fase G2/M (Bishayee *et al.*, 2013).
- La fisetina es un flavonol natural que se encuentra en vegetales, frutas y nueces, y ha mostrado tener actividad antitumoral, anti-invasiva, anti-angiogénica, antidiabética, cardioprotectora y neuroprotectora. Este flavonol fue probado en células HeLa ( $CI_{50}$ :  $36 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), donde provocó un incremento en la expresión de ERK1/2, y la activación de las caspasas 3 y 8. En ensayos *in vivo* en ratones macho BALB/c con implante de células HeLa, la fisetina provocó la reducción del crecimiento del tumor con tasas de inhibición de 82.65% y 92.62% (Ying *et al.*, 2012).
- El galato de epigallocatequina (EGCG) es un compuesto flavonol presente en el té verde (*Camellia sinensis*), y ha sido evaluado en células HeLa ( $CI_{50}$ :  $20 \mu\text{M}$ ), provocando un incremento de Bax, p53, ROS, la liberación de Cyt c, una disminución de Bcl-2 y COX-2, así como la inhibición de AKT y NF- $\kappa$ B (Singh *et al.*, 2011). Este producto natural ha sido evaluado en la línea celular MCF-7 y 4T1, inhibiendo el crecimiento celular un 40-75%. Se ha reportado que EGCG disminuye los niveles de VEGF, HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, y aumenta las caspasas 3 y 9 (Shin & Choi, 2009; Gu *et al.*, 2013).

A continuación, se enlistan algunos flavonoides evaluados contra cáncer de mama:

- La quercetina es un flavonoide que ha sido evaluado contra MCF-7 ( $CI_{50}$ :  $30.8 \mu\text{M}$ ), y MDA-MB-231 ( $CI_{50}$ :  $100 \mu\text{M}$ ), en las cuales disminuyó los niveles de expresión de P53, Bcl-2/BAX,  $\beta$ -catenina, vimentina, E-caderina y VEGFR2, además de que indujo apoptosis e inhibió la metástasis del tumor (Srinivasan *et al.*, 2015; Balakrishnan *et al.*, 2017).
- La luteolina es un flavonoide aislado de las hojas, tallos y ramas de la planta *Reseda luteola* que ha sido probado en las líneas celulares SKBR-3 ( $CI_{50}$ :  $29.36 \mu\text{M}$ ), BT-474 ( $CI_{50}$ :  $57.85 \mu\text{M}$ ), ZR-75-1 ( $CI_{50}$ :  $42.41 \mu\text{M}$ ), MCF-7 ( $CI_{50}$ :  $44.65 \mu\text{M}$ ), BT-20 ( $CI_{50}$ :  $13.94 \mu\text{M}$ ) y MDA-MB-231 ( $CI_{50}$ :  $31.01 \mu\text{M}$ ), en la que provocó la disminución de TNF- $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, así como un aumento de FOXO3a, NQO1, Bax/Bcl-2, inactivó la vía AKT/mTOR además de inducir apoptosis, inhibir la metástasis del tumor, y efecto anti-inflamatorio (Park *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021).
- La puerarina es un flavonoide que ha sido probado en MCF-7 a una concentración de  $50 \mu\text{M}$ , provocando una tasa de inhibición del 50%, la disminución de P65, I $\kappa$ B $\alpha$  y NF- $\kappa$ B, además de la inducción de apoptosis, efecto anti-inflamatorio, inhibición de la proliferación y metástasis (Liu *et al.*, 2017).

- La apigenina es una flavona aislada de plantas de las familias Rechercaceae, Verbenaceae y Cypress que ha sido evaluado en células SKBR3 y MCF-7 ( $CI_{50}$ :  $56.72 \pm 2.35 \mu M$ ), en las cuales disminuyó los niveles de ciclina A y B, CDK1, IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL-2, VEGF y STAT3, e incrementó los niveles de P53, PARP, caspasa-3 y 8 escindidas, así como la inducción de apoptosis y arresto en el ciclo celular, así como la inhibición de la proliferación celular (Seo *et al.*, 2015; Shendge *et al.*, 2021).
- La isoliquiritigenina es un derivado de flavanona aislado de *Glycyrrhizae rhizoma*, que pertenece a los compuestos del tipo chalcona, y que se encuentra en varias plantas como el regaliz. Este flavonoide ha sido evaluado en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, en las cuales disminuyó los niveles de CDK1, VEGFR2, MMP2, MMP9 y mTOR, además de que indujo apoptosis, arresto del ciclo celular e inhibió la proliferación y la metástasis (Wang *et al.*, 2013).
- La curcumina fue aislada por primera vez en 1815 de la cúrcuma. Este flavonoide ha sido evaluado contra las líneas celulares MDA-MB-231 ( $CI_{50}$ :  $75 \mu M$ ) y MFC-7 ( $CI_{50}$ :  $75 \mu M$ ), en las cuales provocó la disminución de NF- $\kappa B$ , PECAM-1, p65, ciclina D1 y Bcl-2, y el incremento de caspasas 3 y 9, y Bax. Se reportó que indujo apoptosis e inhibió la proliferación celular (Siddiqui *et al.*, 2012; Bimonte *et al.*, 2015; Guneydas & Topcul, 2022).

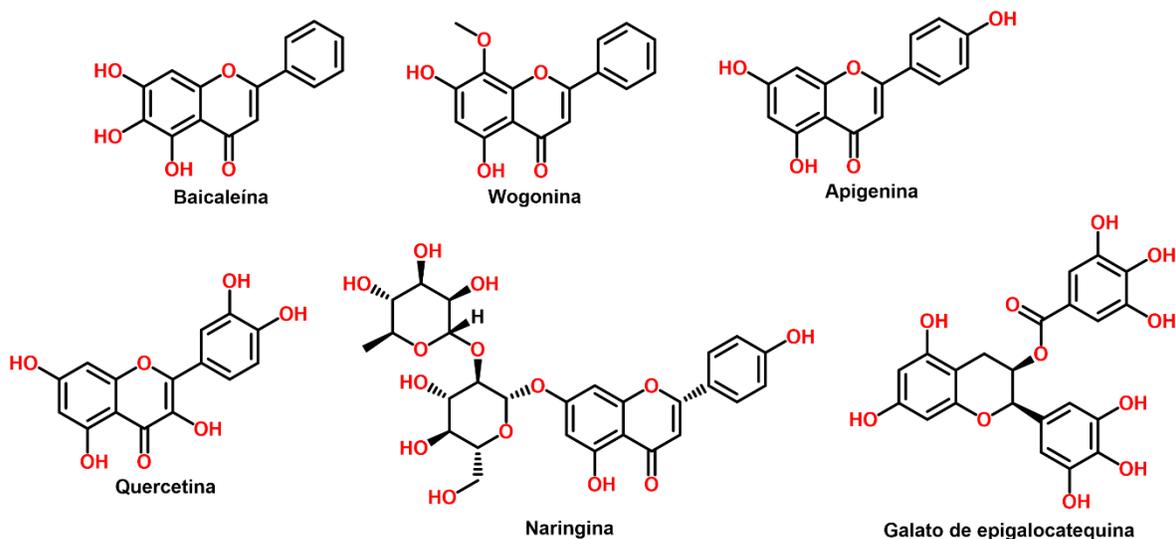


Figura 7. Estructuras químicas de algunos flavonoides con actividad contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama.

## TERPENOIDES:

La Figura 8 muestra las estructuras de algunos terpenoides, alcaloides y polifenoles con actividad contra cáncer cervicouterino evaluados en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*:

- La dihidroartemisinina es un sesquiterpeno, conocido como un agente antimalaria, también presenta actividad anticancerígena y anti-angiogénica contra varios tipos de cáncer *in vitro* e *in vivo*. Este producto natural ha sido evaluado contra la línea celular HeLa (CI<sub>50</sub>: 22.08 µM) y CaSki (CI<sub>50</sub>: 18.20 µM), en las cuales provocó un incremento en RKIP y una disminución en Bcl-2. En un modelo de ratón BALB/c con implante de células HeLa o CaSki a una dosis de 20 µM for 15 días, se obtuvo una disminución del crecimiento de tumor con tasas de inhibición del 70-80%.
- La tanshinona IIA es una naftoquinona diterpenoide aislado de la planta *Salvia miltiorrhiza* de la medicina tradicional china, que ha sido evaluada en cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa (CI<sub>50</sub>: 6.97 µM), SiHa (CI<sub>50</sub>: 14.47 µM), CaSki (CI<sub>50</sub>: 5.51 µM) y C33A (CI<sub>50</sub>: 9.89 µM), en las cuales se obtuvo el incremento de Bax, PERK, IRE1, p38, JNK, así como la activación de caspasas 3 y 9, la escisión de PARP, y la liberación de citocromo C y Ca<sup>2+</sup>, y la disminución de Bcl-2. También fue evaluado en HeLa, SiHa y CaSki en un intervalo de concentraciones de 0-10 µM, donde p53, p21, p130 y pRb incrementaron sus niveles, y E6 y E7 disminuyeron sus niveles de expresión. En un modelo de ratón con implante de células de cáncer cervical U14, a una dosis de 40 mg/kg por 20 días, se obtuvo la disminución de la metástasis y del crecimiento del tumor con tasas de inhibición de 72.7%.
- La oridonina es un diterpeno que ha sido extraído de *Rabdosia rubescens*, y ejerce diversas actividades biológicas, entre ellas la antibacteriana, anti-inflamatoria, y anti-tumoral. Este producto natural ha sido evaluado en células HeLa (CI<sub>50</sub>: 4.13 µM), donde se obtuvo un incremento en Bax, la activación de caspasas 3 y 9, la liberación de citocromo c, y la disminución de Bcl-2 y MMP.
- El ginenósido Rh2 es un triterpeno activo, derivado del ginseng, que ha mostrado tener efecto en la estimulación del sistema inmune, mejorar la salud cardiovascular, y su efecto anti-estrés. Este producto natural fue evaluado en células HeLa (CI<sub>50</sub>: 35 µM), en las cuales incrementó los niveles de Bax, promovió la activación de las caspasas 3 y 9, la liberación de citocromo c, y la disminución de Bcl-2 y MMP.
- El ácido betulínico es un triterpeno pentacíclico natural que se encuentra en corteza de abedul blanco, el cual ha sido evaluado contra células HeLa (CI<sub>50</sub>: 30.42 ± 2.39 µM), provocando un incremento en los niveles de Bad, ROS, p27<sup>Kip</sup> y p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, así como la activación de caspasa 9, y bloqueo del ciclo celular en la fase G0/G1, y la inhibición de la vía PI3K/AKT.

#### **ALCALOIDES:**

- La piperina es un alcaloide nitrogenado, encontrado principalmente en la pimienta blanca y en la pimienta larga, que ha exhibido efectos biológicos como el anticáncer, antibacterial y antiepiléptico. Este producto natural ha sido evaluado contra células HeLa en un intervalo de concentración de 0-200 µM, donde produjo un incremento en los niveles de ROS, la activación de caspasa 3, y una disminución de MMP, y bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular.

- La matrina es un alcaloide aislado de la planta medicinal china *Sophora flavescens*, el cual ha sido evaluado en un modelo in vivo de ratones desnudos BALB/c con implante de células HeLa, promoviendo la disminución de p38, MMP2 y MMP9, y tasas de inhibición del crecimiento del tumor del 58.33%.

## POLIFENOLES:

- El resveratrol es un polifenol no-flavonoide que se encuentra en diversos alimentos como moras, uvas, algunos hongos y vino rojo; ha sido evaluado contra células MCF-7 y MDA-MB-468. Entre su mecanismo de acción se reporta la disminución de PDE,  $E\alpha$ , VEGF, vimentina, el aumento de cAMP, AMPK y H3K9Ac, la inducción de apoptosis y autofagia, además de la inhibición de la proliferación celular.

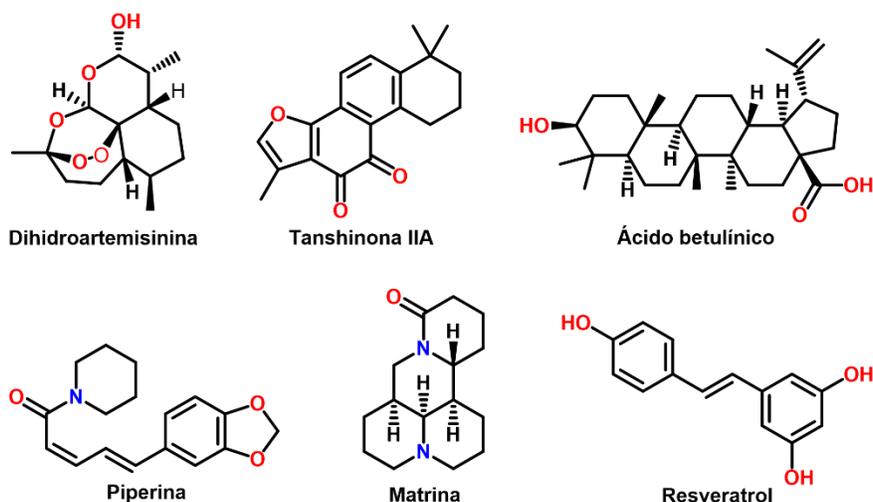


Figura 8. Estructuras químicas de algunos terpenoides y alcaloides con actividad contra cáncer cervicouterino y cáncer de mama.

Se puede observar la gran diversidad de estructuras, en muchas ocasiones complejas, en las cuales predominan posiciones oxigenadas y nitrogenadas, así como ciclos de diferente tamaño que le proporcionan características particulares.

### 1.3 Descubrimiento y desarrollo de fármacos

El descubrimiento de fármacos es un proceso de múltiples etapas cuyo objetivo es la identificación de una molécula pequeña que posea alguna actividad terapéutica y sea útil para tratar alguna afección o enfermedad, para su posterior evaluación como un candidato

potencial de fármaco (Sinha & Vohora, 2018; Deore *et al.*, 2019). Este proceso contempla la identificación de candidatos, la síntesis, la caracterización, el cribado y los ensayos para evaluar su eficacia terapéutica. Una vez que se obtienen resultados satisfactorios de estos pasos, entonces comienza el proceso de desarrollo de fármacos que involucran los ensayos clínicos. La Figura 9 muestra las etapas principales del descubrimiento y desarrollo de fármacos; ambos procesos generalmente son largos y costosos, ya que pueden tardar de 12 o más años en completarse, y el costo va desde 0.9 a 2.8 billones de dólares (Mohs & Greig, 2017; Deore *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2023). Por otro lado, de cada 5,000-10,000 compuestos que se someten a la investigación y desarrollo de fármacos, sólo uno recibe aprobación (Deore *et al.*, 2019).

Cada vez se busca mejorar los beneficios de los fármacos que ya existen, en términos de potencia, selectividad, seguridad y tolerabilidad, por ello es necesaria la búsqueda continua de nuevos candidatos a fármacos. La generación de un compuesto líder, etapa que también es conocido como “hit to lead”, conlleva la evaluación de series de compuestos para establecer un análisis cuantitativo de relación estructura-actividad, propiedades fisicoquímicas, propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo y excreción, y toxicidad); en esta etapa también se lleva a cabo la evaluación *in vitro* en ensayos con células (Sinha & Vohora, 2018; Singh *et al.*, 2023). El proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos varía dependiendo de los mecanismos moleculares que se espera estén relacionados a la enfermedad y al tipo de agentes terapéuticos que se requiere desarrollar (Singh *et al.*, 2023).

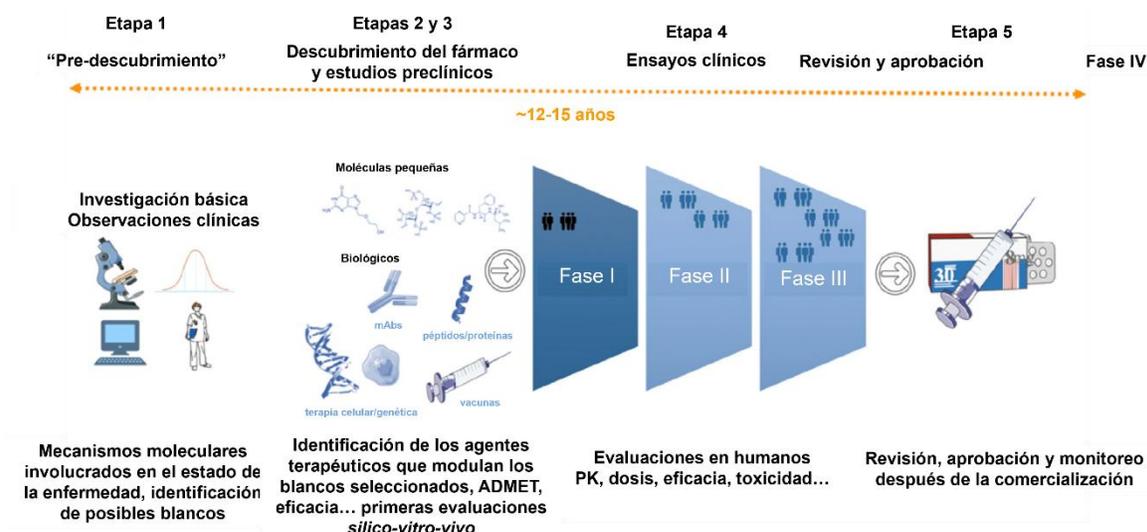


Figura 9. Etapas principales del descubrimiento y desarrollo de fármacos. Adaptada de Singh *et al.*, 2023.

## 1.4 Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

Para poder llevar a cabo el diseño de fármacos mediante herramientas computacionales es necesario seleccionar un compuesto líder (con bioactividad sobre un modelo o enfermedad de estudio) como punto de partida, para después identificar las relaciones estructura-actividad, y mejorar las interacciones del compuesto con su blanco biológico, así como sus propiedades farmacocinéticas (Patrick, 2023).

### 1.4.1 Principales enfoques de DIFAC

Existen dos principales enfoques de diseño de fármacos asistido por computadora: 1) basado en el ligando y 2) basado en la estructura o receptor (proteína), los cuales se describen a continuación:

#### Diseño de fármacos basado en la estructura

Para esta aproximación se requiere información estructural en 3D de los blancos terapéuticos y de sus sustratos o inhibidores. Entre las herramientas computacionales empleadas se encuentra el acoplamiento y la dinámica moleculares principalmente. Este tipo de diseño contempla la caracterización de sitios de unión, la elucidación del mecanismo de acción de las moléculas activas a nivel molecular, así como la cinética y la termodinámica involucradas en el reconocimiento proteína-ligando (Śledź & Caflisch, 2018; Prieto-Martínez *et al.*, 2019). La Figura 10 muestra un esquema representativo de este tipo de diseño de fármacos, como etapa inicial los compuestos son acoplados a una proteína blanco y se priorizan por su afinidad y modo de unión (Figura 10,A). Posteriormente, los compuestos resultantes son optimizados estructuralmente y cribados por sus propiedades fisicoquímicas, ADMET y otras características farmacológicas (Figura 10,B). Después, se realizan simulaciones de dinámica molecular para refinar los compuestos diseñados, y finalmente, se seleccionan los candidatos a fármacos (Figura 10,C; Shaker *et al.*, 2021).

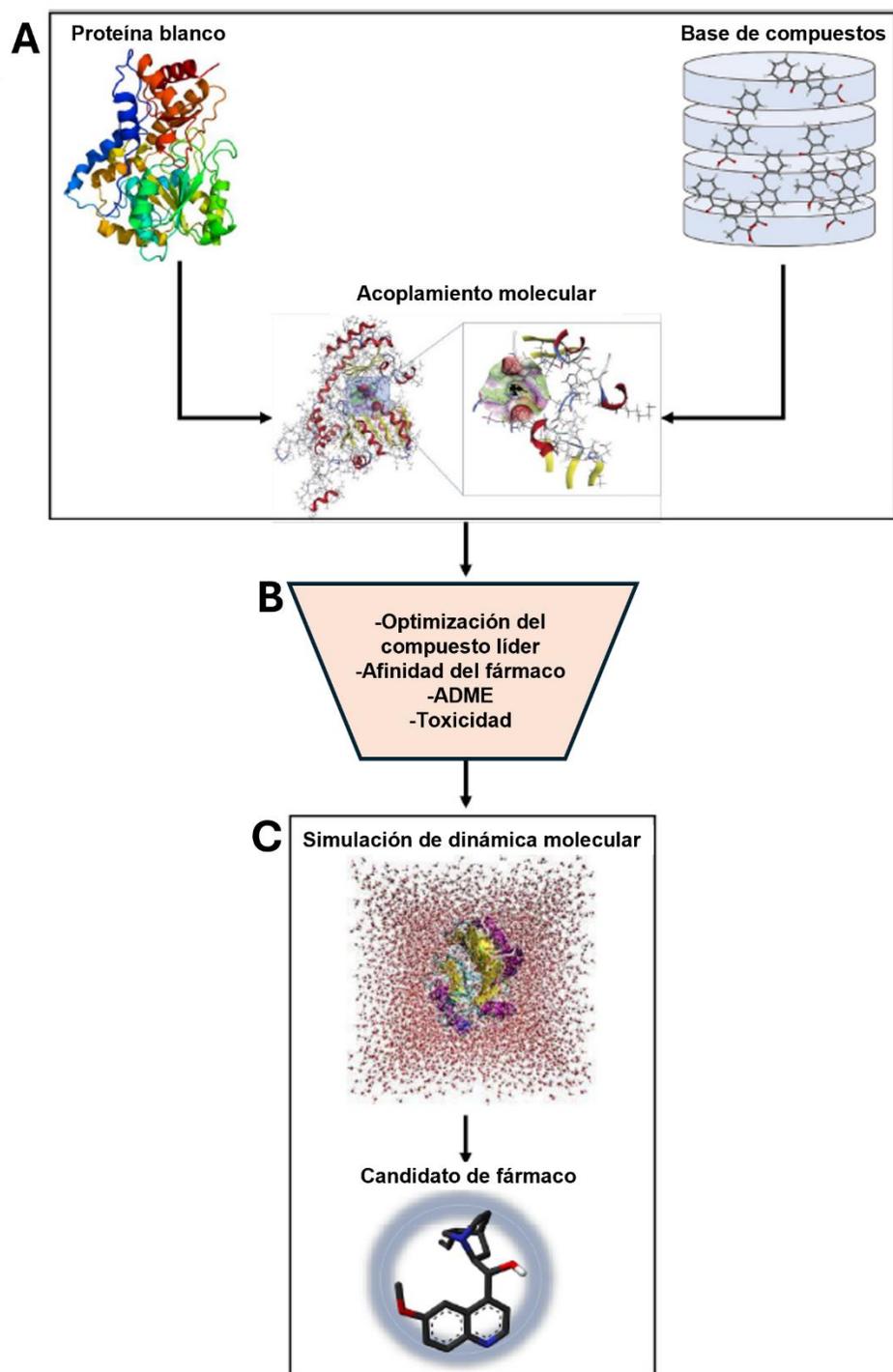


Figura 10. Diagrama general del diseño de fármacos con base en la estructura. Adaptado de Shaker *et al.*, 2021.

## Diseño de fármacos basado en el ligando

Esta aproximación se emplea ante la falta de información del receptor 3D y se basa en el conocimiento de estructuras químicas de un conjunto de ligandos con actividad biológica conocida; con este tipo de diseño se pueden identificar moléculas activas y mejorar su actividad (Prieto-Martínez *et al.*, 2019). Entre los métodos empleados más comunes para este tipo de diseño, entre los que se encuentran varios métodos de QSAR, utilizando a su vez estructuras 2D, 2.5D o 3D, obtenidas de estudios de RMN o rayos X, y generalmente por medios computacionales, así como estudios de similitud molecular (Merz, Ringe & Reynolds, 2010). La Figura 11 muestra un esquema general del diseño de fármacos con base en el ligando, en el cual se emplean compuestos activos conocidos para predecir compuestos potenciales nuevos, empleando métodos computacionales tales como búsqueda de similitud, modelamiento farmacofórico o modelamiento por QSAR, que proporcionan información útil sobre las interacciones blanco-ligando ante la falta de conocimiento de la estructura de la proteína (Shaker *et al.*, 2021). Posteriormente, los compuestos predichos se someten a una optimización para identificar nuevos candidatos a fármacos.

### 1.4.2 Propiedades de un compuesto líder

Un compuesto líder es una estructura que ejerce una actividad farmacológica útil y que puede actuar como un punto de partida para el diseño de fármacos. La mayoría de los compuestos líderes tienen baja actividad o efectos inaceptables, lo cual quiere decir que se requieren modificaciones estructurales significativas. En el descubrimiento de líderes basados en fragmentos se ha sugerido una regla de tres para los fragmentos usados (Patrick, 2023): a) que su peso molecular sea menor que 300 uma, b) no tenga más de tres donadores de enlace de hidrógeno, c) no tenga más de tres aceptores de enlace de hidrógeno, d) su cLogP sea menor de 3, e) no tenga más de tres enlaces rotables y f) su área superficial polar sea de 60 Å<sup>2</sup>.

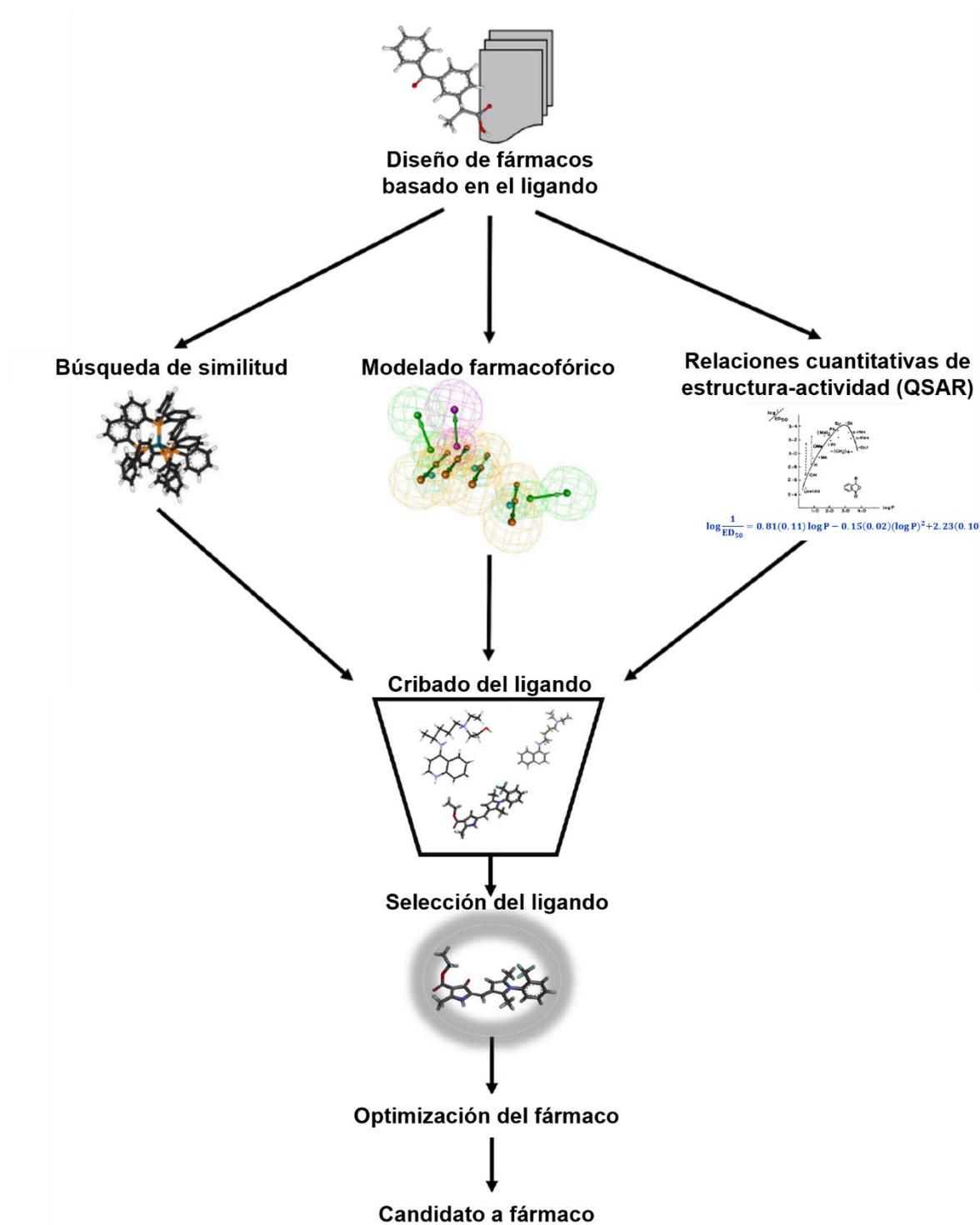


Figura 11. Diagrama general del diseño de fármacos con base en el ligando. Adaptado de Shaker *et al.*, 2021.

### 1.4.3 SAR (Structure-Activity Relationships)

Este tipo de análisis sirve para identificar aquellos componentes de un compuesto líder que son importantes para la actividad biológica y aquellos que no lo son (Patrick, 2023). Es importante el reconocimiento de los grupos funcionales y el tipo de enlaces intermoleculares que ellos pueden formar para entender como un fármaco se puede unir a su blanco. Por otro lado, mediante el análisis de compuestos análogos, en los que un grupo funcional particular de la molécula es removido o cambiado, es posible encontrar cuáles grupos son esenciales y cuáles no lo son. Esto implica evaluar todos los análogos para la actividad biológica y compararlos con el compuesto líder. En la Figura 12 se muestra un SAR de cuatro inhibidores del receptor tirosina cinasa VEGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), donde el cambio en la posición de un nitrógeno disminuye la actividad inhibitoria del análogo, y en el otro caso, la incorporación de un átomo de nitrógeno disminuye la actividad de su análogo.

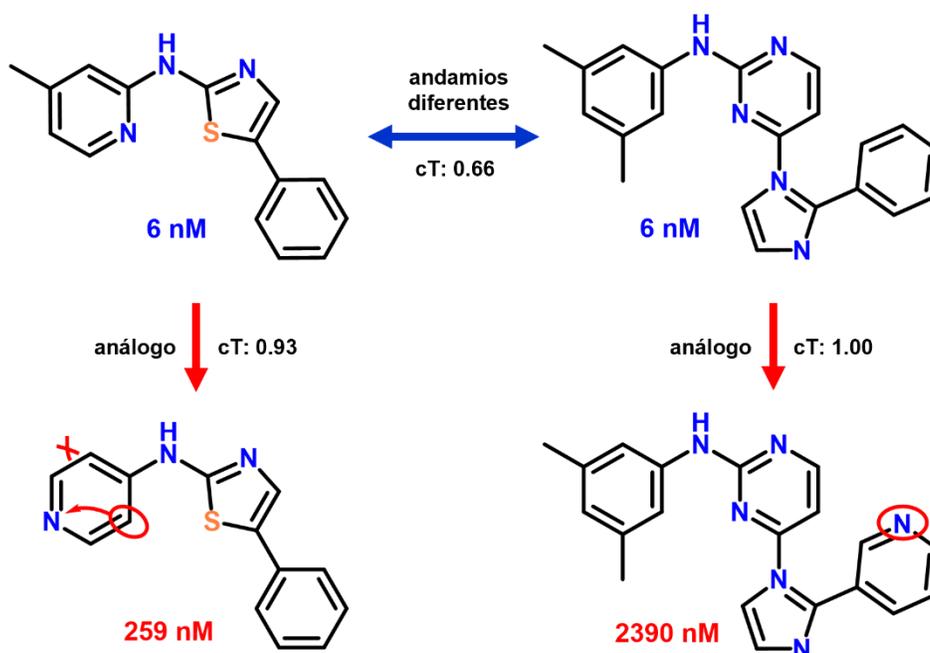
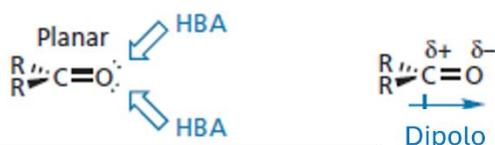


Figura 12. Ejemplo de SAR, de inhibidores del receptor tirosina cinasa VEGFR-2. Adaptada de Eckert & Baiorath, 2007.

#### 1.4.4 Papel de unión de grupos funcionales

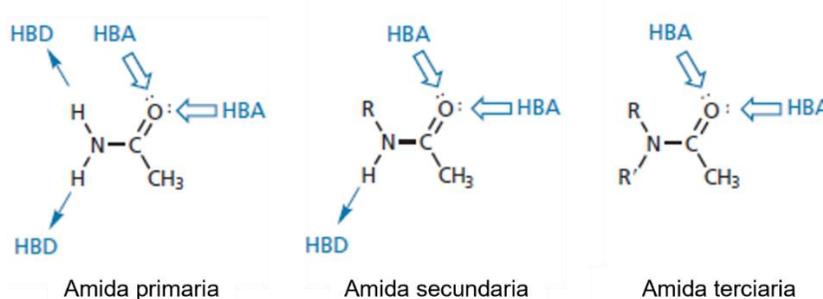
La importancia de los grupos funcionales en la estructura de los iridoides está dada por su papel en la unión con su blanco biológico. Para el presente trabajo, esto es de gran relevancia, dado que los iridoides poseen diversidad de grupos funcionales en su estructura, y en el análisis de SAR éstos se asocian a la actividad biológica de las moléculas.

Un grupo carbonilo (como el presente en los aldehídos) es un grupo plano que puede interactuar con un sitio de unión a través de un enlace de hidrógeno donde el oxígeno del carbonilo puede actuar como un aceptor de enlace de hidrógeno, y puede llevar a cabo dos interacciones de este tipo debido a los dos pares de electrones disponibles en el oxígeno del carbonilo (Figura 13). El grupo carbonilo tiene un momento dipolar, por lo que es también posible una interacción dipolo-dipolo con el sitio de unión. Se conoce que la reducción de un grupo carbonilo a un alcohol cambia la geometría y el grupo funcional de uno planar a uno tetraédrico. Esta alteración en la geometría debilitaría las interacciones de enlace de hidrógeno y de dipolo-dipolo, así como la magnitud y la orientación del momento dipolar (Patrick, 2023).



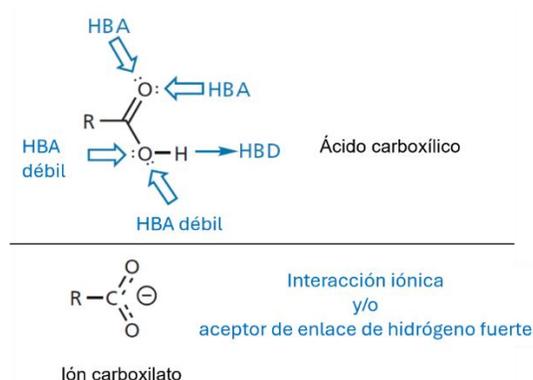
**Figura 13.** Interacciones de unión que son posibles por un grupo carbonilo. Adaptada de Patrick, 2023.

Las amidas pueden interactuar con sitios de unión a través de enlaces de hidrógeno. El oxígeno carbonilo puede actuar como un aceptor de enlace de hidrógeno y tiene el potencial para formar dos enlaces de hidrógeno (Figura 14). El nitrógeno no puede actuar como un aceptor de enlace de hidrógeno porque su único par libre de electrones interactúa con el grupo carbonilo vecino. Las aminas primarias y secundarias tienen un grupo N-H, lo que permite que este grupo pueda actuar como un donador de enlace de hidrógeno (Patrick, 2023).



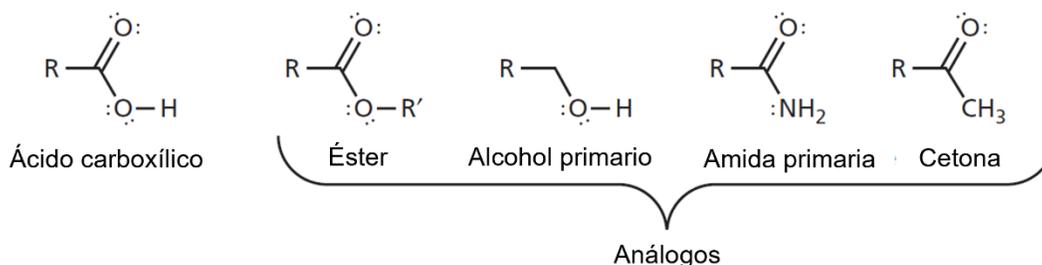
**Figura 14.** Interacciones posibles de enlace de hidrógeno con las amidas. Adaptada de Patrick, 2023.

El grupo ácido carboxílico es muy común en fármacos; puede actuar como un aceptor o como un donador de enlace de hidrógeno (Figura 15). Alternativamente, puede existir como un ión carboxilato. Esto permite la posibilidad de una interacción iónica y/o un enlace de hidrógeno donde el ión carboxilato actúa como el aceptor de enlace de hidrógeno. El ión carboxilato es también un buen ligando para cofactores de metales iónicos, como metaloproteinasas de zinc (Patrick, 2023).



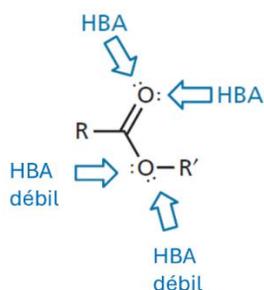
**Figura 15.** Interacciones posibles de enlace de hidrógeno con el ácido carboxílico. Adaptada de Patrick, 2023.

Se pueden sintetizar y probar análogos tales como ésteres, amidas primarias, alcoholes primarios y aldehídos para evaluar la posibilidad de estas interacciones (Figura 16). Debido a que ninguno de estos grupos funcionales puede ionizarse, entonces una pérdida de actividad podría implicar que un enlace iónico es importante (Patrick, 2023).



**Figura 16.** Análogos para evaluar las interacciones de unión para un ácido carboxílico (Tomada de Patrick, 2023).

Un grupo funcional éster tiene el potencial de interactuar con un sitio de unión únicamente como un aceptor de enlace de hidrógeno (Figura 17). El oxígeno del carbonilo es más probable que actúe como un aceptor de enlace de hidrógeno que como un oxígeno alcoxi, ya que se encuentra estéricamente menos impedido y tiene una mayor densidad electrónica (Patrick, 2023).



**Figura 17.** Interacciones de unión posibles para un éster (Tomada de Patrick, 2023).

El análisis SAR aparte de ser importante para identificar grupos de unión en un compuesto líder, también es usado en la optimización y diseño de fármacos, donde el objetivo es encontrar análogos con una mejor actividad (Patrick, 2023).

La intención de diseñar análogos a partir de un compuesto líder es mejorar la actividad biológica del compuesto líder cuando éste último ha mostrado tener una actividad baja, o una pobre selectividad y efectos secundarios significativos. La variación de sustituyentes accesibles es un método común para afinar las interacciones de unión de un fármaco (Patrick, 2023).

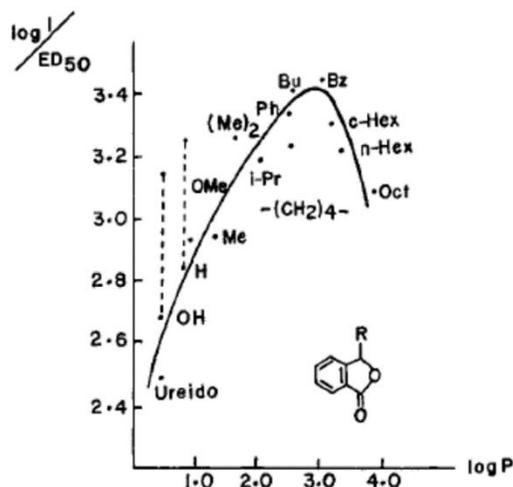
#### 1.4.5 QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*)

Los estudios de relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR) nos permite decidir de manera racional cuáles sustituyentes usar en la optimización y diseño de fármacos. En este tipo de estudio, se asume que cada compuesto o ligando se encuentra en su conformación activa (Merz, Ringe & Reynolds, 2010). El QSAR permite la identificación y cuantificación de propiedades fisicoquímicas de un fármaco y determinar si cualquiera de estas propiedades tiene un efecto en la actividad biológica del fármaco. Si esta relación existe, se puede generar una ecuación matemática que cuantifique la relación y permita establecer con cierta confianza cual propiedad o propiedades tienen un papel importante en la actividad biológica del fármaco, y también provee de cierto grado de predicción (Patrick, 2023). De esta manera se puede predecir la actividad biológica con el modelo matemático que correlacione la actividad biológica de moléculas que ya han sido probadas de manera experimental, y así reducir el número de moléculas para su síntesis. Por otro lado, si se descubre un análogo y no se ajusta a la ecuación, esto implica que alguna otra característica es importante y provee una molécula líder para su desarrollo a futuro.

Las propiedades que se pueden cuantificar de un fármaco pueden ser del tipo estructural, física, o química. Los compuestos estudiados deben ser estructuralmente relacionados y tener la misma actividad biológica. Los modelos matemáticos de QSAR se realizan mediante análisis de regresión lineal con el método de mínimos cuadrados. En la Figura 18 se puede observar la correlación que existe entre la actividad biológica expresada por el

$\log (1/ED_{50})$  y, el  $\log P$  y el  $\log P^2$  de un conjunto de moléculas, en la cual la curva parabólica representa la expresión matemática de dicha correlación.

$$\log \frac{1}{ED_{50}} = 0.81(0.11) \log P - 0.15(0.02)(\log P)^2 + 2.23(0.10)$$



**Figura 18.** Ejemplo de correlación entre la actividad biológica contra el  $\log P$  y  $\log P^2$ . Adaptada de Fujita, 1995.

El coeficiente de correlación o regresión ( $r$ ) es una medida de qué tan bien los parámetros fisicoquímicos presentes en la ecuación pueden explicar la varianza observada en la actividad. El coeficiente de determinación también se puede expresar mediante  $r^2$ . El número de compuestos considerados en el modelo matemático se representa como  $n$ . El error estándar estimado o la desviación estándar se representa como  $s$  (Patrick, 2023).

Gracias a la colección de datos experimentales químicos y biológicos, al mejoramiento de la calidad de la información en bases de datos y al continuo desarrollo y refinamiento de algoritmos matemáticos y a la tecnología de caracterización de la estructura molecular, el modelamiento QSAR se ha convertido en uno de los métodos *in silico* más usados para la predicción de propiedades fisicoquímicas y de la actividad biológica (Wang *et al.*, 2021).

#### 1.4.6 Similitud molecular

Este método se basa en la relación entre las estructuras químicas de dos ligandos (Prieto-Martínez *et al.*, 2019). La similitud molecular se enfoca en las características estructurales de los compuestos y su representación, tales como subestructuras compartidas, sistemas de anillos, etc. (Maggiara *et al.*, 2014). La similitud se puede evaluar con base en representaciones moleculares 2D y 3D. Los análisis de similitud molecular permiten identificar “nuevas” moléculas que son similares en términos de estructura o de función a moléculas con una acción biológica conocida. En el programa Spartan es posible desarrollar

este método con base en sus descriptores de función química (CFD's: *Chemical Function Descriptors*) los cuales pueden ser de los siguientes tipos: aceptor de enlace de hidrógeno (HBA), 2) donador de enlace de hidrógeno (HBD), ionizable de manera positiva (+), e ionizable de manera negativa (-), y con base en la estructura.

#### **1.4.7 Modelamiento molecular**

En el modelamiento molecular se emplean diversos programas o algoritmos para calcular la estructura y las propiedades de la molécula o moléculas en estudio. Los métodos computacionales principales usados para calcular la estructura y las propiedades se dividen en las siguientes dos clasificaciones: mecánica molecular y mecánica cuántica.

##### **Mecánica molecular**

En este método computacional, las ecuaciones empleadas para realizar los cálculos se basan en leyes de física clásica aplicadas al núcleo sin considerar a los electrones (Patrick, 2023). Se trata a la molécula como una serie de esferas (los átomos) que se conectan por resortes (enlaces). Este método se emplea para las siguientes operaciones o cálculos:

- minimización de energía;
- identificación de conformaciones estables;
- cálculo de energía para conformaciones determinadas;
- generación de diferentes conformaciones;
- estudios en el movimiento molecular (Patrick, 2023).

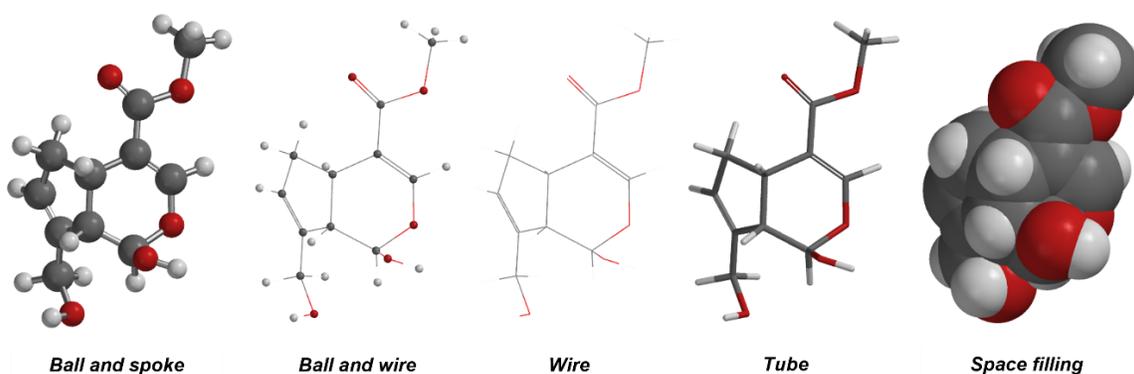
##### **Mecánica cuántica**

Este método computacional hace uso de la física cuántica para calcular las propiedades de una molécula considerando las interacciones entre los electrones y el núcleo de la molécula (Patrick, 2023). En este método, los núcleos de la molécula se consideran inmóviles, debido a que el movimiento de los electrones es mucho mayor. Se considera que los electrones se mueven alrededor de un núcleo fijo, siendo posible describir la energía electrónica de manera separada de la energía nuclear. Además, se considera que los electrones se mueven de manera independiente con respecto a otros electrones.

Los métodos de mecánica cuántica son adecuados para calcular:

- energías y coeficientes de orbitales moleculares;
- calor de formación para conformaciones específicas;
- cargas atómicas parciales calculadas de los coeficientes de orbitales moleculares;
- potenciales electrostáticos;
- momentos dipolares;
- geometrías del estado de transición y energías;
- energías de disociación de enlace (Patrick, 2023).

Existen diversos programas para dibujar estructuras químicas que permiten cálculos rápidos de varias propiedades moleculares tales como ChemDraw, ChemWindow y Symyx Draw. Otros programas de modelado molecular permiten la construcción de estructuras moleculares en tres dimensiones (3D), tales como ChemBio3D, Discovery Studio Pro y Spartan (Figura 19). El modelo en 3D se realiza construyendo la molécula átomo por átomo, y enlace por enlace. Posterior a la construcción de la molécula en 3D, se debe llevar a cabo un proceso llamado minimización de la energía. Esto es debido a que el proceso de construcción puede resultar en longitudes de enlace, ángulos de enlace, y ángulos de torsión desfavorables. En ese proceso de minimización de energía, el programa calcula la energía de la molécula inicial, y luego varía las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos de torsión para crear una nueva estructura. Entonces, el programa calcula la energía de la nueva estructura para determinar si o no es energéticamente más estable (Patrick, 2023).



**Figura 19.** Diversas representaciones para visualizar estructuras químicas en 3D con el programa Spartan.

#### 1.4.8 Propiedades moleculares

Se pueden obtener varias propiedades de la estructura 3D de la molécula en cuestión, una vez que ésta ha sido construida y minimizada. Entre las propiedades que pueden ser calculadas se encuentran el calor de formación, el momento dipolar, el potencial electrostático, las cargas parciales, la polarizabilidad, entre otras.

Los mapas de potencial electrostático (*MEP*) se pueden calcular empleando mecánica cuántica mediante la consideración de los orbitales moleculares. Este tipo de gráficos nos permite identificar áreas de la molécula que son ricas o pobres en electrones, y también nos permiten identificar como podrían alinearse para interactuar con áreas ricas y pobres en electrones en un sitio activo del blanco biológico con el que las moléculas interactúan.

Los descriptores empleados en el QSAR-3D usualmente se dividen en tres categorías: 1) electrónicos (tales como el orbital molecular ocupado de más energía-HOMO y el orbital molecular ocupado de menor energía-LUMO), 2) topológicos (tales como los índices de

conectividad), y 3) geométricos (tales como momento de inercia) (Merz, Ringe & Reynolds, 2010).

### 1.5 Compuestos con actividad anticancerígena descubiertos mediante DIFAC

En las últimas décadas se han descubierto nuevos fármacos anticancerígenos mediante herramientas computacionales, algunos de ellos continuaron hasta la fase clínica, y otros más completaron el proceso de desarrollo de fármacos y fueron aprobados por la FDA (Food & Drug Administration; Cui *et al.*, 2020; Iwaloye *et al.*, 2023). Algunos de estos fármacos se enlistan a continuación:

- SHR-3162, con actividad contra cáncer de ovario, funciona como inhibidor de PARP, y se encuentra en fase clínica I (Wang *et al.*, 2019).
- Resveratrol, con actividad contra diversos tipos de cáncer de mama, pulmón y colon, actúa como inhibidor de VEGFR, EGFR o FGFR; también se encuentra en fase clínica I (Sahu *et al.*, 2022).
- C1 (derivado de quercetina), es activo contra cáncer colorectal, de mama, de pulmón, carcinoma hepatocelular, leucemia y mieloma múltiple, actúa como inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, y también se encuentra fase I (Shen *et al.*, 2023).
- Galato de epigallocatequina, tiene actividad contra cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas y otros tumores sólidos, actúa como inhibidor de Bcl-2 y se encuentra en ensayos de fase I (Olotu *et al.*, 2019).
- Lapatinib, es un compuesto activo contra cáncer de mama, y funciona como inhibidor de ERBB2/EGFR; fue aprobado por la FDA en el 2007 (Xia *et al.*, 2011).
- Axitinib, es activo contra carcinoma de células renales, actúa como inhibidor del receptor VEGFR, y fue aprobado por la FDA en el 2012 (Meadows & Hurwitz, 2012).
- Gefitinib es activo contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado o metastásico, y actúa como inhibidor de HGFR, ALK y cMET; fue aprobado por la FDA en el 2015 (Ohbayashi *et al.*, 2019).
- Apelisib, activo contra cáncer de mama, es un inhibidor de PI3K y fue aprobado por la FDA en 2019 (Markham, 2019).

También hay reportes de diversos compuestos inhibidores de blancos terapéuticos en cáncer como caspasas 3 y 7, PIM-1, Chk1, CK2, PLK, GSK-3 $\beta$ , C-Met, VEGFR-2, FGFR (1-4) y PDGFR- $\alpha$  que han sido identificados mediante diseño de fármacos asistido por computadora (Iwaloye *et al.*, 2023). Entre los métodos computacionales empleados para su identificación se encuentran: mecánica cuántica y QSAR, como algunos de los empleados en el presente trabajo.

## 2. ANTECEDENTES:

Los iridoides son un grupo de compuestos naturales obtenidos de plantas empleadas en la medicina herbolaria en nuestro país y en todo el mundo, y se han utilizado para tratar diversos padecimientos como fiebre, tos, hipertensión, inflamación y dolor (Ríos, 2015). Estos compuestos se han obtenido de diversas plantas de la clase Magnoliosida o dicotiledóneas, y de las familias Scropulariaceae, Verbenaceae, Lamiaceae, Apocynaceae, Loganiaceae, Bignociaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, entre otras (Dinda *et al.*, 2007); los iridoides deben su nombre a los compuestos iridomirmecina, iridodial e iridolactona, los cuales se aislaron por primera vez de hormigas del género *Iridomyrmex*.

Estructuralmente, los iridoides son monoterpenoides atípicos y son generalmente descritos como ciclopenta[C]pirano. El ciclopentano es fusionado a un anillo oxigenado de seis miembros, formando un esqueleto iridoide como un sistema bicíclico (Bianco, 1994; Ornano *et al.*, 2018). Se conocen cerca de 2500 iridoides derivados de la naturaleza, que se distinguen por el tipo y número de sustituyentes en el esqueleto de iridoide. Los iridoides se pueden clasificar en tres diferentes grupos: iridoides simples, iridoides glicosilados y secoiridoides (Bianco, 1994; Ornano *et al.*, 2018). Los iridoides simples tienen una modificación simple en la estructura del biciclo, tal como un grupo hidroxilo, aciloxi, ceto, epoxi, cloro y olefinas. Los iridoides glicosilados tienen al menos una unidad de azúcar (como la glucosa), por lo general en C-1. Los secoiridoides se caracterizan por la escisión del enlace C7-C8 en el anillo del ciclopentano. En la Figura 20 se presenta la estructura de los tipos principales de iridoides.

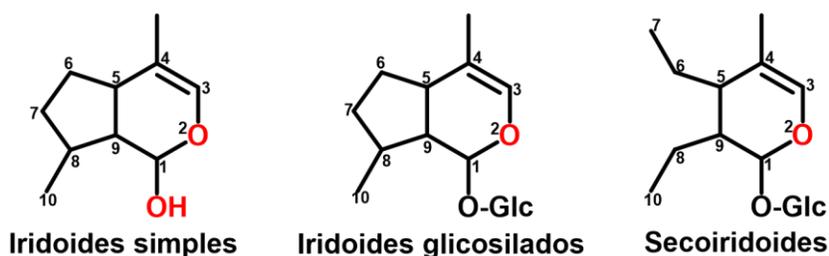


Figura 20. Clasificación de iridoides.

Se ha reportado el aislamiento de 13 iridoides acilados, llamados jatamanvaltratos, y de nueve valepotriatos, obtenidos de la planta *Valeriana jatamansi*. Estos iridoides han mostrado tener diversas actividades, entre ellas sedativa, antifúngica, citotóxica y antitumoral. Estos compuestos aislados fueron probados para evaluar su citotoxicidad contra líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549, cáncer de próstata metastásico PC-3M, cáncer de colon HCT-8 y de cáncer de hígado Bel7402 (Lin *et al.*, 2009). Cinco de los 22 compuestos probados en total exhibieron actividad contra todas las líneas celulares probadas, su  $CI_{50}$  se encontró en un intervalo de 1.0 a 7.4  $\mu$ M, incluyendo los iridoides acilados, que fueron los que tuvieron actividad citotóxica en todas las líneas

celulares ensayadas; el compuesto más activo de éstos fue el acevaltrato, cuya  $CI_{50}$  tuvo un intervalo de valor de 1.0 a 2.9  $\mu M$  para estas líneas de cáncer.

Existen estudios sobre otros iridoideos, aucubina y genipósido, que han demostrado ser inhibidores de la formación de tumores inducidos, al estabilizar las uniones covalentes entre la enzima topoisomerasa I y el DNA (Wang *et al.*, 1991).

Otro iridoide llamado catalpol actúa inhibiendo de manera competitiva a la enzima DNA polimerasa, compitiendo con los deoxinucleósidos trifosfatos, que es un blanco importante en el desarrollo de agentes quimioterapéuticos. Algunos análogos de este iridoide, los ésteres ter-butildimetisil catalpol y ter-butildifenilsilil catalpol se han probado en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, cuyos valores de  $CI_{50}$  se encuentran en un intervalo de 1.8 a 4.8  $\mu M$  (Pungitore *et al.*, 2007).

En el laboratorio de Química de Productos Naturales la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma de Morelos se ha realizado un estudio con extractos obtenidos de ocho especies que pertenecen a cuatro familias del orden de Lamiales, con el fin de evaluar la actividad citotóxica en contra de varias líneas celulares de cáncer: nasofaríngeo, laringe, colon, mama, próstata y cervicouterino (Moreno-Escobar *et al.*, 2011). En este estudio la línea celular de cáncer cervicouterino, CaSki, fue la más sensible a los extractos ensayados, y después de ésta, la línea de cáncer de mama, MCF-7. Sin embargo, fue el extracto de *Penstemon campanulatus* el más activo contra esta línea celular, cuya  $CI_{50}$  fue 2.64  $\mu g/mL$ , seguido del extracto de *Castilleja tenuiflora* que también mostró efecto citotóxico, aunque en un orden menor, con una  $CI_{50}$  de 8.72  $\mu g/mL$ . De estas dos especies se han obtenido diferentes iridoideos, tales como hexacetato de aucubina, pentacetato de bartsióside, éster metil de ácido geniposídico, entre otros (Jiménez *et al.*, 1995).

Se ha reportado la actividad citotóxica del iridoide genipósido en líneas celulares de cáncer oral escamoso. En un estudio, se evaluó la actividad del genipósido por sí solo contra la línea celular HSC-3, y en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG, obteniendo un mayor efecto inhibitorio del crecimiento celular en presencia de las bacterias, comparado con los respectivos controles (Chen *et al.*, 2017). En este estudio se reporta un incremento de la expresión, a nivel proteína y de RNA mensajero, de caspasas 3, 8, 9, Bax, p53, p21, entre otros; y también una disminución de Bcl-2, NF- $\kappa$ B, ciclooxigenasa-2, inhibidor de la apoptosis 1 y 2. En un segundo estudio, se evaluó la inhibición de la proliferación celular de genipósido, además de genipina y ácido geniposídico, en tres líneas celulares de cáncer oral escamoso HSC-2, SCC-9 y A253, siendo el genipósido el iridoide más activo contra las tres líneas celulares (Bai *et al.*, 2022). En este último estudio también se reporta el arresto de ciclo celular por genipósido en la fase G2/M de las células SCC-9, la inhibición de la migración celular, mediante el incremento de la expresión de E-caderina y la supresión de la expresión de MMP-2, y la inducción de la apoptosis y autofagia mediante la sobreexpresión y la desregulación de elementos de estos tipos de muerte celular.

Asimismo, se ha evaluado la citotoxicidad del genipósido en otras líneas celulares de cáncer como la de origen hepático HepG2 donde no tuvo actividad por sí mismo hasta en una concentración de 150  $\mu$ M, sólo cuando era metabolizado 24 horas antes por bacterias con actividad  $\beta$ -glucosidasa (Kang *et al.*, 2012). Esto significa que el genipósido debe ser hidrolizado y transformado a su aglicona genipina para exhibir actividad citotóxica. En dicho estudio también se evaluó el efecto en la viabilidad celular en presencia de fecalasa y una mezcla de enzimas microbianas intestinales, que también metabolizan al genipósido, donde se obtuvo una disminución de hasta el 40% de la viabilidad de HepG2.

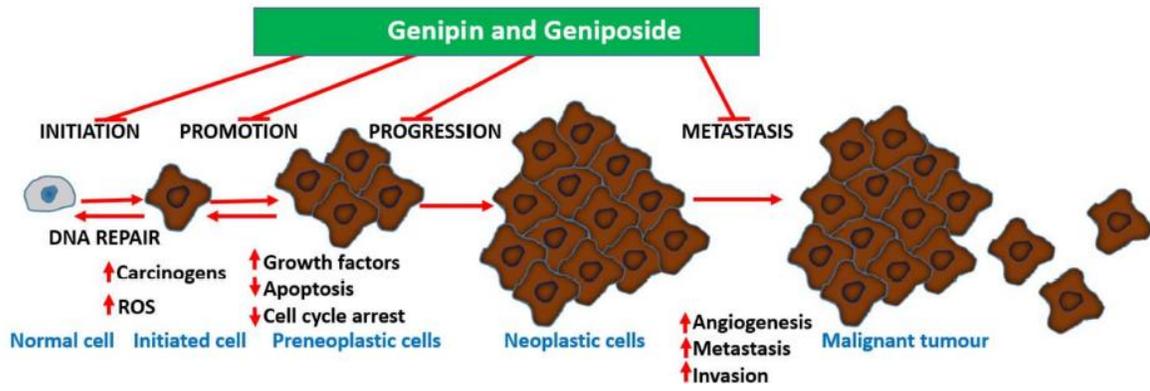
Por otro lado, la genipina, un iridoide metabolizado del genipósido, posee actividad citotóxica contra algunos tipos de cáncer, tales como células de hepatocarcinoma Hep3B en las cuales indujo apoptosis a través de la activación de la vía mitocondrial dependiente de ROS-JNK, lo cual se demostró por los cambios morfológicos de las células tratadas, la activación de caspasa 3 y la liberación de citocromo *c* (Kim *et al.*, 2005). En este estudio también se evaluó el efecto de genipósido, el cual no provocó la muerte de las células, Hep3B, mostrando un crecimiento celular a las 24 horas de tratamiento similar al control. Con genipósido tampoco se activó la caspasa 3.

La genipina ha mostrado disminuir la viabilidad de células HeLa, de manera dependiente de la concentración, con una  $CI_{50}$  de 90  $\mu$ g/mL a las 24 horas de tratamiento. En dicha línea celular también indujo apoptosis, lo cual fue confirmado con fragmentación del DNA y el incremento de las células en la fase subG1, así como niveles altos de las proteínas p53 y Bax (Cao *et al.*, 2010; Shanmugam *et al.*, 2018).

Existen dos reportes de la actividad citotóxica de genipina contra dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, siendo menos sensible esta última línea celular, con una  $CI_{50}$  de 0.327 mM (Ayyasamy *et al.*, 2011; Kim, Jeong & Moon, 2012).

La genipina también ha sido evaluada en diversas líneas celulares provenientes de diferentes tipos de cáncer: próstata PC3 (Hong & Kim, 2007), colon HCT116 y SW840 (Ye *et al.*, 2018), gástrico AGS, MKN45, SNU638, MNK74 y HFE-145 (Ko *et al.*, 2015; Jo *et al.*, 2019), riñón T24 y 5637 (Li *et al.*, 2018), leucemia K562 (Feng *et al.*, 2011), leucemia promielocítica aguda sensible HL-60 y resistente HL-60/MX2 (Mailloux, Adjetey & Harper, 2010).

Habtemariam y Lentini (2018) han propuesto con base en los reportes con los iridoideos genipósido y genipina, que éstos modulan potencialmente diversas etapas del desarrollo del cáncer (Figura 21) al efectuar diferentes mecanismos de acción, ya que tienen efectos angiogénicos (evita la formación de venas que son importantes para las células cancerosas para transportar los nutrientes que requieren para proliferar), y anticarcinogénicos, causan arresto del ciclo celular, entre otros.



**Figura 21.** Modulación del cáncer por genipósido y genipina. Tomado de Habtemariam & Lentini, 2018.

### 3. JUSTIFICACIÓN:

De acuerdo con las estadísticas del 2022, el cáncer cervicouterino y el cáncer de mama ocupan los primeros lugares en causa de muerte por neoplasias en mujeres, en México y a nivel mundial. En la actualidad, los tratamientos quimioterapéuticos usados en la clínica tienen algunas desventajas, dado que generalmente no son selectivos hacia células cancerosas, afectando también a las células normales, y generan resistencia a dichos fármacos. Por ello es necesario continuar la búsqueda de nuevos compuestos, y los iridoides son metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas, entre ellas la citotoxicidad contra células cancerosas.

Existen diversos reportes de la actividad citotóxica de algunos iridoides contra diversas líneas celulares de cáncer, como es el caso de genipósido que cuenta con dos reportes en líneas de cáncer oral escamoso y de su aglicona genipina que ha sido evaluada en la línea de cáncer cervicouterino HeLa, en dos líneas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, y otras líneas celulares de otros tipos de cáncer contra las cuales fue activa. Sin embargo, mientras que la genipina muestra actividad citotóxica su derivado glucósido la pierde. Por lo cual, se propuso la evaluación de estos dos iridoides en otras líneas celulares de cáncer cervicouterino y cáncer de mama que no han sido ensayadas con estos iridoides para evaluar su posible actividad citotóxica contra dichos linajes celulares.

Por otro lado, mediante el diseño de fármacos asistido por computadora es posible proponer moléculas con potencial actividad, en menor tiempo, con menor costo, y mayor tasa de éxito, y dada la necesidad de continuar descubriendo moléculas contra estos tipos de cáncer, es por ello que se propone el diseño de iridoides *in silico* con actividad citotóxica con base en la estructura del ligando.

#### 4. HIPÓTESIS:

- I. Los iridoideos genipósido y genipina tienen actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, CaLo e INBL, y de cáncer de mama MCF-7, BT-549 y MDA-MB-231, en estudios *in vitro*.
- II. Por medio de análisis de similitud molecular y las relaciones cuantitativas de estructura-actividad es posible explicar la actividad citotóxica de genipósido y genipina.

## 5. OBJETIVOS:

### 5.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto citotóxico de genipósido y genipina contra líneas celulares de cáncer cervicouterino y de cáncer de mama *in vitro*, y, posteriormente, diseñar y optimizar *in silico* la potencia citotóxica de nuevos iridoides.

### 5.1 Objetivos específicos:

- Evaluar la actividad citotóxica de genipósido y genipina contra tres líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaSki, CaLo e INBL) y tres líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, BT-549 y MDA-MB-231) mediante la técnica de sulforodamina B.
- Realizar un estudio SAR de iridoides con reporte de actividad citotóxica contra las líneas celulares CaSki, CaLo e INBL, HeLa, MCF-7, BT-549 y MDA-MB-231.
- Realizar análisis de similitud molecular de los iridoides genipósido y genipina, y de iridoides estructuralmente similares.
- Construir un modelo QSAR para describir la actividad citotóxica de los iridoides en la línea celular HeLa.
- Crear un modelo QSAR para predecir la actividad citotóxica de nuevos iridoides en la línea celular HeLa.
- Diseño *in silico* con base en el ligando de nuevos iridoides con potencial actividad citotóxica sobre la línea celular HeLa.

## **6. METODOLOGÍA:**

### **6.1 Cultivo de las líneas celulares**

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki (proveniente de un carcinoma celular escamoso, positiva a VPH16), CaLo (proveniente de un carcinoma escamoso estadio IIB, positivo a VPH18), INBL (proveniente de un carcinoma escamoso estadio IVA), así como las líneas de cáncer de mama MCF-7 (derivada de un sitio metastásico, positiva a los receptores de estrógeno y progesterona), BT-549 (proveniente de un carcinoma ductal, triple negativo y con una mutación en el gen TP53) y MDA-MB-231 (derivada de un sitio metastásico, proveniente de un adenocarcinoma, triple negativo y con una mutación en el gen TP53), y la línea celular inmortalizada HaCaT de queratinocitos, que fue usada como control de células no cancerígenas), se cultivaron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB; Byproducts) al 10% y previamente ajustado a un pH de 7.2 usando NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **6.3 Evaluación del potencial citotóxico de los compuestos**

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, CaLo, INBL, y de cáncer de mama MCF-7, BT-549, MDA-MB-231 y la línea control HaCaT se cultivaron en placas de 96 pozos, con una densidad celular de 6,600 células por pozo en el caso de CaSki, MCF-7 y HaCaT, y 5,000 células por pozo en el caso de CaLo, INBL, MDA-MB-231 y 3,000 células por pozo para BT-549 y se expusieron a diferentes concentraciones de los iridoideos genipósido y genipina, durante 72 h de tratamiento, empleando podofilotoxina y cisplatino como controles positivos de citotoxicidad. Los iridoideos genipósido y genipina se evaluaron a las concentraciones 0.041, 0.206, 1.032, 5.16, 25.8 y 129 µM. En el caso de genipósido, éste también fue evaluado hasta 1000 µM.

La genipina fue previamente disuelta en condiciones de esterilidad en 100 µL de DMSO y ajustados con 900 µL de agua desionizada a un volumen de 1 mL (la concentración de DMSO en la solución stock de cada compuesto fue 10%). A partir de la solución stock de cada iridoide, se realizaron las diluciones necesarias con agua estéril para evaluar los iridoideos en las concentraciones ya mencionadas, la concentración máxima de DMSO empleada en los ensayos fue 0.1%. El genipósido fue disuelto desde la solución stock sólo con agua estéril, empleando agua estéril también como vehículo para hacer las diluciones del compuesto.

El cisplatino se evaluó a las concentraciones de 0.104, 0.208, 0.415, 0.831, 1.662 y 3.325 µM; este compuesto fue pesado y disuelto en solución salina al 0.9% con el fin de mantener su estabilidad, debido a que, aunque es soluble en DMSO, si se solubiliza en este último disolvente, puede ocurrir un desplazamiento nucleofílico del platino por el azufre del DMSO. A partir de la solución stock del cisplatino, se realizaron las diluciones necesarias con agua estéril para evaluar el compuesto a las concentraciones establecidas.

La podofilotoxina se evaluó a las concentraciones de 0.003, 0.006, 0.012, 0.024, 0.048 y 0.097  $\mu\text{M}$ . Este compuesto fue pesado y disuelto en DMSO; a partir de esta solución stock se prepararon las diluciones necesarias con agua estéril.

Las placas conteniendo las células y los iridoideos se cultivaron a 37°C y a 5% de  $\text{CO}_2$ . La viabilidad de las células se determinó con el ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB), el cual estima el número de células indirectamente por tinción de la proteína celular total con el colorante sulforodamina B (Vichai y Kirtikara, 2006). Después del tiempo de tratamiento, las células se fijaron con 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 50% frío por 30 min a 4°C. Enseguida, el medio se decantó y las células se lavaron 3 veces con agua corriente fría; las placas se dejaron secar sobre papel absorbente. Una vez se secaron las placas, se tiñeron con sulforodamina B al 0.1% (disuelto en ácido acético al 1%) frío por 30 minutos; transcurrido este tiempo se procedió a enjuagar 3 veces las placas con ácido acético al 1% con el fin de retirar el exceso de colorante no enlazado a las proteínas de las células que sobrevivieron y quedaron adheridas y fijadas al fondo de los pozos de las placas. Posteriormente, las placas con células teñidas se dejaron secar con aire ambiente, resguardadas del polvo; una vez secas, el colorante se solubilizó con 100  $\mu\text{L}$  de Tris-base 10 mM (pH 10) por 30 min en un agitador orbital de placas a 1600 rpm.

La densidad óptica (D.O.) de cada pozo se midió espectrofotométricamente a 490 nm en un lector de ELISA automatizado. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes; los resultados obtenidos se analizaron en un programa estadístico para determinar la concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) mediante análisis de regresión.

El porcentaje de sobrevivencia celular fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{D.O. \text{ de células tratadas} - D.O. \text{ de células día cero}}{D.O. \text{ de células control} - D.O. \text{ de células día cero}} \times 100 \quad (1)$$

Los ensayos de citotoxicidad con genipósido y genipina contra la línea celular HeLa se realizaron por el método de MTS (Sánchez-Carranza *et al.*, 2019). Para este ensayo, se sembraron 5,000 células por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos y se trataron usando 882, 441, 220.50, 110.25, 55.125, 27.5625, y 13.78125  $\mu\text{M}$  de genipina o genipósido, y 50, 25, 12.5, 6, y 3 nM de paclitaxel como control positivo. El DMSO se empleó con una concentración máxima final de 0.5% como vehículo y blanco. Se empleó el kit del ensayo de proliferación celular CellTiter 96® (Promega, Madison, WI, USA).

Los datos se analizaron en el programa estadístico Prisma 5.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA), y los valores de  $\text{CI}_{50}$  se determinaron mediante análisis de regresión no lineal.

### 6.3 Búsqueda de iridoides con reporte de citotoxicidad en cáncer cervicouterino

La información sobre la citotoxicidad de iridoides en células de cáncer cervicouterino *in vitro* se recopiló mediante su búsqueda en bases de datos y sitios web tales como *PubMed*, *SciFinder*, *Google Scholar*, *Elsevier*, *ScienceDirect*, y *Web of Science*. Se usaron las siguientes palabras o frases en diversas combinaciones para su búsqueda: “cytotoxic iridoids in cervical cancer”, “iridoids against cervical cancer”, “antiproliferative iridoids in cervical cancer”, “cervical cancer”, “in vitro”, “cytotoxic iridoids”, “cell death”. Se consultaron más de 30 trabajos científicos de la literatura, desde el año 2004 hasta el 2022, obteniendo 47 iridoides con reporte de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Los iridoides se seleccionaron con base en dos criterios: 1) que hubieran sido evaluados en la misma línea celular, y 2) que hubieran sido evaluados en el mismo tiempo de tratamiento.

### 6.4 Análisis SAR de iridoides activos contra cáncer cervicouterino

Una vez seleccionados los iridoides, se dibujaron sus estructuras 2D con el programa ChemBioDraw Ultra 13.0, considerando la estereoquímica de los sustituyentes de cada iridoide. Posteriormente, se compararon las estructuras con base en los grupos funcionales presentes (ésteres, ácidos carboxílicos, hidroxilos, metoxilos, metilos, glucosa, manosa, etc.) y su actividad biológica representada por su  $CI_{50}$  en  $\mu M$ .

### 6.5 Análisis conformacional, optimización geométrica y cálculo de energía

Las estructuras en 2D de los iridoides, se convirtieron a 3D empleando el programa SPARTAN'20, conservando la estereoquímica de los sustituyentes de cada iridoide. Posteriormente, se realizó un análisis conformacional de todos los iridoides simples y glicosilados en su forma neutral y aniónica usando el campo de fuerza MMFF94 (Halgren, 1996). El conformero de mínima energía se sometió a una optimización geométrica, sin restricciones de simetría, empleando el método semiempírico PM6 (Stewart, 1989). Se realizó un análisis de frecuencias armónicas para asegurar que la estructura obtenida corresponda a un mínimo en la superficie de energía potencial. Además, se realizó una reoptimización geométrica, para obtener un valor más preciso de la energía y de las características de densidad electrónica empleando la teoría de funcionales de la densidad, con la función híbrida B3LYP (Stephens *et al.*, 1994) y un conjunto base 6-31G\* (Hay & Wadt, 1985). Estos sistemas se evaluaron en agua con el modelo SM8 (Chambers *et al.*, 1996). Además, se realizó un cálculo de energía (punto sencillo) usando el mismo funcional B3LYP y la base 6-311+G\*\* (Petersson *et al.*, 1991) en vacío (en agua para el ácido 10-O-(E)-*p*-cumaroil- geniposídico).

### 6.6 Descriptores moleculares

Se obtuvieron los siguientes descriptores moleculares: la energía del orbital molecular más alto ocupado ( $E_{HOMO}$ ), la energía del orbital molecular más bajo ocupado ( $E_{LUMO}$ ), el

momento dipolar ( $\rho$ ), la polarizabilidad ( $\alpha$ ), el área superficial polar (PSA), la cuenta de donadores de enlace de hidrógeno (HBD), y de aceptores de enlace de hidrógeno (HBA), área, volumen, ovalidad ( $\beta$ ) y su solubilidad: LogP (coeficiente de partición 1-octanol/agua), con el programa SPARTAN'20 (Wavefunction, 2020).

## 6.7 Gráficos del potencial electrostático molecular

Se obtuvo el mapa del potencial electrostático (MEP) en una superficie de iso-densidad ( $0.002 \text{ e}/\text{Å}^3$ ) para cada compuesto. El mapa del MEP provee una percepción de la forma molecular y la ubicación de las zonas ricas y deficientes en densidad electrónica en un compuesto. Además, para evaluar el efecto electrónico causado por los sustituyentes en el esqueleto del iridoide, se obtuvo la iso-superficie del potencial electrostático molecular (PEM) con un valor de  $-10 \text{ kcal/mol}$ . Todos los gráficos moleculares se realizaron con el programa SPARTAN'20.

## 6.8 Análisis de similitud molecular de iridoides

El análisis se realizó considerando los elementos en la estructura base de los iridoides (átomos del biciclo) y en los descriptores de funciones químicas (CFD's, por sus siglas en inglés) de la genipina y del genipósido. Para ello, se emplearon las estructuras en 3D de los iridoides en la representación de líneas (wire) en SPARTAN'20, mostrando el vector del dipolo y se realizó el alineamiento de los iridoides con base en sus CFD's. Se obtuvo un puntaje de alineamiento, cuyo valor se encontró entre 0 y 1.

## 6.9 Construcción y validación del QSAR

### 6.9.1 Descriptores moleculares

Adicional a los descriptores moleculares obtenidos previamente, se obtuvieron los siguientes descriptores: la dureza química ( $\eta$ ), la electronegatividad ( $\chi$ ),  $\Delta$ polarizabilidad,  $\Delta$ PSA, y algunos relacionados a su tamaño y forma:  $\Delta$ área,  $\Delta$ volumen,  $\Delta$ ovalidad, y su solubilidad:  $\Delta$ LogP, and LogP<sup>2</sup>. Todos los  $\Delta$  son las diferencias en los valores entre el descriptor del iridoide en caso y el descriptor de la genipina. Todos los cálculos fueron realizados en el programa SPARTAN'20. El LogS (cálculo de la solubilidad acuosa) fue un descriptor extra y se obtuvo del Laboratorio de Química Computacional Virtual (VCCL, 2023). La energía correspondiente al  $E_{\text{HOMO}}$  representa el potencial de ionización de la molécula y  $E_{\text{LUMO}}$  al valor correspondiente de la afinidad electrónica, de acuerdo con la aproximación de Koopmans.

### 6.9.2 Generación del modelo matemático

Se construyó el modelo matemático QSAR mediante una regresión multilineal mediante diferencias de mínimos cuadrados usando Excel Microsoft Office 365. Todos los descriptores moleculares y la actividad biológica ( $CI_{50}$ ) de los iridoides se usaron como variables independientes (X) y la variable dependiente (Y), respectivamente.

### 6.9.3 Validación estadística

Para la validación del modelo QSAR, se empleó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ,

$$t^N(\varepsilon) = \frac{p \cdot \varepsilon - R}{p \cdot R} \quad (7)$$

ecuación 2), de validación cruzada  $R^2$  ( $Q^2$ ), desviación estándar ( $s$ ), y de la prueba de Fisher ( $F$ ) (Razo-Hernández *et al.*, 2014). Los últimos dos parámetros proporcionaron información acerca de cómo la correlación entre las actividades experimental y calculada es afectada por el número de compuestos en el estudio (ecuación 3), y que probabilidad hay de que el modelo matemático casualmente ocurra (ecuación 4).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2)$$

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2} \quad (3)$$

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / df_M}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / df_E} \quad (4)$$

Donde  $\hat{y}_i$ ,  $\bar{y}$ , y  $y_i$  se refieren a los valores de las actividades calculada, promedio y experimental, respectivamente. También,  $df_M$  y  $df_E$  (ecuación 5) se refieren a los grados de libertad del modelo y del error, respectivamente.

$$df_E = n - p - 1 \quad (5)$$

En el modelo matemático,  $R^2$  debe poseer valores altos ( $R^2 \geq 80$ ), mientras  $s$  y  $F$  deberían tener los valores más pequeño y grande, respectivamente, para asegurar que el modelo QSAR es confiable (Gramática, 2013; Razo-Hernández *et al.*, 2014).

También, para llevar a cabo una validación más sofisticada, se emplearon las reglas de redundancia ( $R^P$ ) y sobreajuste ( $R^M$ ) (Marquina *et al.*, 2019). Se corroboró también que los descriptores moleculares no fueran linealmente correlacionados mediante una matriz de correlación de Pearson (Tabla A2).

El objetivo de la regla de redundancia es detectar modelos con un exceso de descriptores moleculares “buenos” ( $R^P$ ), y establecer que si  $R^P < t^P$ , el modelo se rechaza. Dependiendo de los datos, los valores de  $t^P$  van desde 0.01 a 0.1.  $R^P$  se define por la ecuación 6.

$$R^P = \prod_{j=1}^{P^+} \left( 1 - M_j \left( \frac{p}{p-1} \right) \right); \quad M_j > 0 \quad y \quad 0 \leq R^P \leq 1 \quad (6)$$

Por otro lado, el propósito de la regla de sobreajuste es detectar modelos con un exceso de descriptores moleculares “malos”. Esta regla estipula que si  $R^N < t^N(\epsilon)$ , el modelo se rechaza. Los valores de  $t^N(\epsilon)$  son calculados mediante la ecuación 7.

donde el intervalo de valores va desde 0.01 y 0.1 y  $p$  es el número de variables en el modelo.  $R^N$  se define por la ecuación 8.

$$R^N = \sum_{j=1}^{p-1} M_j; \quad M_j < 0 \quad \text{and} \quad -1 \leq R^N \leq 0 \quad (8)$$

donde  $M_j$  se define por la ecuación 9.

$$M_j = \frac{R_{jY}}{R} - \frac{1}{p}; \quad -\frac{1}{p} \leq M_j \leq \frac{p-1}{p} \quad (9)$$

$R_{jY}$  es el valor absoluto del coeficiente de regresión entre los descriptores  $j$ th y la respuesta  $Y$ .

#### 6.9.4 Validación estadística de la predicción

Además, se evaluó la habilidad predictiva del modelo mediante el método “Leave-One-Out” ( $Q_{LOO}^2$ ), en el cual un compuesto se remueve del conjunto de datos y la actividad ( $Y_{exp}$ ) se correlaciona usando el resto de los datos. La ecuación 10 se utilizó para calcular  $Q_{LOO}^2$ .

$$Q_{LOO}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (10)$$

donde  $\hat{y}_i$  es el valor de la actividad predicha ( $Y_{pred}$ ).

La evaluación del dominio de aplicabilidad se llevó a cabo mediante la construcción de un gráfico de William, el cual depende de los valores de apalancamiento y el error estandarizado del cálculo. Los valores de apalancamiento ( $h$ ) se obtuvieron de la matriz de apalancamiento  $H$ , la cual contiene información acerca de los descriptores sobre los cuales se construyó el modelo. La matriz de apalancamiento se define como la ecuación 11.

$$H = X \cdot (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \quad (11)$$

donde  $X$  es la matriz del descriptor seleccionado;  $X^T$  es la matriz transpuesta de  $X$ ; y  $(X^T \cdot X)^{-1}$  es el inverso de la matriz  $(X^T \cdot X)$ . Los valores de apalancamiento son los elementos diagonales de la matriz  $H$ . La palanca de advertencia ( $h^*$ ) se calculó como  $h = 3p/n$ , donde  $n$  es el número de moléculas y  $p$  es el número de descriptores en el modelo más uno. Si uno de los compuestos tiene un valor más alto de apalancamiento que  $h^*$ , será considerado como un “outlier”, es decir, que está fuera del dominio de aplicabilidad del modelo.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

### 7.1 Efecto citotóxico de los iridoideos en las líneas celulares

En cuanto a los ensayos de citotoxicidad para obtener la  $CI_{50}$  de los iridoideos genipósido y genipina, se obtuvieron los siguientes resultados del porcentaje de sobrevivencia de las células CaLo después de 72 horas de tratamiento con respecto a la concentración del compuesto utilizado, se muestran también los gráficos respectivos del control de citotoxicidad podofilotoxina y del compuesto cisplatino (Figura 22). La  $CI_{50}$  de la genipina fue  $58.97 \mu\text{M}$  y el genipósido no fue activo a las concentraciones probadas; a diferencia de la línea CaLo, la línea celular INBL (Figura 23), también VPH18, aunque de un estadio más avanzado, fue menos sensible al iridoide genipina, teniendo una  $CI_{50}$  tres veces mayor y no fue sensible a genipósido en la concentración más alta probada (Tabla 1).

La línea celular CaSki (Figura 24) también fue sensible al iridoide genipina, provocando la inhibición de la viabilidad celular en un 50% a la concentración de  $65.93 \mu\text{M}$ ; esta línea celular no mostró ser sensible a genipósido a la concentración máxima ensayada (Tabla 1). Sin embargo, la línea celular HaCaT (Figura 25) fue menos sensible a la genipina, la  $CI_{50}$  de este iridoide fue  $106.25 \mu\text{M}$ .

**Tabla 1.** Concentraciones medias inhibitorias ( $CI_{50}$ ) de los compuestos ensayados contra las líneas celulares de cáncer cervicouterino y de cáncer de mama.

Línea celular	Genipina ( $\mu\text{M}$ )	Genipósido ( $\mu\text{M}$ )	Cisplatino ( $\mu\text{M}$ )	Podofilotoxina ( $\mu\text{M}$ )
CaSki	$65.93 \pm 4.42$	>1000	$0.64 \pm 0.08$	$0.025 \pm 0.001$
CaLo	$58.97 \pm 9.04$	>1000	$0.24 \pm 0.02$	$0.014 \pm 0.002$
INBL	$178.80 \pm 12.99$	>1000	$1.34 \pm 0.16$	$0.011 \pm 0.001$
MDA-MB-231	$268.70 \pm 24.36$	>1000	$7.61 \pm 0.68$	$0.026 \pm 0.005$
MCF-7	$70.12 \pm 8.81$	>1000	$2.12 \pm 0.17$	$0.018 \pm 0.002$
BT-549	$75.43 \pm 16.60$	>1000	$1.92 \pm 0.11$	$0.021 \pm 0.003$
HaCaT*	$106.25 \pm 9.29$	>1000	$1.15 \pm 0.14$	$0.050 \pm 0.006$

En cuanto a las líneas celulares de cáncer de mama, las líneas MCF-7 (Figura 26) y BT-549 (Figura 27) fueron las más sensibles al tratamiento con el iridoide genipina, siendo la  $CI_{50}$  de  $70.12$  y  $75.43 \mu\text{M}$ , respectivamente (Tabla 1); sin embargo, estas líneas celulares no mostraron sensibilidad al iridoide glucosilado genipósido a la concentración más alta probada ( $1000 \mu\text{M}$ ). La línea celular de cáncer de mama menos sensible a genipina fue la línea MDA-MB-231, cuya  $CI_{50}$  fue  $268.70 \mu\text{M}$  (Figura 28).

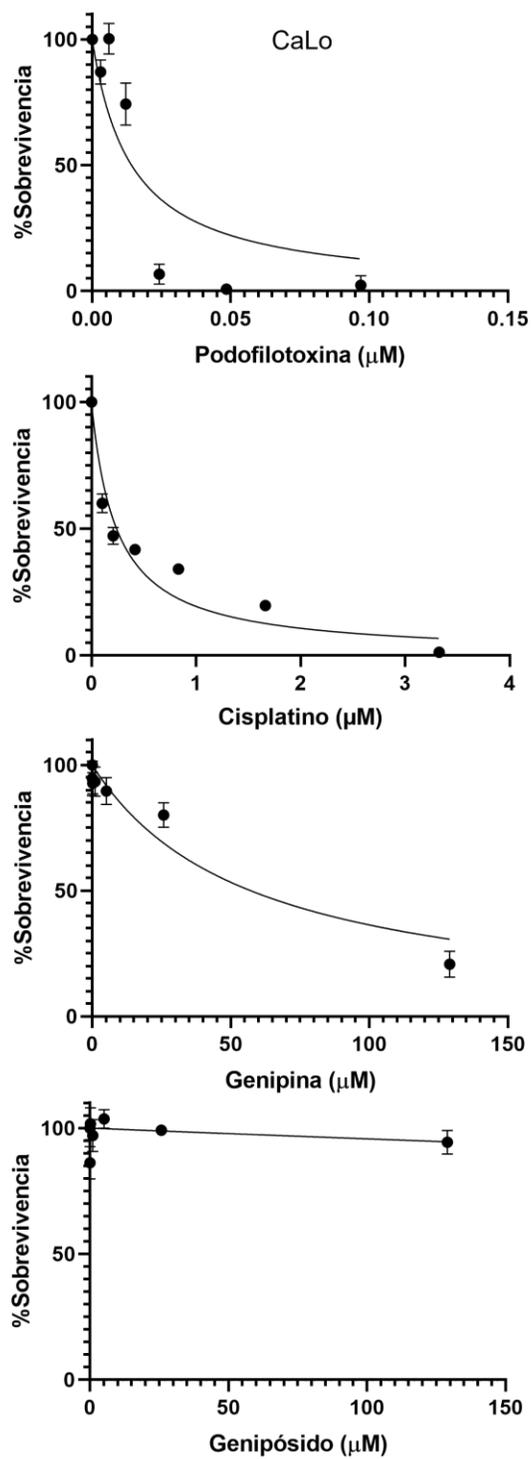


Figura 22. Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular CaLo.

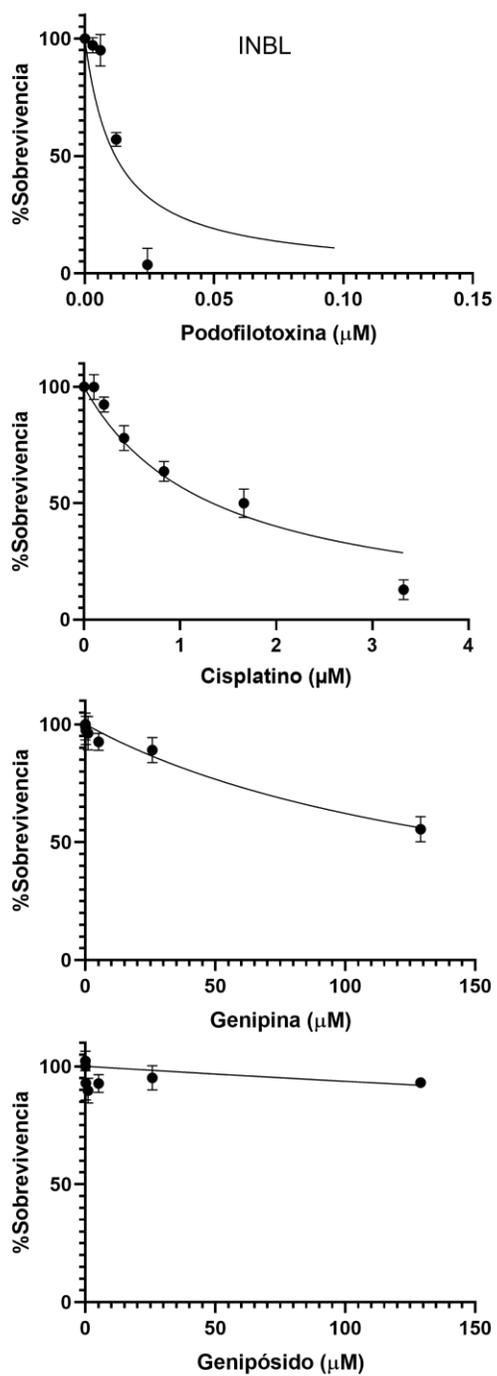
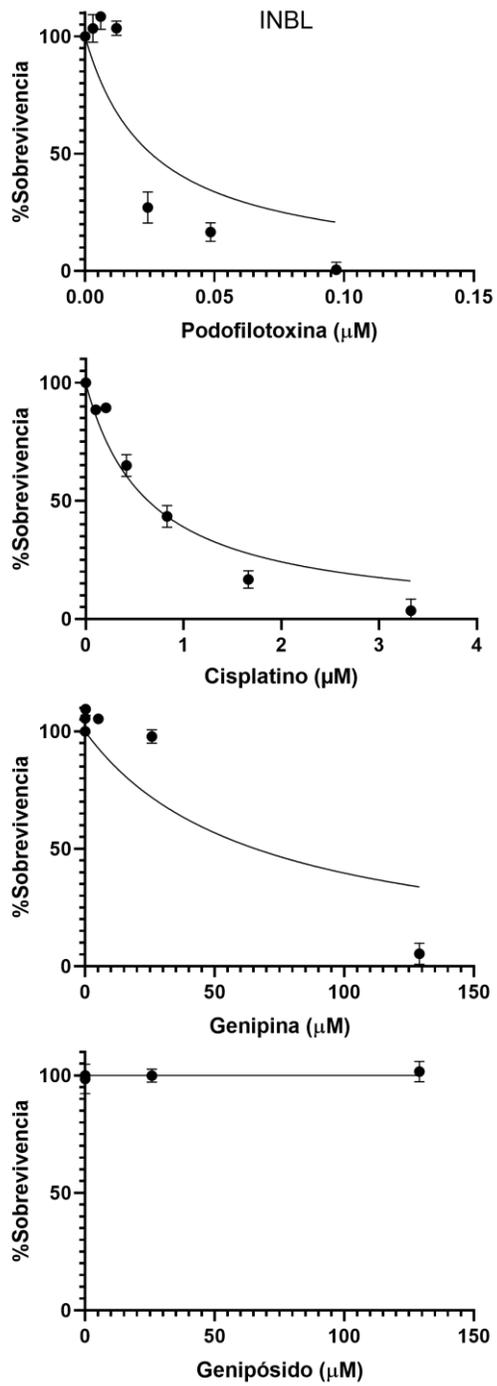


Figura 23. Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular INBL.



**Figura 24.** Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular CaSki.

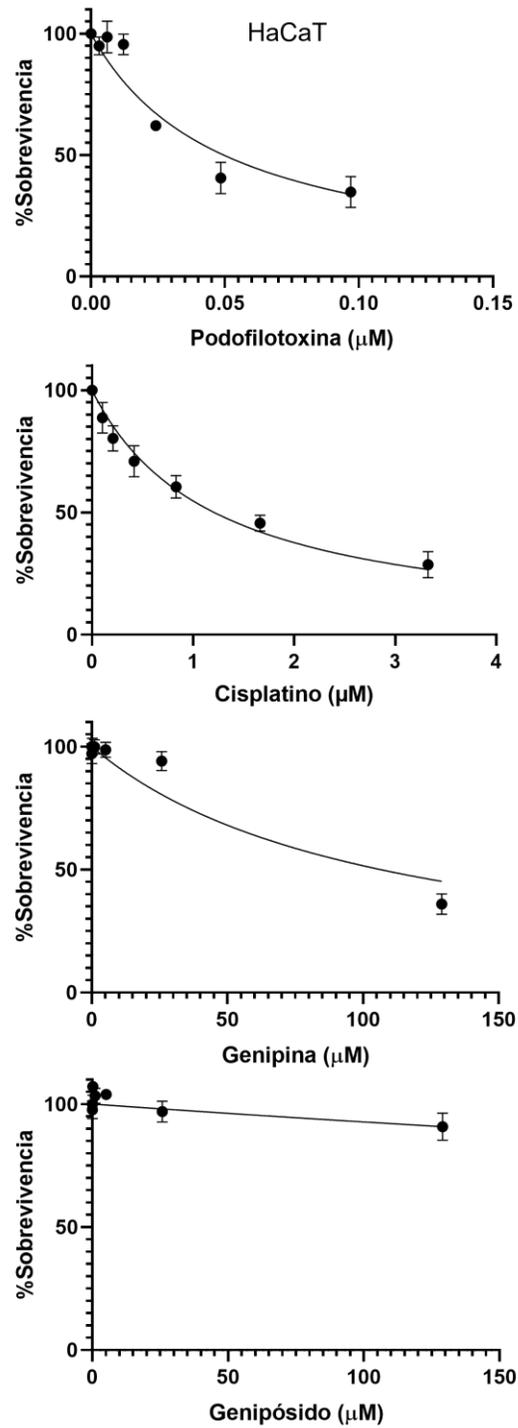
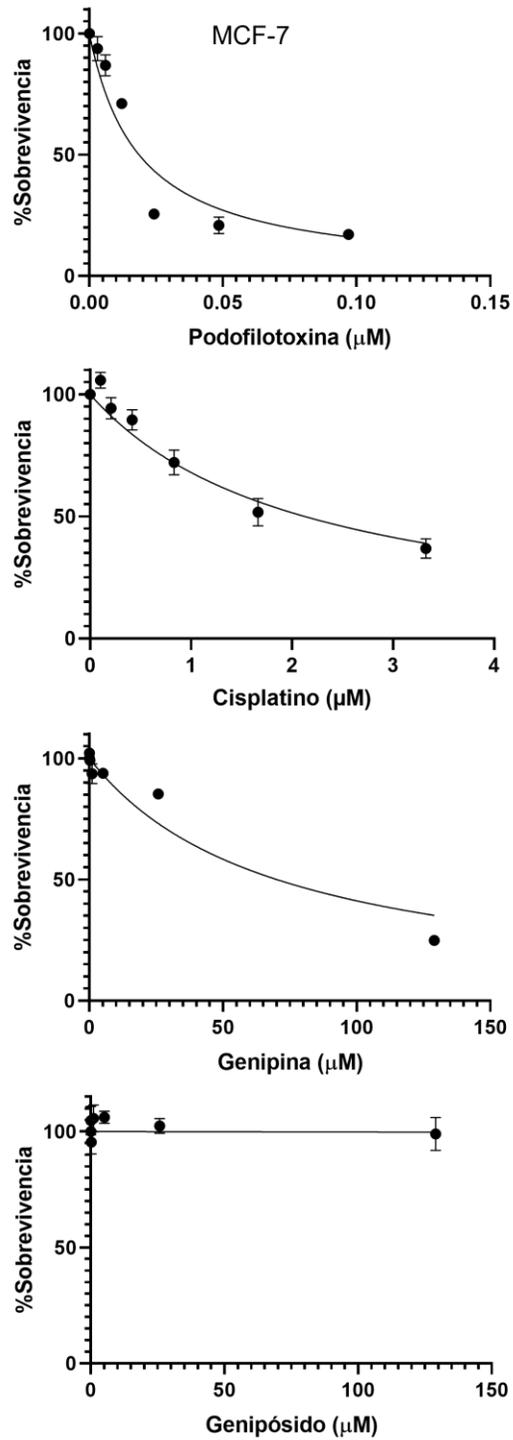
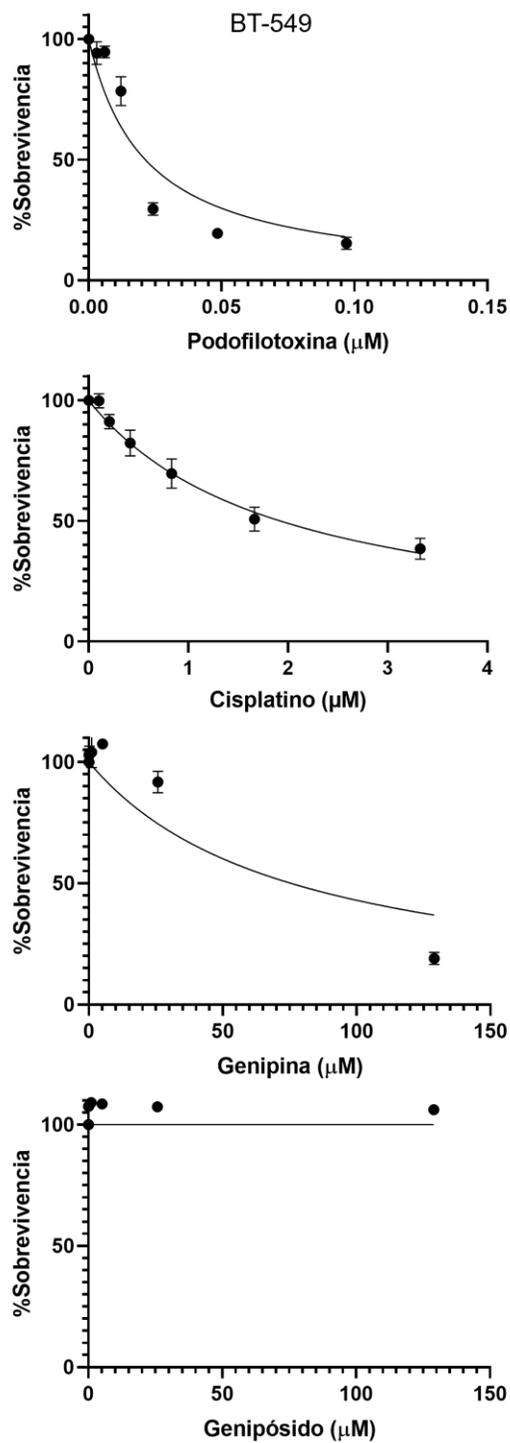


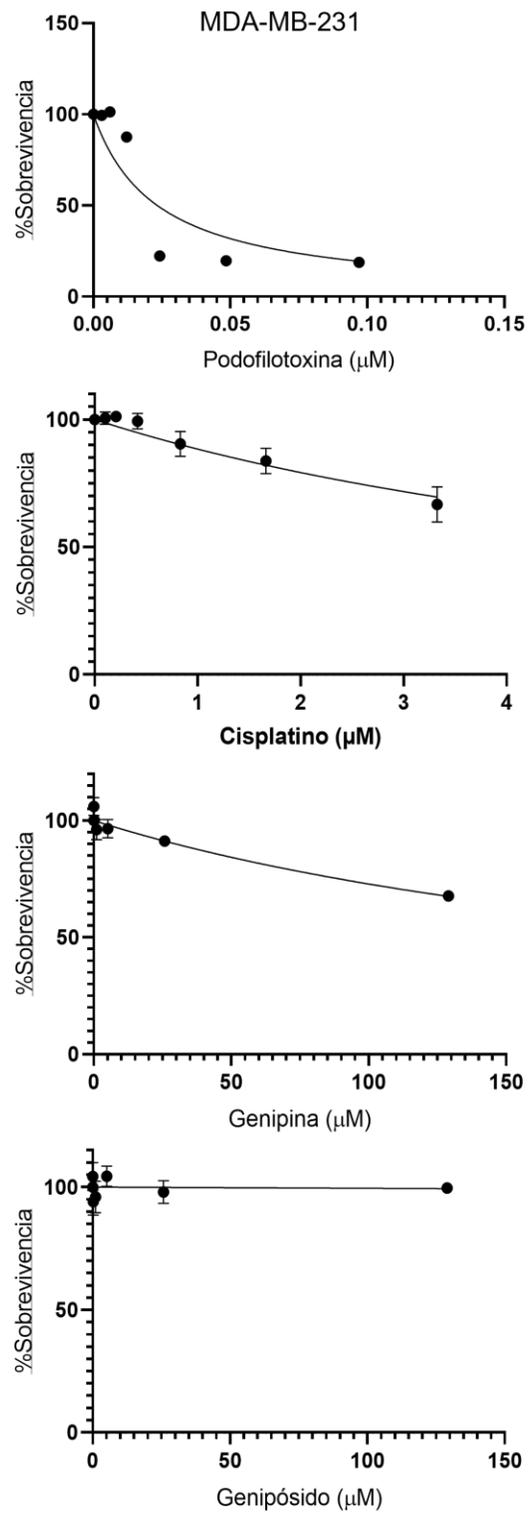
Figura 25. Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular HaCaT.



**Figura 26.** Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular MCF-7.

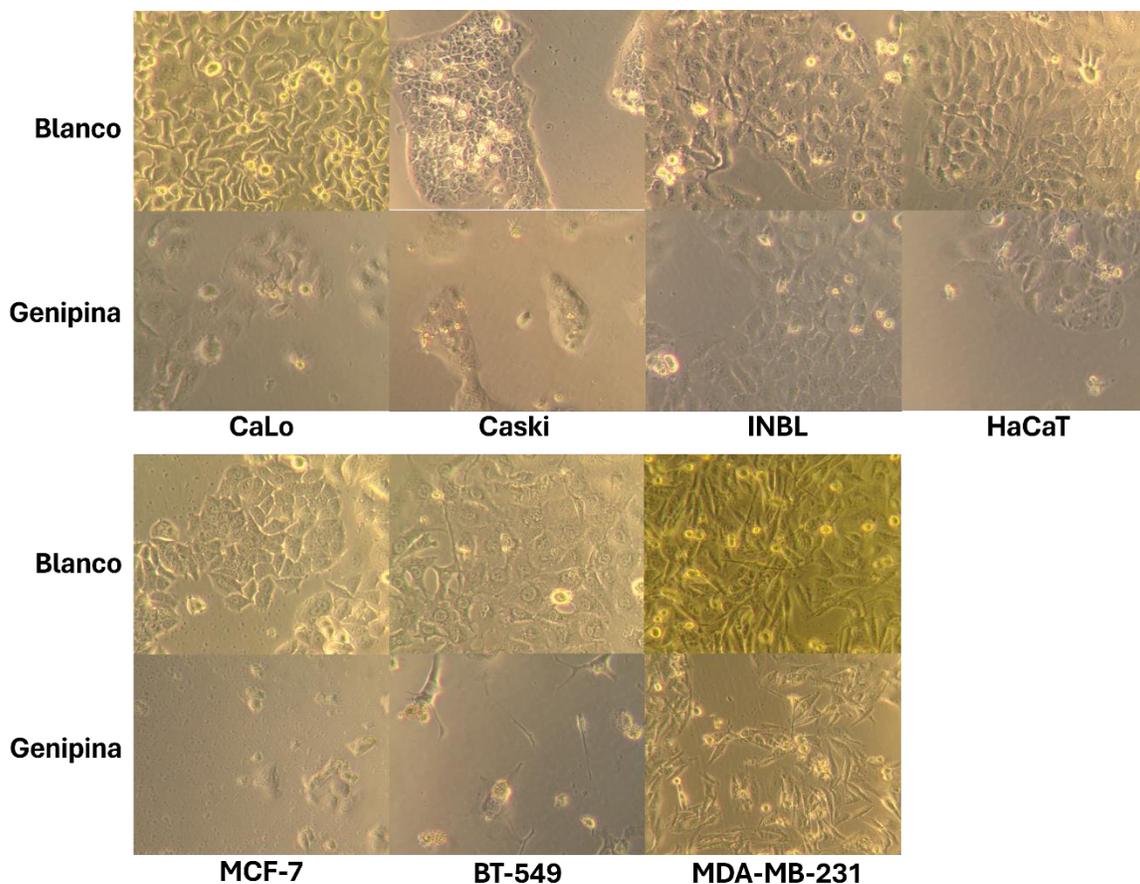


**Figura 27.** Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular BT-549.



**Figura 28.** Efecto citotóxico de genipina, genipósido y los controles positivos contra la línea celular MDA-MB-231.

En la Figura 29 se puede observar el efecto de la genipina a la concentración más alta probada (129  $\mu\text{M}$ ) en cada una de las líneas celulares empleadas, donde en algunos casos se alcanzan a observar cuerpos apoptóticos y vacuolas.



**Figura 29.** Micrografías de las líneas celulares evaluadas con genipina por 72 h a la concentración más alta probada. Tomadas a una magnificación de 10X.

Los resultados de la citotoxicidad de los iridoides genipósido y genipina contra las líneas celulares ensayadas confirmaron lo reportado por Neri-Numa y colaboradores en el 2020, en cuyo estudio el estándar de genipósido fue inactivo ( $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ) en las condiciones experimentales, mientras que el estándar de genipina inhibió todas las líneas celulares evaluadas (7.5-29.0  $\mu\text{g/mL}$ ). En el presente trabajo, el genipósido no fue un iridoide activo contra ninguna de las líneas celulares ensayadas, en cambio la genipina fue activa en todas, y la línea celular más sensible fue la línea celular de cáncer cervicouterino CaSki ( $CI_{50}$ : 58.97  $\mu\text{M}$ ) y la línea celular de cáncer de mama MCF-7 ( $CI_{50}$ : 70.12  $\mu\text{M}$ ). Hasta el momento, no existen reportes de la actividad citotóxica de genipina en la línea de cáncer de mama triple negativo BT-549, lo cual representa un hallazgo novedoso ya que este tipo de cáncer

presenta bajas tasas de supervivencia, con una tasa alta de recurrencia y existe un número limitado de tratamientos quimioterapéuticos contra él (Lee, 2023).

Derivado de la búsqueda en la literatura, al momento sólo existen dos reportes de citotoxicidad del genipósido en cuatro líneas celulares de cáncer oral escamoso; sin embargo, no se reporta su concentración media inhibitoria, pues no se alcanzó a obtener en las condiciones experimentales con una línea celular (Chen *et al.*, 2017). En dicho trabajo, se reporta el uso de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG para metabolizar el genipósido y mejorar el efecto citotóxico de este iridoide en esta línea celular de cáncer. En un segundo reporte con otras tres líneas celulares si se alcanza una disminución de la viabilidad celular >50% a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Bai *et al.*, 2022).

De acuerdo con Hwang *et al.*, (2012), algunos iridoideos glucosilados por sí mismos son una forma inactiva, mientras que los iridoideos productos de la hidrólisis enzimática del enlace glucosídico para formar sus agliconas, son la forma activa. En el caso del genipósido, se conoce que el producto de hidrólisis es su aglicona genipina (Shan *et al.*, 2017). El producto derivado de la hidrólisis del genipósido fue activo en la línea celular de cáncer de próstata DU145 y la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Hwang *et al.*, 2012); en la línea celular DU145 desreguló la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL y survivina. inhibió la activación de STAT3 constitutivo, indujo la escisión de procaspasa-8 y procaspasa-9, activó caspasa-3 y causó la escisión de PARP, lo cual sugirió que indujo apoptosis dependiente de caspasa-3 (Hwang *et al.*, 2012).

La concentración media inhibitoria de genipina, obtenida en el presente trabajo, en la línea celular MDA-MB-231 (268.70  $\mu\text{M}$ ) es menor y en concordancia ya que el tiempo de exposición fue 3 veces mayor, a lo reportado en el 2012 por Kim, Jeong & Moon, quienes obtienen una  $\text{CI}_{50}$  de 327  $\mu\text{M}$  para esta misma línea celular en un ensayo de viabilidad donde expusieron las células cancerosas con genipina por 24 h. El iridoide genipina indujo apoptosis en esta línea celular, mediante la desregulación de Bcl-2, la sobreexpresión de Bax y la activación proteolítica de caspasa-3; genipina también incrementó la activación de JNK y MAPK p38 (Kim, Jeong & Moon, 2012).

Diversos estudios con genipina en ensayos *in vitro* con líneas celulares de cáncer de colon (HCT116 y SW840), cáncer de riñón (T24 y 5637) leucemia (K562), entre otros, muestran que estas líneas celulares fueron sensibles a genipina, en un intervalo de concentración similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo, reportando concentraciones medias inhibitorias de 80-250  $\mu\text{M}$  (Feng *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2018; *al.*, 2018).

En cuanto a las líneas celulares de cáncer cervicouterino, las cuales fueron sensibles a genipina, son CaLo, CaSki e INBL ( $\text{CI}_{50}$ : 58.97, 65.93 y 178.80  $\mu\text{M}$ , respectivamente), de las cuales, la segunda es VPH16 y las otras dos VPH18; hasta el momento no se tiene conocimiento de la evaluación *in vitro* de genipina en estas líneas celulares de cáncer cervicouterino. En la literatura se encontró que la línea celular HeLa, la cual contiene ambos tipos de virus agresivos, fue expuesta a genipina por un tiempo de 24 h, y tuvo una  $\text{CI}_{50}$  de

90 µg/mL, lo que equivale a 397 µM (Cao *et al.*, 2010); se reporta que genipina indujo apoptosis, así como el incremento de las proteínas JNK, p-Jun, p53 y Bax. Esto indica que las líneas celulares ensayadas en este trabajo fueron más sensibles que la línea celular HeLa, aunque no se pueden comparar del todo, ya que los tiempos de exposición fueron diferentes, en este trabajo 72 h y en el reporte de Cao y colaboradores, fue de 24 h.

Derivado de los resultados de la evaluación citotóxica de genipósido y genipina, se propuso realizar un análisis de la relación estructura-actividad (SAR), un análisis de similitud molecular y un análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) de iridoides reportados con actividad citotóxica *in vitro* en cáncer cervicouterino, con el fin de explicar las características estructurales y moleculares que le confieren dicha actividad biológica.

## 7.2 Análisis SAR de diversos iridoides contra cáncer cervicouterino

Se recopilaron estructuras de 47 iridoides de 14 artículos científicos que fueron evaluados contra líneas celulares de cáncer cervicouterino para realizar el análisis de la relación estructura-actividad (Tabla A1, Figura A1). De estos iridoides recopilados, se seleccionaron 13 iridoides (incluyendo genipósido y genipina), considerando los siguientes dos parámetros de selección: 1) que hubieran sido evaluados en una misma línea celular; 2) durante el mismo tiempo de exposición; y 3) con alta similitud estructural con respecto a genipósido y genipina, con las menores variaciones en sus sustituyentes. Fue entonces como se seleccionaron los 13 iridoides que se enlistan en la Tabla 2 evaluados en la línea celular HeLa a un tiempo de tratamiento de 48 horas.

Debido a que no se encontraron reportes de citotoxicidad en la literatura de genipósido y genipina contra la línea celular HeLa a las 48 horas, se realizaron los ensayos empleando el método MTS. La  $CI_{50}$  de la genipina a este tiempo de tratamiento fue de  $419 \pm 27.25 \mu\text{M}$ , en dicho ensayo se empleó paclitaxel como control positivo ( $CI_{50}$ :  $15.8 \pm 0.67 \text{ nM}$ ), mientras que el genipósido no mostró actividad como en las evaluaciones anteriores contra otras líneas celulares de cáncer cervicouterino.

**Tabla 2.** Iridoides con actividad citotóxica contra la línea celular HeLa.

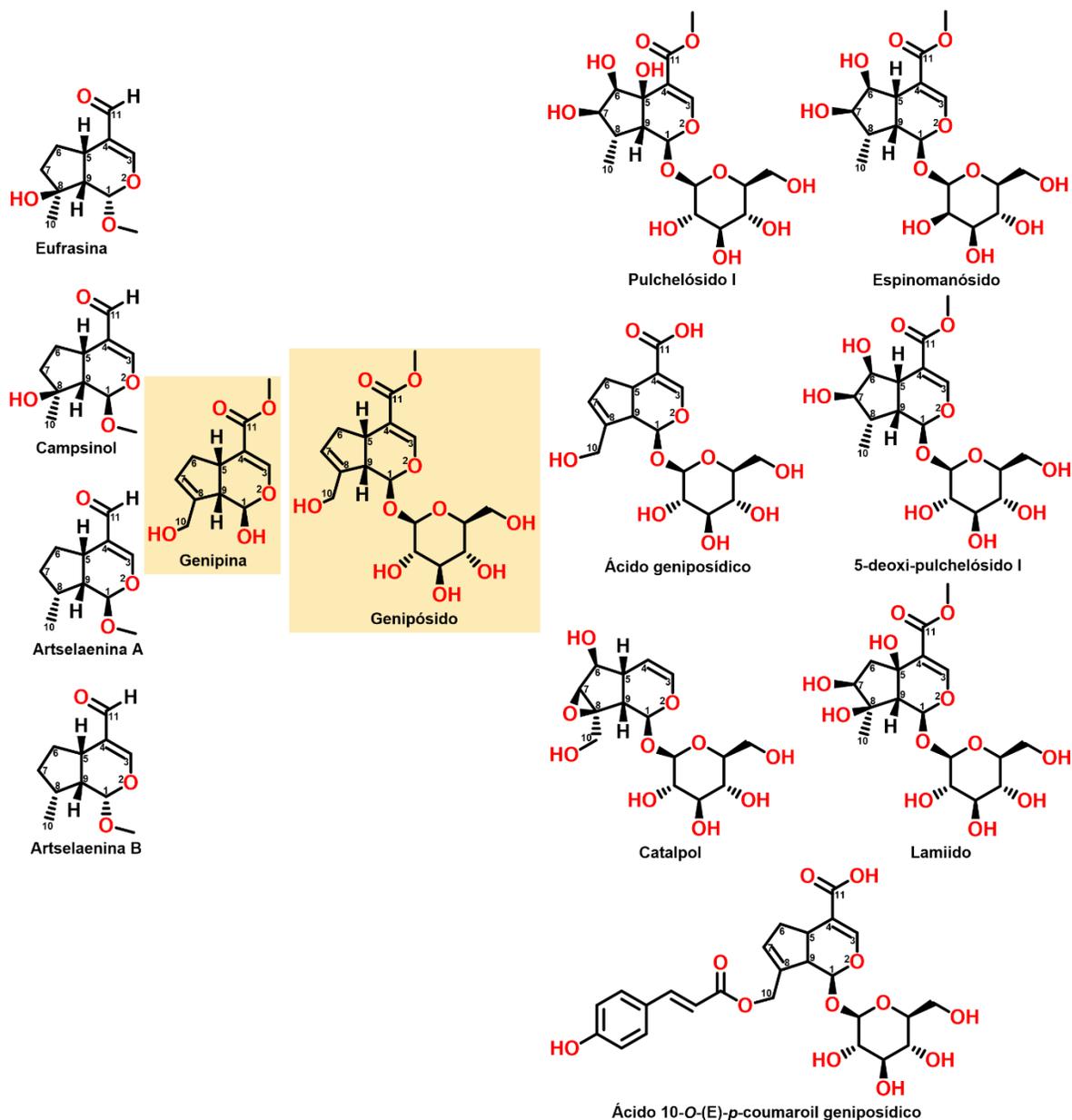
Compuesto	Línea celular	Tiempo de Exposición (h)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Eufrasina <sup>1</sup>	HeLa	48	0.20
Campsinol <sup>1</sup>	HeLa	48	1.90
Artselaenina B <sup>1</sup>	HeLa	48	12.30
Artselaenina A <sup>1</sup>	HeLa	48	13.80
Pulchelósido I <sup>2</sup>	HeLa	48	25.22
Catalpol <sup>3</sup>	HeLa	48	28.20
Lamiido <sup>2</sup>	HeLa	48	31.96
Espinomanósido <sup>2</sup>	HeLa	48	38.89
5-deoxipulchelósido I <sup>2</sup>	HeLa	48	42.47
Ácido geniposídico <sup>4</sup>	HeLa	48	43.60
Ácido 10-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil geniposídico <sup>3</sup>	HeLa	48	48.10
Genipina	HeLa	48	419.00 <sup>5</sup>
Genipósido	HeLa	48	NA <sup>5</sup>

<sup>1</sup>compuestos de (Marcotullio *et al.*, 2015); <sup>2</sup>compuestos de (Saidi *et al.*, 2020a); <sup>3</sup>compuestos de (Feng *et al.*, 2011); <sup>4</sup>compuestos de (Wang *et al.*, 2018); <sup>5</sup>Datos experimentales. NA: No activo.

Las estructuras químicas en 2D se muestran en la Figura 30, del lado izquierdo se encuentran los iridoides simples incluyendo genipina, y del lado derecho los iridoides glicosilados incluyendo genipósido. Todos estos iridoides fueron evaluados contra la línea

celular HeLa bajo la misma condición de tratamiento de 48 horas. Las estructuras químicas de estos iridoides generalmente presentaron sustituyentes como: metilo, hidroxilo, hidroximetilo, éster, ácido, aldehído y glucosa. En algunos casos particulares presentaron manosa, epoxi y *p*-cumaroil. El esqueleto del iridoide en algunos casos presentó un doble enlace entre C7 y C8, como se muestra en la Figura 24.

Los iridoides de la Figura 30 fueron ensayados contra la línea celular HeLa en un mismo tiempo de tratamiento: 48 horas. Las estructuras químicas de estos iridoides generalmente presentan sustituyentes del tipo: metil, hidroxil, hidroximetil, éster, ácidos carboxílicos, aldehídos y glucosa. En casos particulares se presentan otros sustituyentes como la manosa, el grupo epoxi y el *p*-cumaroil. El esqueleto iridoide (Figura 20), en algunos casos presentó un doble enlace entre C7 y C8. Posteriormente, se realizó un proceso de re-optimización usando la teoría de funcionales de la densidad (DFT en inglés) con el fin de obtener una geometría y valores de energía más precisos para las moléculas. El objetivo fue analizar la relación estructura-actividad de los iridoides (Figura 30), basada en su distribución electrónica y en propiedades derivadas de la misma (polarizabilidad, dureza, potencial electrostático molecular y momento dipolar).

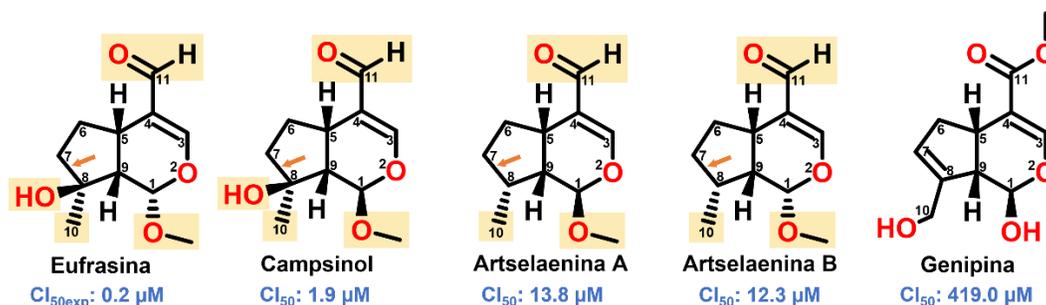


**Figura 30.** Estructuras químicas 2D de los iridoides ensayados contra la línea celular HeLa, de los cuales genipina y genipósido son los iridoides centrales en este trabajo.

Existen algunos reportes de estudios de SAR con iridoides que han sido probados contra HeLa (Saidi *et al.*, 2020a; Saidi *et al.*, 2020b). En el primer reporte de Saidi *et al.*, (2020a) se menciona que la adición de un hidroxilo en la posición 5 en el pulchelósido I, en comparación con el 5-deoxi-pulchelósido I, provoca un incremento en la actividad del iridoide. Además de que el cambio en la posición de un grupo hidroxilo del C-6 al C-8

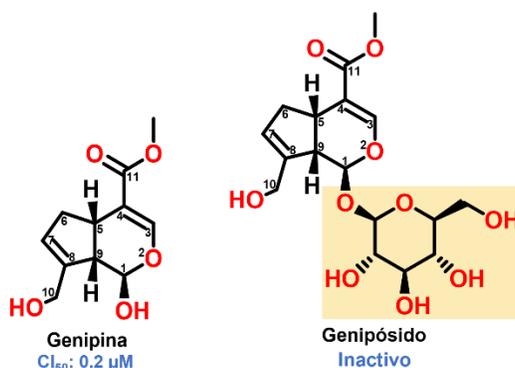
disminuyó su actividad como sucede en el caso de lamiido con respecto a 5-deoxipulchelósido I.

Las estructuras 2D de los iridooides simples se presentan en la Figura 31. La genipina tiene diversas diferencias estructurales comparada con los otros iridooides simples: tiene un grupo éster en C4, mientras que los otros tienen un grupo aldehído. Genipina tiene un doble enlace entre C7 y C8, y los otros presentan un enlace sencillo. Genipina presenta un hidroxilo en C1, mientras que los otros iridooides presentan un grupo metoxilo.



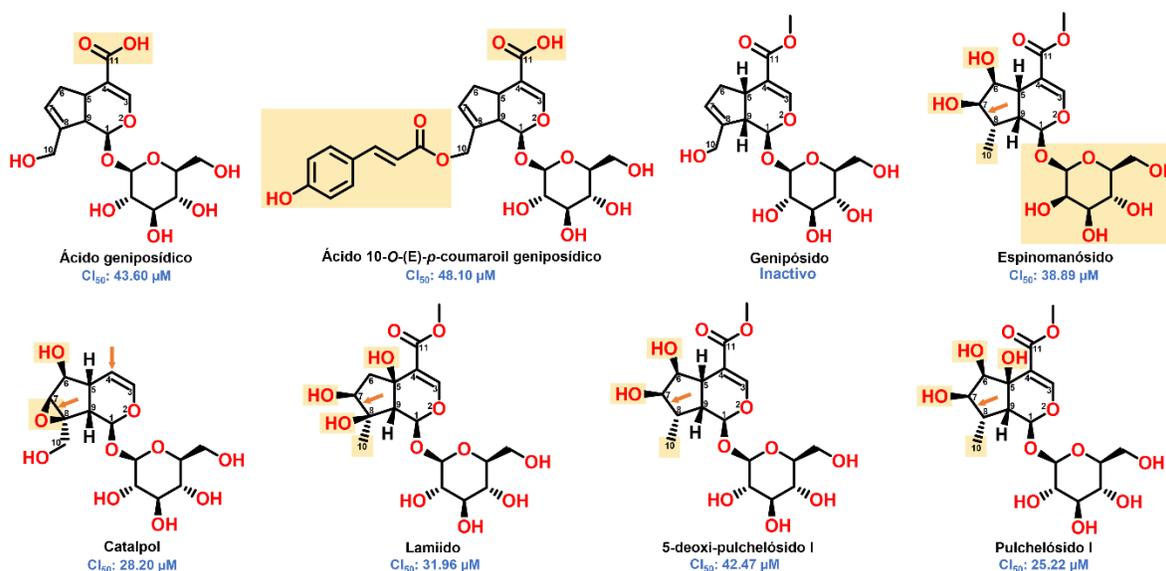
**Figura 31.** Estructuras 2D de iridooides simples incluyendo genipina evaluados contra la línea celular HeLa. Los cuadros amarillos resaltan los cambios estructurales entre los iridooides simples comparados con genipina, y la ausencia del doble enlace se señala con la flecha naranja.

A continuación, las estructuras en 2D de genipina y de genipósido se muestran en la Figura 32, en la cual se resalta la única diferencia estructural, que es el cambio de un hidroxilo por una glucosa en C1 como lo es el caso de genipósido. Hasta este punto, esta gran diferencia estructural podría explicar la inactividad del genipósido; sin embargo, los demás iridooides glicosilados cuya  $CI_{50}$  se encuentran en un intervalo de 25.22-48.10  $\mu$ M, por lo que esta hipótesis se descarta.



**Figura 32.** Estructuras 2D de iridooides genipina y genipósido evaluados contra la línea celular HeLa. El cuadro amarillo resalta el cambio estructural entre ambos iridooides.

Tal como se mencionó arriba, aunque los iridoides glicosilados comparten un fragmento de azúcar, éstos presentan actividad citotóxica a diferencia de genipósido (Figura 33). Entre los cambios estructurales que los iridoides glicosilados presentan con respecto a genipósido, se encuentran hidroxilos en el ciclopentano, ácido carboxílico en C4, y en los casos en que se conserva el éster en C4, el doble enlace de C7-C8 está ausente. Estos iridoides tienen una unidad de glucosa en C1, excepto espinomanósido, el cual contiene un grupo manosil en C1 en vez de un grupo glucosil. El 5-deoxipulchelósido I, tiene dos hidroxilos extras en C6 y C7, que carece del doble enlace en C7-C8, y tiene un metilo en vez de un hidroximetilo en C8. El pulchelósido I, además de estas diferencias estructurales comparado con genipósido, también presenta un hidroxilo extra en C5. El espinomanósido, el cual es estructuralmente muy similar a 5-deoxipulchelósido I, contiene una manosa en vez de la glucosa. El lamiido presenta un hidroxilo en C5, C7 y C8, carece del doble enlace en C7-C8, y tiene un metilo en vez del hidroximetilo en C8. El catalpol presenta un grupo epoxi en C7-C8, carece del doble enlace en C7-C8, contiene un hidroxilo en C6, y carece del éster en C4 comparado con el genipósido. El ácido geniposídico tiene un ácido en C4, al igual que el ácido 10-*O*-(*E*)-*p*-cumaroil geniposídico (éste último presenta además un grupo *p*-cumaroil en C10), contrario a genipósido, el cual presenta un éster en C4. Estos cambios estructurales, comparado con genipósido, parece conferirle actividad citotóxica contra la línea celular HeLa.



**Figura 33.** Estructuras 2D de iridoides simples incluyendo genipina evaluados contra la línea celular HeLa. Las diferencias estructurales se resaltan en rectángulos amarillos, y la ausencia del doble enlace se señala con la flecha roja.

Se han reportado algunos trabajos de relaciones estructura-actividad de iridoides para estudiar su actividad biológica, como anticancerígenos (Saidi *et al.*, 2020a; Saidi *et al.*, 2020b).

### 7.3 Análisis de similitud molecular

Como un paso inicial, los iridoides simples eufrasina, campsinol, artselaenina A y artselaenina B fueron comparados en términos de su estructura, actividad y descriptores moleculares contra genipina. La Tabla 3 presenta los valores de  $CI_{50}$  y descriptores moleculares calculados para el confórmero de menor energía de cada iridoide simple, como el área de superficie polar (PSA), ovalidad ( $\beta$ ), polarizabilidad ( $\alpha$ ), y el número de donadores (HBD) y aceptores (HBA) de enlaces de hidrógeno. Los primeros cuatro iridoides simples demostraron la potencia más elevada, con valores de  $CI_{50}$  menores a 14  $\mu$ M. Genipina, por el contrario, fue 30-2000 veces menos activa. Artselaenina A presentó un valor de GAP (diferencia entre la  $E_{HOMO}$  y  $E_{LUMO}$ ) más similar al de genipina. Sin embargo, los primeros cuatro iridoides simples difieren en términos de polaridad, como se puede ver reflejado en los valores de PSA. Genipina presentó un valor 1.3-2.4 veces más alto de PSA.

**Tabla 3.** Descriptores moleculares de iridoides simples con actividad citotóxica reportada contra HeLa.

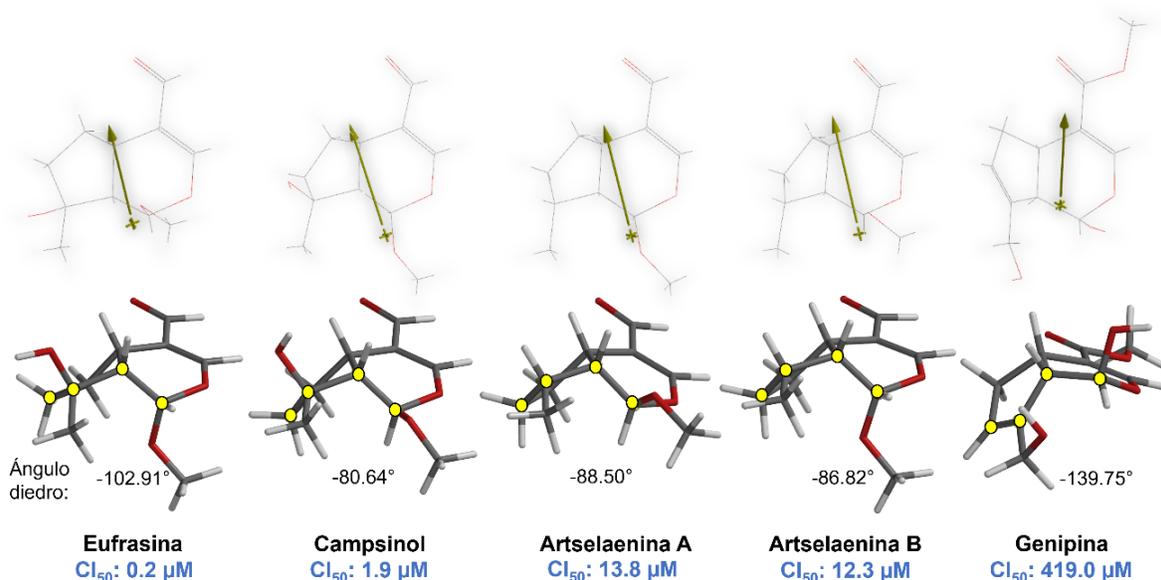
Ligando	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)	GAP (kcal)	$\rho$ (debye)	Área ( $\text{Å}^2$ )	Volumen ( $\text{Å}^3$ )	PSA ( $\text{Å}^2$ )	LogP	LogS	$\alpha$	$\beta$	# HBD	# HBA
Eufrasina	0.2	-123.01	4.81	234.27	216.65	44.645	-0.1	-1.21	57.69	1.34	1	4
Campsinol	1.9	-122.30	5.78	236.86	216.59	46.922	-0.1	-1.21	57.69	1.36	1	4
Artselaenina B	12.3	-125.40	4.67	227.13	208.64	26.808	1.11	-2.23	57.01	1.34	0	3
Artselaenina A	13.8	-121.90	4.2	228.14	209.46	27.236	1.11	-2.23	57.11	1.34	0	3
Genipina	419	-126.18	1.26	239.61	219.74	64.589	-0.26	-1.50	57.91	1.36	2	5

$\rho$ : Momento dipolar; GAP: Diferencia entre  $E_{HOMO}$  y  $E_{LUMO}$ ;  $\alpha$ : Polarizabilidad;  $\beta$ : Ovalidad.

El momento dipolar del resto de los iridoides simples fue más alto, entre 4.2- 5.78 debyes, comparados con genipina, la cual exhibió un momento dipolar más bajo de 1.26 debyes. El momento dipolar es una medida de la polaridad de una molécula, establecido cuando hay una distribución desigual de electrones debido a diferencias en la electronegatividad de los átomos de la molécula. Consecuentemente, el grado de desigualdad en la distribución electrónica es mayor en los iridoides simples que en genipina, lo cual parece favorecer la actividad biológica. Además, eufrasina y campsinol exhibieron propiedades hidrofílicas como aquellas de genipina, mientras que artselaenina A y B mostraron mayor hidrofobicidad que los otros. Genipina también presentó más donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno. Los primeros iridoides fueron similares a genipina en términos del tamaño (área y volumen), y en la forma, como se evidencia por los valores de ovalidad (1.34-1.36). Además, estos iridoides simples compartieron valores de polarizabilidad similares (57.01-57.91).

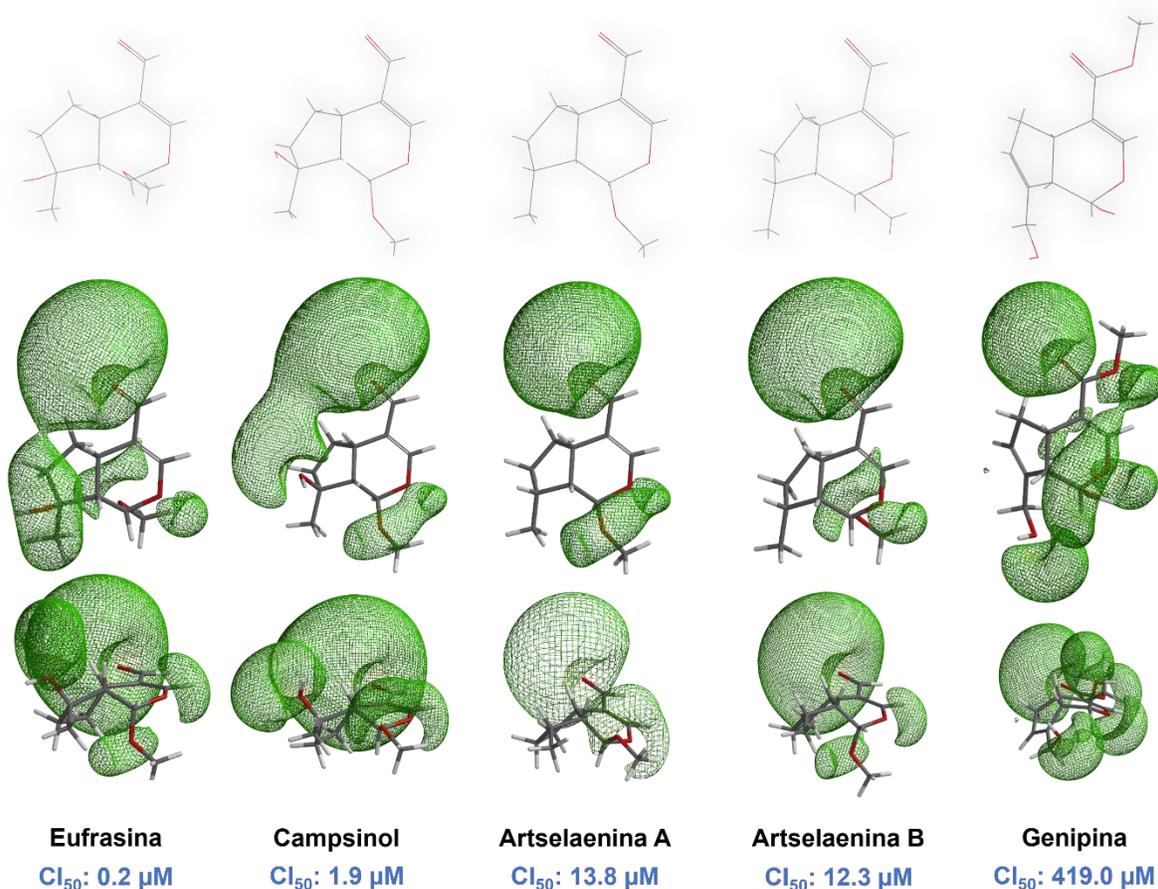
En cuanto a las representaciones en 3D de los iridoides simples, cabe señalar que el ángulo del dipolo en genipina difiere de aquellos en el resto de los iridoides simples, cuya actividad citotóxica es mayor (Figura 34). También se determinó el ángulo diedro, el cual se forma entre dos semiplanos que parten de un arista en común. La deformidad del pirano y del

ciclopentano debida a la ausencia o presencia del doble enlace en C7-C8 y, por tanto, a la pérdida de la rigidez de la estructura del iridoide, se puede observar de manera gráfica, pero también por el valor de este ángulo, ya que en los iridoideos simples se encuentra en un intervalo de  $-102.91^\circ$  a  $-80.64^\circ$ , a diferencia de genipina que tiene el valor más bajo:  $-139.75^\circ$ , al ser una estructura más rígida.



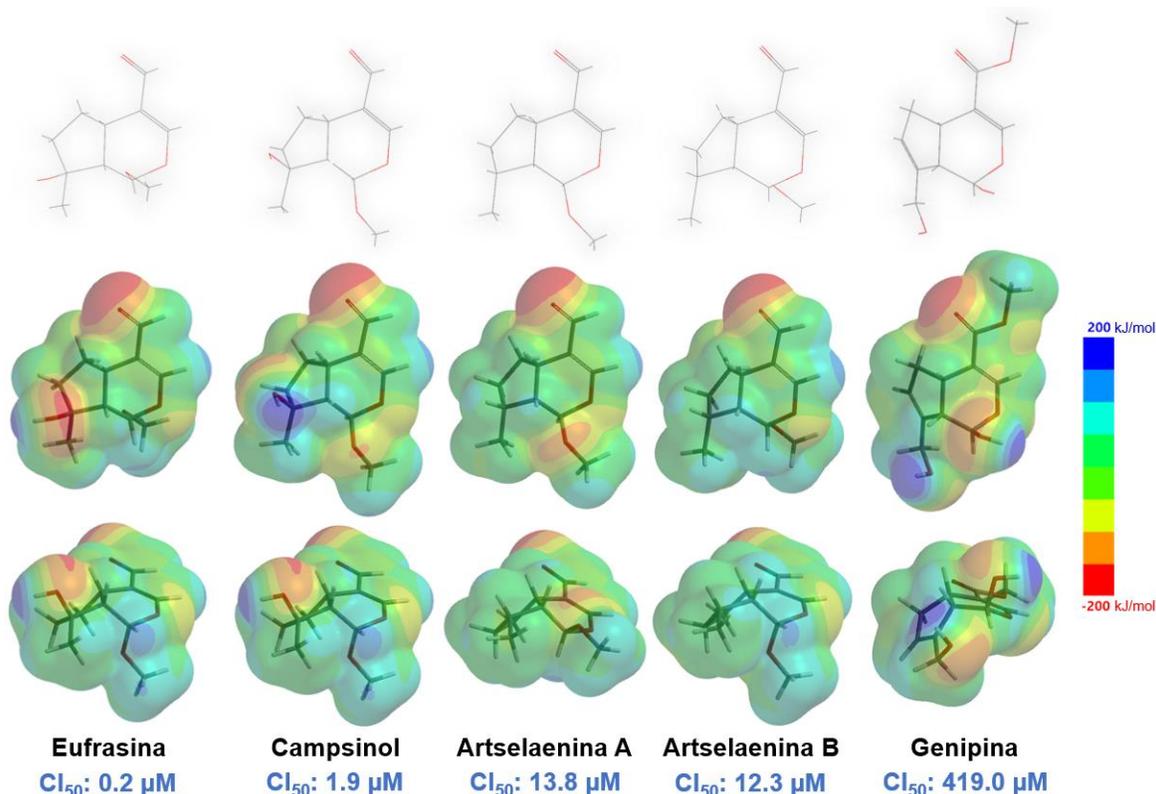
**Figura 34.** Estructuras 3D de iridoideos simples incluyendo genipina. En las estructuras 3D de abajo, se marcan con círculos amarillos los puntos que se consideraron para calcular el ángulo diedro. El vector del dipolo está representado por una flecha dorada.

Después de realizar el análisis SAR, y de analizar la orientación y magnitud del dipolo que se muestra en las estructuras 3D, fue necesario un estudio más profundo de la geometría y las propiedades asociadas a la densidad electrónica, para lo cual se analizó la distribución del potencial electrostático de cada iridoide. Para ello, se obtuvo una iso-superficie del potencial electrostático molecular con valor de  $-10$  kcal/mol, ya que a este valor es posible observar el alcance en el espacio de las interacciones intermoleculares con su blanco biológico que pueden ocurrir en este tipo de moléculas (Figura 35). Los iridoideos más citotóxicos (eufrasina y campsinol) exhibieron una distribución más extendida en el sustituyente aldehídico en C4, y un hidroxilo en C8. Por otro lado, genipina mostró una distribución electrostática en su sustituyente en C4 (una parte en el oxígeno  $sp^2$  y una parte en el oxígeno  $sp^3$ ), y una mayor distribución electrostática en el anillo del pirano, junto con el hidroxilo en C1 y C10. Estas observaciones revelaron las regiones específicas donde los iridoideos simples podrían interactuar con especies cargadas positivamente a un nivel de energía de  $-10$  kcal/mol. La densidad electrónica más alta sobre el grupo aldehídico y el hidroxilo en C8 permitiría una mejor interacción con el posible blanco terapéutico de estos iridoideos.



**Figura 35.** Iso-superficie del del potencial electrostático molecular de -10 kcal/mol de iridoides simples. Se puede observar la representación de la iso-superficie de PEM en malla color verde.

Después, con el fin de comparar la distribución del potencial electrostático de los iridoides para identificar aquellas zonas reactivas de cada molécula, donde se pueden producir reacciones nucleofílicas o electrofílicas, se obtuvo el mapa del potencial electrostático (MEP), el cual se muestra en la Figura 36. El MEP indica las regiones más susceptibles a un ataque electrofílico (color amarillo a rojo, indican exceso de electrones) y aquellos más susceptibles a un ataque nucleofílico (color azul, indican deficiencia de electrones). Las regiones con mayor potencial electrostático están localizadas en el grupo aldehídico en C4, y el hidroxilo en C8. En el caso de genipina, estas zonas de mayor potencial electrostático también corresponden al sustituyente de C4, específicamente a los oxígenos  $sp^2$  y  $sp^3$  del éster que se encuentra en C4, así como al oxígeno del hidroxilo en C1 y C10, correlacionando con nuestras observaciones previas relacionadas a las distribuciones electrostáticas moleculares.



**Figura 36.** Mapa del potencial electrostático de los iridoides simples a una iso-densidad de  $0.002 \text{ e}/\text{\AA}^3$ .

Debido a estos descriptores moleculares, y a las características estructurales que afectan la reactividad de los iridoides simples, particularmente el sustituyente en C4 (ya sea un aldehído o un éster), además del hidroxilo orientado hacia adelante en C8. Posteriormente, procedimos a estudiar las diferencias fisicoquímicas entre el confórmero de menor energía de genipósido y genipina.

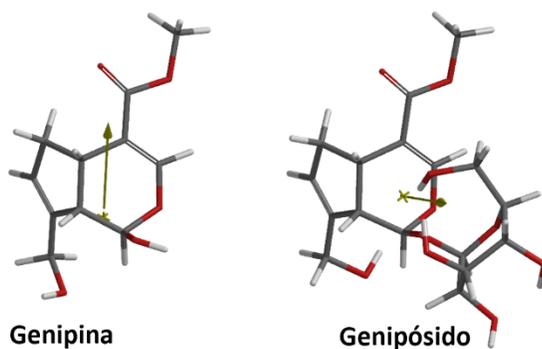
Los descriptores de la genipina y del genipósido se presentan en la Tabla 4. El genipósido no presentó actividad citotóxica contra células de cáncer cervicouterino, pero genipina sí presentó citotoxicidad contra la línea celular HeLa. Ambos iridoides difieren en el GAP, el LogP y el momento dipolar. Debido a la presencia de la glucosa en el genipósido, el tamaño y el volumen de genipina incrementaron considerablemente 132 y 136 unidades, respectivamente. También, la forma molecular es diferente entre ellos, como se puede ver por el parámetro de la ovalidad (1.36 para la genipina y 1.53 para el genipósido). La polaridad del genipósido fue 2.5 veces más alta que la de genipina, basada en la carga molecular y en el área superficial polar.

**Tabla 4.** Descriptores moleculares de genipina y genipósido.

Ligando	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	GAP (kcal)	$\rho$ (debye)	Área ( $\text{Å}^2$ )	Volumen ( $\text{Å}^3$ )	PSA ( $\text{Å}^2$ )	LogP	LogS	$\alpha$	$\beta$	# HBD	# HBA
Genipina	419	-126.18	1.26	239.61	219.74	64.589	-0.26	-1.50	57.91	1.36	2	5
Genipósido	NA	-128.37	3.41	371.47	355.38	119.843	-2.00	-1.41	68.89	1.53	5	9

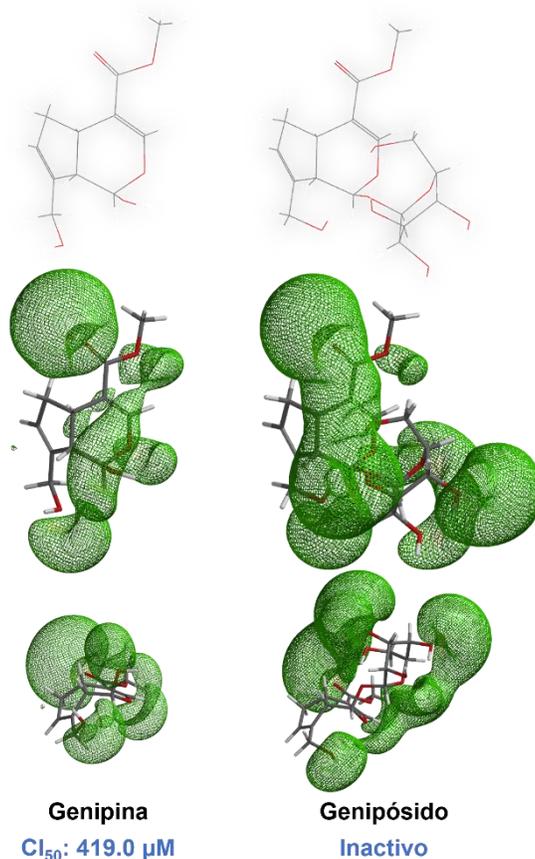
$\rho$ : Momento dipolar; GAP: Diferencia entre  $E_{\text{HOMO}}$  y  $E_{\text{LUMO}}$ ;  $\alpha$ : Polarizabilidad;  $\beta$ : Ovalidad.

Como se mencionó anteriormente, el fragmento de la glucosa en genipósido no es el responsable de la inactividad del iridoide, ya que otros iridoideos con glucosa en C1 si son activos contra HeLa. Por lo que se propuso buscar todas las diferencias en las propiedades electrónicas que la adición de la glucosa le confiere a la genipina. A continuación, las estructuras en 3D de genipina y de genipósido se muestran en la Figura 37. Se observa la dirección contraria del vector del dipolo, que en genipina es direccionada al carbonilo en C11, y en genipósido es direccionada a la unidad de glucosa, específicamente a dos grupos hidroxilo en el azúcar.



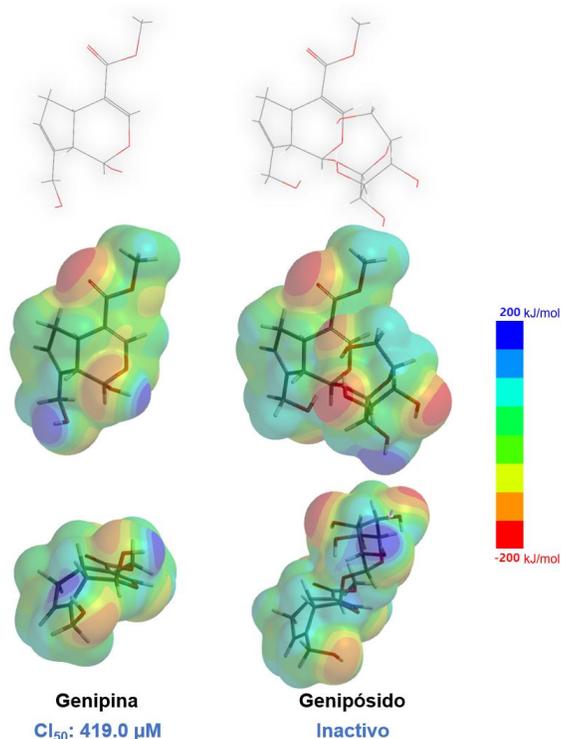
**Figura 37.** Estructuras 3D de la genipina y genipósido. El vector del dipolo está representado por una flecha dorada.

Después de analizar la orientación y la magnitud del dipolo, se obtuvo la iso-superficie del potencial molecular electrostático de  $-10$  kcal/mol, que muestra el perfil electrostático de ambos iridoideos (Figura 38). Se observa una más alta distribución electrónica en el carbonilo en C11 hasta los hidroxilos 3' y 6' del azúcar en genipósido, mientras que en genipina se presenta un patrón diferente. Las interacciones intermoleculares pueden ocurrir en estas zonas verdes.



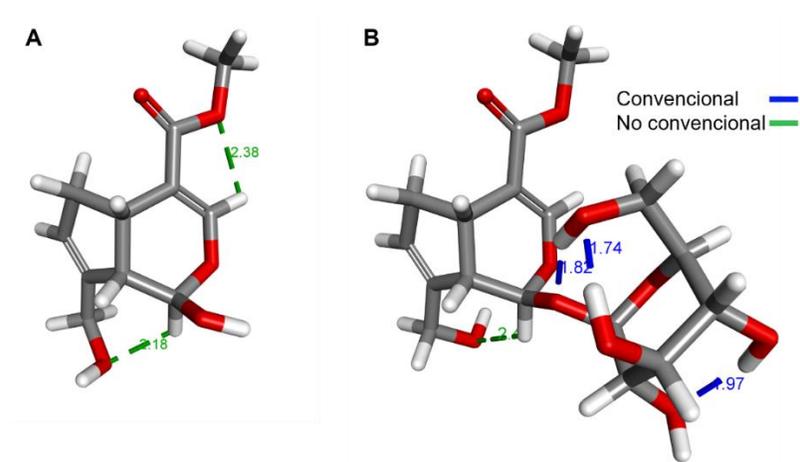
**Figura 38.** Iso-superficie del potencial electrostático molecular de -10 kcal/mol de Genipina y Genipósido. Se puede observar la representación de la iso-superficie de PEM en malla color verde.

Las regiones con más densidad electrónica de ambos iridoides se muestran en Figura 39. En el genipósido, estas regiones se ubican principalmente en el oxígeno del carbonilo en C11, el oxígeno del hidroxilo en C10, y los hidroxilos 3', 4' y 6' del azúcar. En genipina estas zonas de más alta densidad electrónica también corresponden al carbonilo en C11, el oxígeno sp<sup>3</sup> del éster en C11, el oxígeno del hidroxilo en C1, y el hidroxilo en C10. Asimismo, en este gráfico se observa diferente número y patrón de interacción, tanto en genipina como en genipósido.



**Figura 39.** Mapa del potencial electrostático de Genipina y Genipósido a una iso-densidad de  $0.002 \text{ e}/\text{\AA}^3$ .

En la Figura 40 se observan los enlaces de hidrógeno intramoleculares que se forman en la estructura de genipina y genipósido, los cuales fueron obtenidos con el software Discovery Studio (2021). En la estructura de genipina se presentan dos enlaces de hidrógeno no-convencionales, mientras que en genipósido se forma un enlace de hidrógeno no-convencional y tres convencionales. La conformación del azúcar en el genipósido provoca la formación de estos tipos de interacciones fuertes que le confieren estabilidad al iridoide.



**Figura 40.** Enlaces de hidrógeno intramoleculares en (A) Genipina y (B) Genipósido.

La falta de actividad de genipósido comparado con genipina y con los otros iridoideos glicosilados, se debe a la alta polaridad del genipósido debido a la incorporación de la glucosa en C1, y a la distribución de esta carga molecular. La suma de todos estos factores impacta en la distribución electrónica, y finalmente en la inactividad del iridoide, a diferencia de genipina. A continuación, se muestra la comparación de las diferencias fisicoquímicas entre genipósido y los iridoideos glicosilados con actividad citotóxica reportada.

En la Tabla 5 se enlistan algunos descriptores relacionados a la reactividad, solubilidad, forma y tamaño de los iridoideos glicosilados activos y de genipósido. Los iridoideos glicosilados pulchelósido I, catalpol, lamiido, espinomanósido, 5-deoxi-pulchelósido I, ácido geniposídico, y ácido 10-O-(E)-*p*-cumaroil geniposídico tienen una actividad citotóxica similar contra la línea celular HeLa (25.22–48.10  $\mu$ M). Sin embargo, comparados con el genipósido, todos ellos son diferentes en tamaño, en HBD y HBA. En cambio, el genipósido fue similar en forma, como se observa en el parámetro de ovalidad, y en la polarizabilidad, pero fue un poco diferente en la distribución de carga molecular dada por el momento dipolar, y fue menos polar comparados al resto de los iridoideos (menos hidrofílico). Las formas aniónicas del ácido geniposídico y del ácido 10-O-(E)-*p*-cumaroil geniposídico fueron consideradas desde que estas formas cargadas existen predominantemente a pH fisiológico (7.4). El valor de pKa de los ácidos se muestra en la Tabla A2.

**Tabla 5.** Descriptores moleculares de iridoideos glicosilados y genipósido probados contra la línea celular HeLa.

Ligando	Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	GAP (kcal)	$\rho$ (debye)	Área ( $\text{Å}^2$ )	Volumen ( $\text{Å}^3$ )	PSA ( $\text{Å}^2$ )	LogP	LogS	$\alpha$	$\beta$	# HBD	# HBA
Pulchelósido I	25.22	-121.84	5.95	383.69	372.30	148.544	-3.30	-0.50	70.33	1.53	7	11
Catalpol	28.20	-144.80	2.50	324.51	320.55	126.832	-3.24	-0.19	65.89	1.43	6	10
Lamiido	31.96	-116.96	7.99	392.42	373.46	158.057	-3.48	-0.69	70.47	1.56	7	11
Espinomanósido	38.89	-124.51	4.28	381.33	367.08	140.269	-2.51	-0.73	69.87	1.54	5	10
5-deoxi-pulchelósido I	42.47	-125.49	3.32	374.98	365.07	134.805	-2.51	-0.73	69.70	1.52	6	10
Ácido geniposídico*	43.60	-85.84	12.02	353.50	335.17	139.852	--	-1.22	67.68	1.51	5	10
Ácido 10-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil geniposídico*	48.10	-61.97	16.64	481.01	476.36	147.201	--	-2.86	79.38	1.63	5	11
Genipósido	NA	-128.37	3.41	371.47	355.38	119.843	-2.00	-1.32	68.89	1.53	5	9

$\rho$ : Momento dipolar; GAP: Diferencia entre E<sub>HOMO</sub> y E<sub>LUMO</sub>;  $\alpha$ : Polarizabilidad;  $\beta$ : Ovalidad. \*Estos iridoideos fueron analizados en su forma de anión.

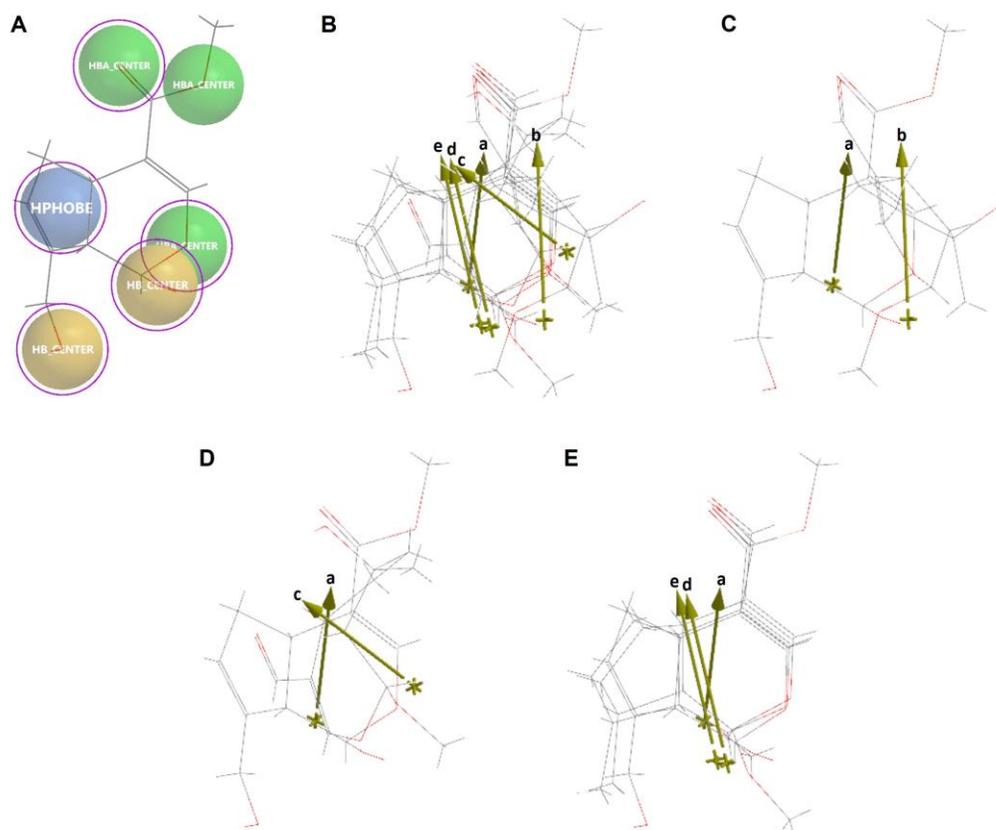
Las estructuras 3D de los iridoideos glicosilados muestran el vector del dipolo, las cuales se presentan en la Figura A2. El iridoide más similar al genipósido es el ácido geniposídico, aunque la conformación del azúcar es muy diferente comparado al genipósido. En pulchelósido I y espinomanósido, la conformación del azúcar fue más similar a la de genipósido. Es notable como la conformación de los iridoideos impactó en su tamaño y forma, como se observa en los valores de área, volumen, y ovalidad. Por ejemplo, pulchelósido I

y lamiido, aunque tienen el mismo número y tipo de sustituyentes, la conformación de la glucosa aumentó el valor del área en lamiido (Figura A2).

Con el fin de visualizar las regiones donde las interacciones intermoleculares pueden ocurrir, se obtuvo una iso-superficie de  $-10$  kcal/mol del potencial electrostático molecular (Figura A3). Se puede observar que los iridoides glicosilados más citotóxicos (Figura A3, F) tienen una mayor distribución electrostática, principalmente en la región rica en hidroxilos en el ciclopentano, los cuales son excelentes aceptores de enlaces de hidrógeno. Esta distribución electrostática está también presente en el oxígeno del carbonilo en C11 y se extiende hasta el hidroxilo en C6. En el caso del ácido geniposídico (Figura A3, A), se presenta una región y una distribución electrostática similar, principalmente debido al hidroximetil en C8. El resto de los iridoides glicosilados muestran varias regiones de densidad electrónica similares, donde las interacciones intermoleculares podrían ocurrir.

Además, con el fin de comparar la distribución del potencial electrostático de los iridoides para identificar aquellas zonas reactivas de cada molécula, donde se pueden producir reacciones nucleofílicas o electrofílicas, se obtuvo un mapa de potencial electrostático molecular de los iridoides glicosilados (Figura A4). Las regiones con mayor densidad electrónica en genipósido están ubicadas principalmente en el oxígeno del carbonilo en C11, el oxígeno del hidroxilo en C10, y los hidroxilos 3', 4' y 6' de la glucosa. Se observa un mayor número de regiones susceptibles de ataques electrofílicos y nucleofílicos en los iridoides glicosilados.

Mediante los análisis del potencial electrostático molecular representado por la iso-superficie de potencial electrostático molecular, así como del mapa de potencial electrostático (Figura 35 y 36, respectivamente), se observan las diferencias en el aspecto electrónico de los iridoides simples. Por ello se realizó el análisis de similitud molecular de los iridoides simples con genipina en base a sus descriptores de función química (CFD's). En la Figura 41 se presentan el alineamiento y el vector del dipolo de los cinco iridoides. Se seleccionaron cinco CFD's en genipina, que fueron los que se encontraron en común con los otros cuatro iridoides simples (eufrasina, campsinol, artselaenina A y artselaenina B). Los iridoides más activos, eufrasina y campsinol, no tuvieron un alineamiento adecuado con genipina (Figura 41,C,D); sus puntajes de alineamiento fueron 0.50 y 0.49, respectivamente. Por otro lado, artselaenina A y Artselaenina B, en el cual la única diferencia es la estereoquímica del grupo metoxi en C1, presentaron vectores del dipolo paralelos entre ellos, y mostraron una orientación diferente con respecto al vector del dipolo presente en genipina (Figura 41,E); sus puntajes de alineamiento fueron 0.56 y 0.50, respectivamente.



**Figura 41.** Alineamiento de genipina con iridoides simples eufrasina, campsinol, artselaenina A y artselaenina B. (A) Centros de similitud comunes por CFD's de genipina (los círculos morados representan los CFD's seleccionados para el alineamiento). (B) Alineamiento de genipina con iridoides simples. (C) Alineamiento de genipina con eufrasina. (D) Alineamiento de genipina con campsinol. (E) Alineamiento de genipina con artselaenina A y artselaenina B. Las flechas doradas representan el vector del dipolo de cada iridoide alineado (a: genipina, b: eufrasina, c: campsinol, d: artselaenina A, e: artselaenina B).

Adicionalmente, para verificar la diferencia en las estructuras químicas entre genipósido y su aglicona, genipina, realizamos un análisis de similitud molecular por alineamiento de CFD's, el cual se muestra en la Figura A5 (Ver sección 11.- Anexos). Se seleccionaron seis CFD's en genipina que fueron comunes también en genipósido; el puntaje de alineamiento fue 0.65. Aunque genipósido y genipina compartieron los CFD's seleccionados, es evidente que hay una diferencia en su orientación y en la dirección del vector del dipolo, lo cual podría explicar la falta de actividad biológica de genipósido (Figura A5).

#### 7.4 Análisis QSAR de iridoides simples

Derivado de los datos de la Tabla 3, se observó que el momento dipolar correlacionaba con la actividad biológica de los iridoides más citotóxicos, este descriptor refleja la polaridad global de una molécula (Karelson & Lobanov, 1996). Además, derivado del alineamiento por CFD's de los iridoides simples, y a la observación de que el vector del dipolo de los iridoides debía tener una dirección y magnitud, obtuvimos los componentes dimensionales del vector del dipolo de estos iridoides simples. Con el fin de determinar la relevancia de la

orientación del momento dipolar a mayor profundidad, las coordenadas cartesianas del vector del dipolo fueron transformadas a las coordenadas esféricas polares y sus valores se presentaron en la Tabla 6, donde  $\rho$  corresponde a la magnitud del momento dipolar,  $\theta$  es el ángulo en las coordenadas polares, y  $\varphi$  es el ángulo azimutal. El ángulo azimutal ( $\varphi$ ) es el ángulo que se forma entre el eje  $x$  positivo y la proyección de la línea que une el origen y el punto en cuestión sobre el plano  $xy$ . El ángulo azimutal se mide en radianes y se encuentra en el rango de 0 a  $2\pi$  (0 a 360 grados).

**Tabla 6.** Coordinadas esféricas polares y magnitud del vector del dipolo de los iridoides simples activos y sus valores de actividad biológica experimental ( $CI_{50}$ ).

<b>Ligando</b>	<b><math>\rho</math> (debye)</b>	<b><math>\theta</math></b>	<b><math>\varphi</math></b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu M</math>)</b>
Eufrasina	4.81	0.8097	1.6749	0.20
Campsinol	5.78	-1.0080	1.3527	1.90
Artselaenina B	4.67	0.9716	1.3933	12.3
Artselaenina A	4.20	-1.3515	1.1341	13.8
Genipina	1.26	1.5078	2.2265	419.0

Los valores de los ángulos  $\theta$  y  $\varphi$  están dados en radianes. Un radián equivale a  $57.296^\circ$ .

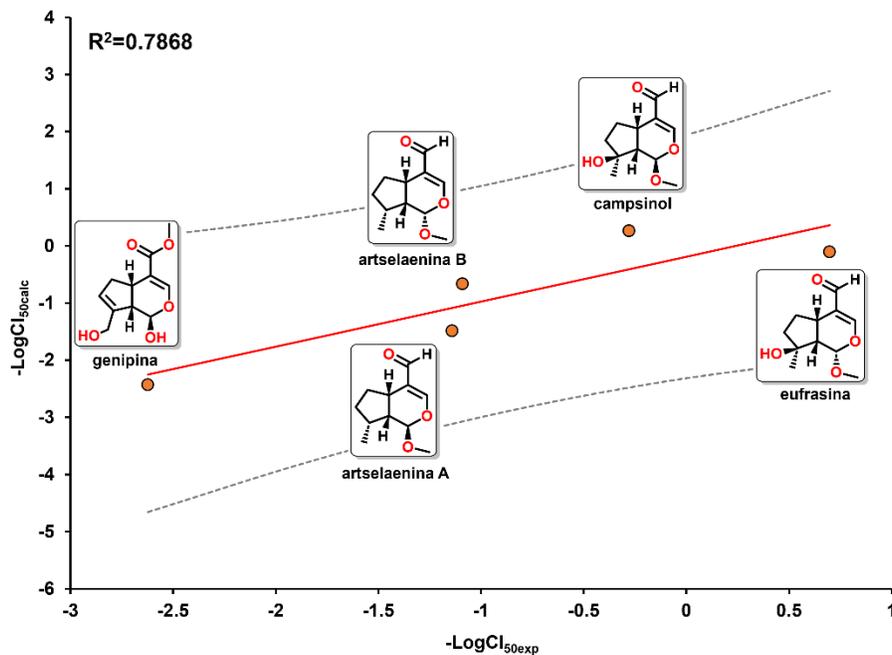
Derivado de estos datos, se realizó un análisis de regresión multilineal considerando el ángulo azimutal ( $\varphi$ ), la magnitud del momento dipolar ( $\rho$ ), y la potencia de los iridoides ( $-\text{Log } CI_{50}$ ), y se obtuvo un modelo matemático que describe la actividad biológica de los iridoides simples (Ecuación 12):

$$-\text{Log } CI_{50} = 1.5425(\varphi) + 0.8941(\rho) - 6.9922 \quad (12)$$

$$R = 0.89; R^2 = 0.79; s = 0.79; F = 3.69; n = 5$$

De acuerdo con esta ecuación y sus parámetros estadísticos, la potencia de los iridoides simples incrementará de manera proporcional a la magnitud del momento dipolar y el ángulo azimutal  $\varphi$ , ya que ambos, al tener coeficiente positivo, contribuyen de manera positiva a la actividad citotóxica.

Posteriormente, se graficó la correlación lineal entre la actividad calculada y la actividad experimental, lo cual se muestra en la Figura 42. La correlación cuadrada ( $R^2$ ) explica la varianza de la descripción del modelo. La gráfica de la Figura 42 muestra el modelo matemático que tiene una capacidad descriptiva aceptable, considerando el número limitado de los compuestos empleados para el modelo.



**Figura 42.** Correlación lineal de la actividad calculada ( $\text{Cl}_{50\text{calc}}$ ) contra la actividad experimental ( $\text{Cl}_{50\text{exp}}$ ). La línea roja indica el promedio y las líneas grises discontinuas indican los extremos.

Derivado de este análisis, se observó que el momento dipolar, al tener el valor del coeficiente más alto, fue crucial para la actividad de los iridoides; sin embargo, el modelo fue sólo descriptivo y no predictivo para otros iridoides (ya que su valor de  $Q_2$  para la predicción fue menor a 0.5). Por esta razón, se consideraron los 13 iridoides para realizar un estudio QSAR usando descriptores moleculares relacionados a la naturaleza electrónica de los compuestos. Los modelos QSAR de un conjunto pequeño de moléculas han sido empleados exitosamente para ayudar a explicar su actividad biológica.

Existen algunos estudios de la relevancia de la orientación del momento dipolar en la actividad de algunos compuestos para tratar las úlceras (Patrick, 2023). Esto puede deberse a la interacción del dipolo del compuesto con un dipolo de la superficie del receptor, de tal manera que los momentos dipolares se alinean. Esto orienta al fármaco de una forma en particular antes de que se formen los enlaces de hidrógeno. En este estudio también se llevaron a cabo estudios QSAR para determinar el ángulo  $\varphi$  óptimo para la actividad biológica de los compuestos. También se ha reportado que relaciones cuantitativas de la magnitud del momento dipolar y la lipofilidad explican las diferencias en la actividad de antagonistas del receptor de histamina  $\text{H}_2$ , ya que son relevantes para el alineamiento del fragmento de enlace de hidrógeno en el antagonista con respecto al receptor (Young *et al.*, 1986).

## 7.5 Análisis QSAR de iridoides simples y glicosilados

El modelo QSAR indica una vez más la influencia del momento dipolar en la actividad de los iridoides, como se muestra en la Ecuación (13). Además, la diferencia del área polar superficial de los iridoides con respecto a genipina ( $\Delta PSA$ ), la solubilidad de los iridoides en agua ( $\text{LogS}$ ), y el cuadrado de la diferencia en la polarizabilidad de los iridoides con respecto a genipina ( $\Delta \text{Polarizabilidad}^2$ ) son relevantes para la actividad biológica.

$$-\text{Log } CI_{50} = 0.1118(\rho) - 0.07433(\Delta PSA) + 2.56022(\text{LogS}) + 0.02923(\Delta \text{Polarizabilidad}^2) + 1.26184 \quad (13)$$

$$R = 93.781; R^2 = 87.95; R_{ADJ}^2 = 81.07; s = 0.3563 F = 12.78; n = 13$$

$$R^P = 0.622; R^N = -0.208; Q_{LOO}^2 = 62.33$$

Los valores de los descriptores moleculares considerados en el modelo de QSAR, junto con todos los valores experimentales de la actividad citotóxica contra la línea celular HeLa ( $CI_{50}$ ) se enlistan en la Tabla 7. De la Tabla 7, se puede observar que los iridoides más potentes en cuanto a los iridoides simples, tienen un valor de PSA más bajo que genipina, ya que su diferencia ( $\Delta PSA$ ) es negativa. Esto concuerda con nuestra ecuación QSAR ya que el coeficiente negativo indica que al incrementar el valor de PSA de los iridoides comparado con genipina, afectará negativamente su actividad citotóxica contra la línea celular HeLa. Por el contrario, un incremento en la solubilidad o la polarizabilidad de los iridoides favorecerá la actividad citotóxica de los iridoides de acuerdo con el signo positivo de su coeficiente. Los valores de polarizabilidad se relacionan a la hidrofobicidad de las moléculas (Karelson & Lobanov, 1996).

Estos descriptores pueden trabajar como contrapesos del otro, especialmente  $\Delta PSA$  y  $\text{LogS}$ . Cabe mencionar que todos los iridoides usados para la construcción del modelo QSAR tienen un valor negativo de  $\text{LogS}$ , lo que refleja su naturaleza hidrofóbica. Esta característica afecta las contribuciones positivas del momento dipolar y de  $\Delta \text{Polarizabilidad}^2$ , que son descriptores relacionados a la distribución de la densidad de electrones sobre la estructura del iridoide. Los iridoides glicosilados tienen valores más altos de momento dipolar,  $\Delta PSA$  y  $\Delta \text{Polarizabilidad}^2$ . Aunque algunos de ellos tienen un valor de  $\text{LogS}$  menor que genipina, y esto puede relacionarse a su unidad de glucosa y a su habilidad de formar enlaces de hidrógeno intramolecular, haciendo que los iridoides glicosilados sean más hidrofóbicos.

**Tabla 7.** Valores de los descriptores moleculares presentes en el modelo QSAR y la actividad biológica (CI<sub>50</sub>) de iridoides simples y glicosilados.

Ligando	$\rho$ (debye)	$\Delta$ PSA (Å <sup>2</sup> )	LogS	$\Delta$ Polarizabilidad <sup>2</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)
Eufrasina	4.81	-19.944	-1.21	0.048	0.20
Campsinol	5.78	-17.667	-1.21	0.048	1.90
ArtselaeninaB	4.67	-37.781	-2.23	0.810	12.30
ArtselaeninaA	4.20	-37.353	-2.23	0.640	13.80
Pulchelósido I	5.95	83.955	-0.50	154.256	25.22
Catalpol	2.50	62.243	-0.19	63.680	28.20
Lamiido	7.99	93.468	-0.69	157.754	31.96
Espinomanósido	4.28	75.680	-0.73	143.042	38.89
5-deoxipulchelósido I	3.32	70.216	-0.73	139.004	42.47
Ácido geniposídico <sup>1</sup>	12.02	75.260	-1.22	95.453	43.60
Ácido 10-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil geniposídico <sup>1</sup>	16.64	82.610	-2.86	460.961	48.10
Genipina	1.26	0	-1.50	0	419.00

<sup>1</sup>Estos iridoides se analizaron en su forma de anión.

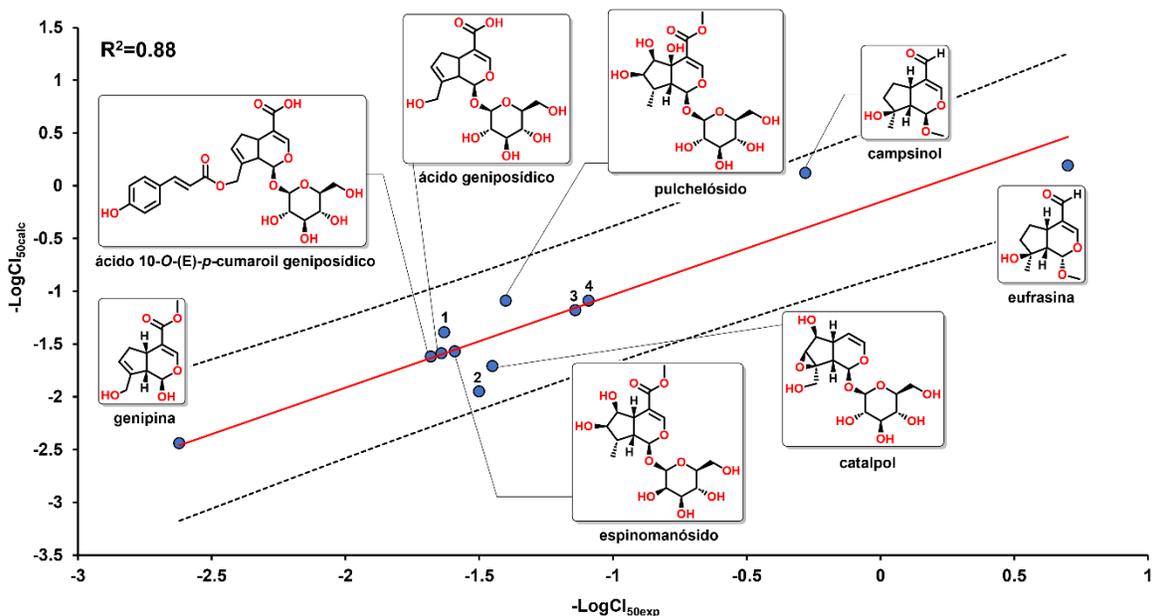
Todas las actividades biológicas experimentales (-LogCI<sub>50exp</sub> se representa como Y<sub>exp</sub>), las actividades calculada y predicha (-LogCI<sub>50calc</sub> se representa como Y<sub>calc</sub> y -LogCI<sub>50pred</sub> se representa como Y<sub>pred</sub>) mediante el modelo QSAR, y los valores de apalancamiento (Hat) de iridoides se presentan en la Tabla 8. También los valores de error del cálculo y de la predicción que establecen las diferencias entre Y<sub>exp</sub>, y tanto Y<sub>calc</sub> y Y<sub>pred</sub>, se presentan mediante los términos residual<sub>calc</sub> y residual<sub>pred</sub>, respectivamente.

**Tabla 8.** Valores de las actividades experimental citotóxica  $Y_{exp}$ , calculada  $Y_{calc}$ , y predicha  $Y_{pred}$ , y los valores  $residual_{calc}$  y  $residual_{pred}$ .

Ligando	$Y_{exp}$	$Y_{calc}$	$Y_{pred}$	Hat	$residual_{calc}$	$residual_{pred}$
Eufrasina	0.70	0.19	-0.24	0.451	-0.51	-0.93
Campsinol	-0.28	0.12	0.40	0.403	0.40	0.68
Artselaenina B	-1.09	-1.09	-1.10	0.389	0	-0.01
Artselaenina A	-1.14	-1.18	-1.21	0.377	-0.04	-0.07
Pulchelósido I	-1.40	-1.09	-0.95	0.305	0.32	0.46
Catalpol	-1.45	-1.71	-2.00	0.524	-0.26	-0.55
Lamiido	-1.50	-1.95	-2.25	0.407	-0.44	-0.75
Espinomanósido	-1.59	-1.57	-1.57	0.231	0.02	0.02
5-deoxipulchelósido I	-1.63	-1.39	-1.32	0.244	0.24	0.31
Ácido geniposídico <sup>1</sup>	-1.64	-1.59	-1.56	0.387	0.05	0.08
Ácido 10-O-(E)- <i>p</i> -cumaroil geniposídico <sup>1</sup>	-1.68	-1.62	-1.51	0.656	0.06	0.17
Genipina	-2.62	-2.44	-2.13	0.627	0.18	0.49

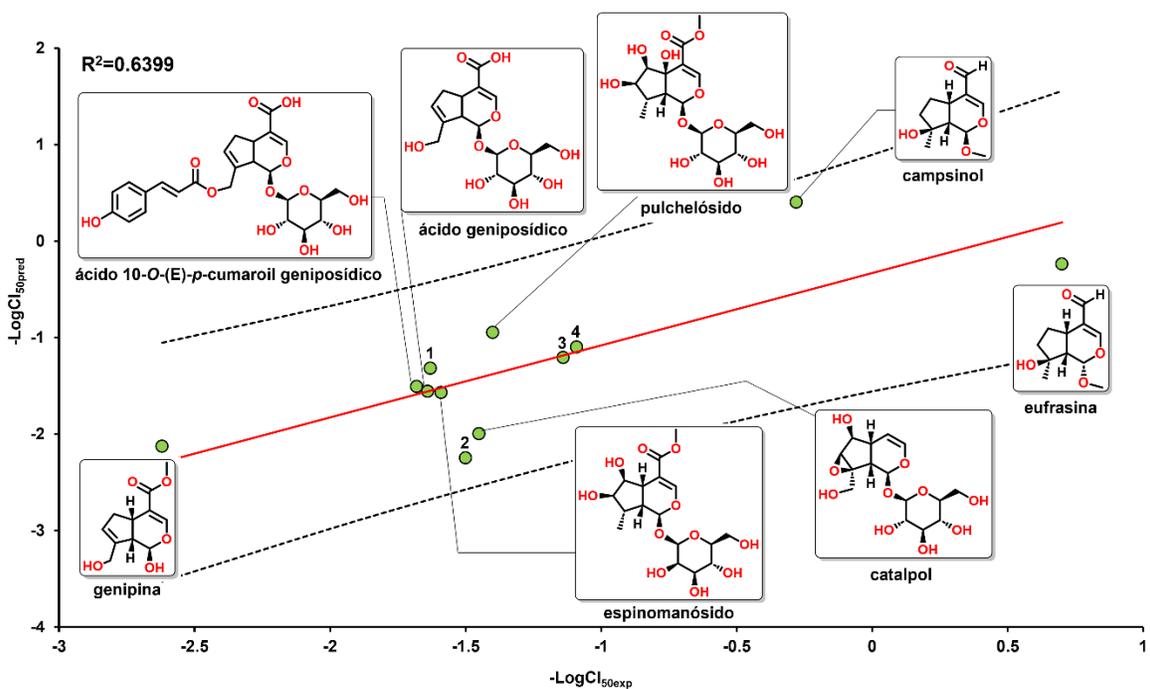
<sup>1</sup>Estos iridoides se analizaron en su forma de anión.

La Figura 43 muestra la capacidad descriptiva del modelo QSAR, en la cual los compuestos que se encuentran más alejados del promedio son campsinol y lamiido. En esta correlación se puede observar que los iridoides simples se encuentran principalmente en el extremo derecho, esto debido a que son las moléculas más potentes. En el extremo izquierdo se encuentra genipina que, a pesar de ser un iridoide simple, fue el compuesto menos potente; en la parte central se encuentran los iridoides glicosilados que son las moléculas con potencia intermedia (25.22-48.10  $\mu$ M).



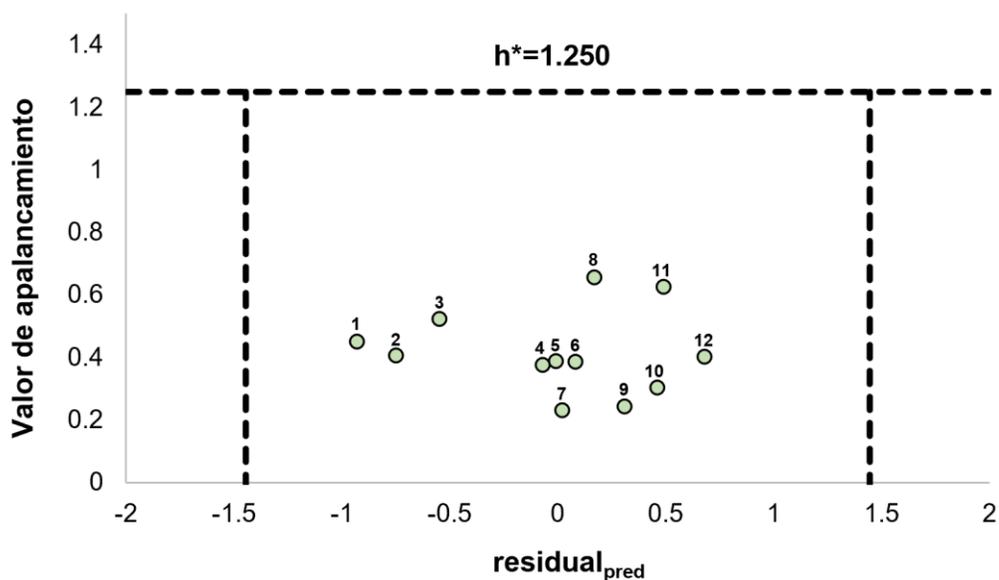
**Figura 43.** Correlación lineal de la actividad calculada ( $Y_{\text{calc}}$ ) contra la actividad experimental ( $Y_{\text{exp}}$ ). La línea roja indica el promedio y las líneas grises discontinuas indican los extremos. 1: 5-deoxi-pulchelósido, 2: lamiido, 3: artselaenina A, 4: artselaenina B.

La Figura 44 muestra la capacidad predictiva del modelo QSAR, de acuerdo con el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) que corresponde al valor de la varianza explicada en la descripción y en la predicción ( $Q^2$ ). El modelo QSAR tiene una habilidad aceptable para predecir la actividad biológica.



**Figura 44.** Correlación lineal de la actividad predicha ( $Y_{\text{pred}}$ ) contra la actividad experimental ( $Y_{\text{exp}}$ ). La línea roja indica el promedio y las líneas grises discontinuas indican los extremos. 1: 5-deoxi-pulchelósido, 2: lamiido, 3: artselaenina A, 4: artselaenina B.

El gráfico de William, con base en la predicción de residuales y de los valores de apalancamiento, se usó para definir el dominio de aplicabilidad del modelo (Figura 45). Los “outliers” de respuesta ( $\text{residual}_{\text{pred}} > 3\text{SDEP}$ ) y estructurales ( $h > h^*$ ) se pueden observar fuera del área limitada por las tres líneas discontinuas. Estas líneas representan el apalancamiento de advertencia ( $h^*$ , línea discontinua horizontal), y tres veces la desviación estándar en el error de la predicción ( $3 \times \text{SDEP}$ , líneas verticales discontinuas). Todos los iridoides estuvieron dentro del dominio de aplicabilidad del modelo, sugiriendo que la aplicación del modelo para predecir la actividad citotóxica de nuevos iridoides con alta similitud molecular y estructural.



**Figura 45.** El gráfico de William de los residuales de predicción contra los valores de apalancamiento de iridoideas. La línea horizontal discontinua muestra el apalancamiento de advertencia ( $h^* = 3 p/n$ ,  $n$  es el número de iridoideas, y  $p$  es el número de descriptores en el modelo más uno), y las dos líneas verticales discontinuas indican los límites dentro de los cuales todos los residuales caen ( $3xSDEP = 1.444$ ). **1:** Eufrasina, **2:** Lamiido, **3:** Catalpol, **4:** Artselaenina A, **5:** Artselaenina B, **6:** Ácido geniposídico, **7:** Espinomanósido, **8:** Ácido 10-O-p-cumaroil geniposídico, **9:** 5-deoxi-pulchelósido, **10:** Pulchelósido I, **11:** Genipina, **12:** Campsinol.

De la Figura 45, se puede observar que la molécula más potente, que es eufrasina (1) se encuentra en el extremo izquierdo, con el valor más negativo de error de la predicción; su enantiómero campsinol (12) se encuentra en el extremo contrario, con el valor más positivo de error de la predicción. Los iridoideas simples artselaenina A y B (4 y 5, respectivamente) se encuentran en la parte central, con los valores de error de la predicción más bajos. Con base en estos hallazgos, y la baja potencia de genipina, se procedió a realizar el diseño de iridoideas con base en la estructura de genipina e incorporando las características estructurales más relevantes de los iridoideas simples como artselaenina A y B.

## 7.6. Diseño de fármacos basado en el ligando de derivados de genipina

Después de haber realizado el análisis del SAR, los análisis de similitud molecular y haber generado un modelo matemático QSAR con capacidad de predecir la actividad biológica de iridoides, se realizó el diseño de iridoides con base en las características estructurales principales de genipina. Debido a su baja potencia, genipina fue considerada como un compuesto líder para el desarrollo de compuestos anticancerígenos. Se propusieron 86 iridoides derivados de la estructura de genipina, con la incorporación de las características estructurales más relevantes derivadas del análisis del SAR, los cuales fueron principalmente: cambio de sustituyentes en C4, ausencia del doble enlace C7-C8, y cambio de sustituyente en C8, así como el efecto de la estereoquímica del sustituyente en C8.

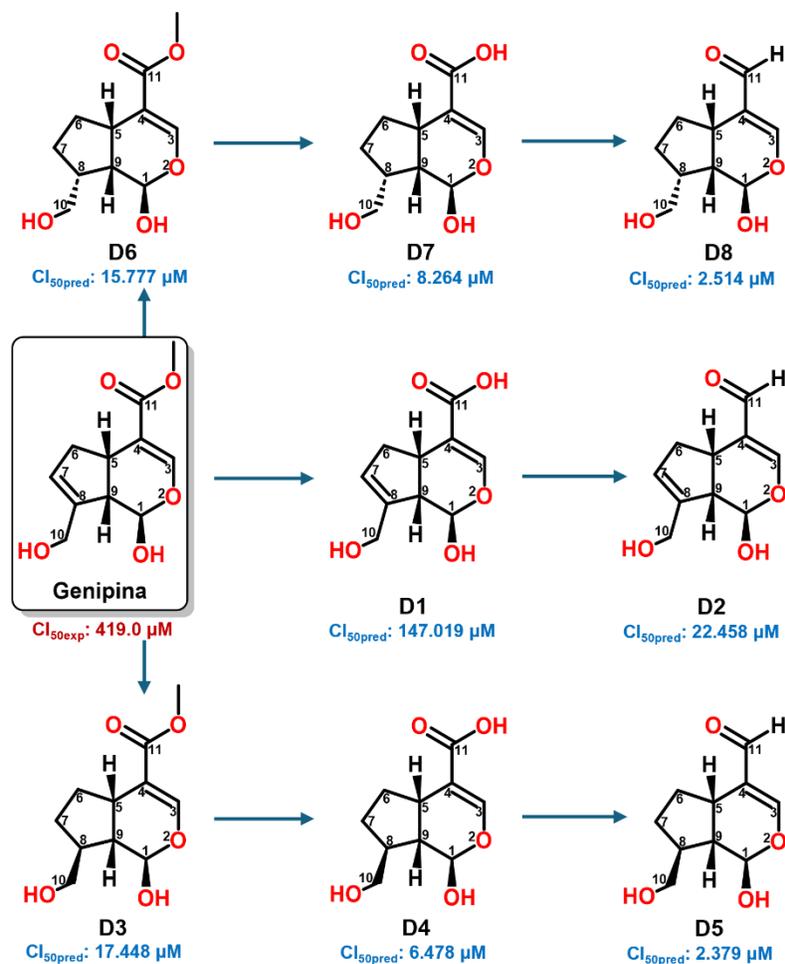


Figura 46. Primera estrategia en el diseño de derivados de genipina.

Como primera estrategia (Figura 46) y partiendo de genipina, se decidió cambiar el sustituyente en C4, como se observó su efecto en iridoides simples y glicosilados en un aumento de la actividad biológica, siguiendo este orden: éster (genipina) → ácido

carboxílico (**D1**) → aldehído (**D2**). Posteriormente, se decidió evaluar el efecto de la ausencia del doble enlace presente en genipina en C7-C8, ya que se observó que en las estructuras 3D de los iridoides simples más citotóxicos comparados con genipina, estos primeros se deformaba la estructura del biciclo, al hacerse menos rígida (Figura 34). Al determinar el efecto de la ausencia del doble enlace, se evaluó también el efecto de la estereoquímica del hidroximetilo de C8, proponiendo una serie con el hidroximetilo hacia adelante (**D3-D5**) y hacia atrás (**D6-D8**), ya que se había observado que los enantiómeros eufrasina y campsinol diferían en su actividad biológica en un orden de magnitud de diez veces ( $CI_{50exp}$ : 0.2 y 1.9  $\mu$ M, respectivamente).

Junto con la ausencia del doble enlace, se decidió determinar el efecto del cambio del sustituyente en C4 (éster, ácido carboxílico o aldehído) en los descriptores moleculares y, por tanto, en la actividad biológica predicha. De este conjunto de iridoides diseñados los que tuvieron una actividad biológica predicha, de acuerdo con sus descriptores moleculares y al modelo QSAR, menor al iridoide más citotóxico contra HeLa que es eufrasina ( $CI_{50exp}$ : 0.2  $\mu$ M) fueron D5 y D8. Este iridoide carece del doble enlace en C7-C8 y tiene un ácido carboxílico en C4.

En la segunda estrategia (Figura 47), se decidió conservar el sustituyente aldehído en C4, e incorporar átomos más electronegativos que el oxígeno, como flúor y cloro, con la finalidad de que, al atraer la densidad electrónica de la molécula, se provocara una alteración del momento dipolar del iridoide. En esta estrategia también se consideró evaluar el efecto de la ausencia del doble enlace y, por tanto, la estereoquímica del hidroximetilo en C8 en cada serie. Se realizó la incorporación de flúor en C3 (**D9-D11**) y C10 (**D12-D15**), y la incorporación del cloro fue en C10 (**D16-D18**). De este conjunto de nueve iridoides diseñados, todos presentaron una mejor actividad predicha que genipina; sin embargo, el que presentó actividad biológica predicha similar a la actividad reportada de eufrasina fue D14, el cual se señala en amarillo.

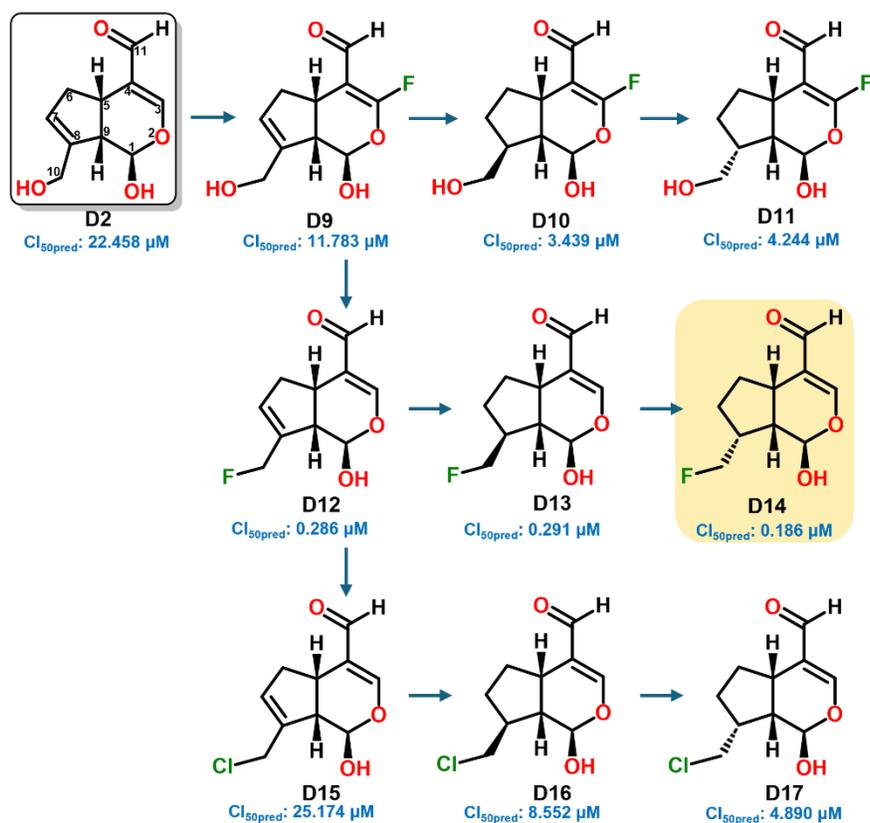


Figura 47. Segunda estrategia en el diseño de derivados de genipina.

La tercera estrategia consistió en evaluar el efecto del cambio del sustituyente en C4 por una amida (Figura 48), del tipo primaria (**D18-D22**) y del tipo secundaria (**D23-D40**), ya que las amidas son aceptores de enlaces de hidrógeno, que pueden formar enlaces de hidrógeno moderadamente fuertes (Patrick *et al.*, 2023). Dentro de las amidas secundarias también se incorporaron sustituyentes con flúor (D25-D27 y D34-D36). El iridoide con mejor actividad predicha fue D22, el cual carece de sustituyente en el ciclopentano; sin embargo, su actividad es menor que la reportada para el iridoide más citotóxico en la literatura.

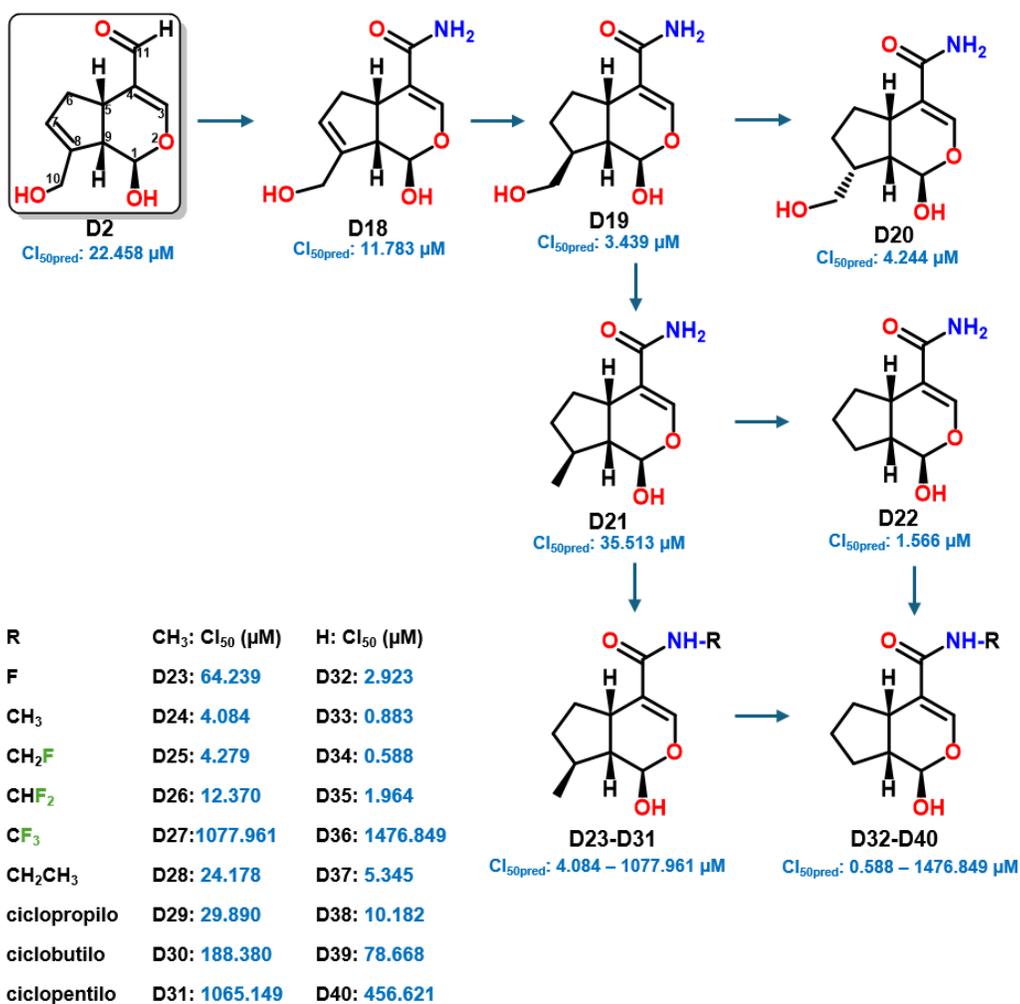


Figura 48. Tercera estrategia en el diseño de derivados de genipina.

La cuarta estrategia consistió en evaluar el efecto del cambio del sustituyente en C4 por una cetona (Figura 49), del tipo primaria (D41-D45) y del tipo secundaria (D46-D63). En este último subconjunto de cetonas secundarias, se incorporó también flúor (D48-D50 y D57-D59), con el propósito de afectar el momento dipolar del iridoide.

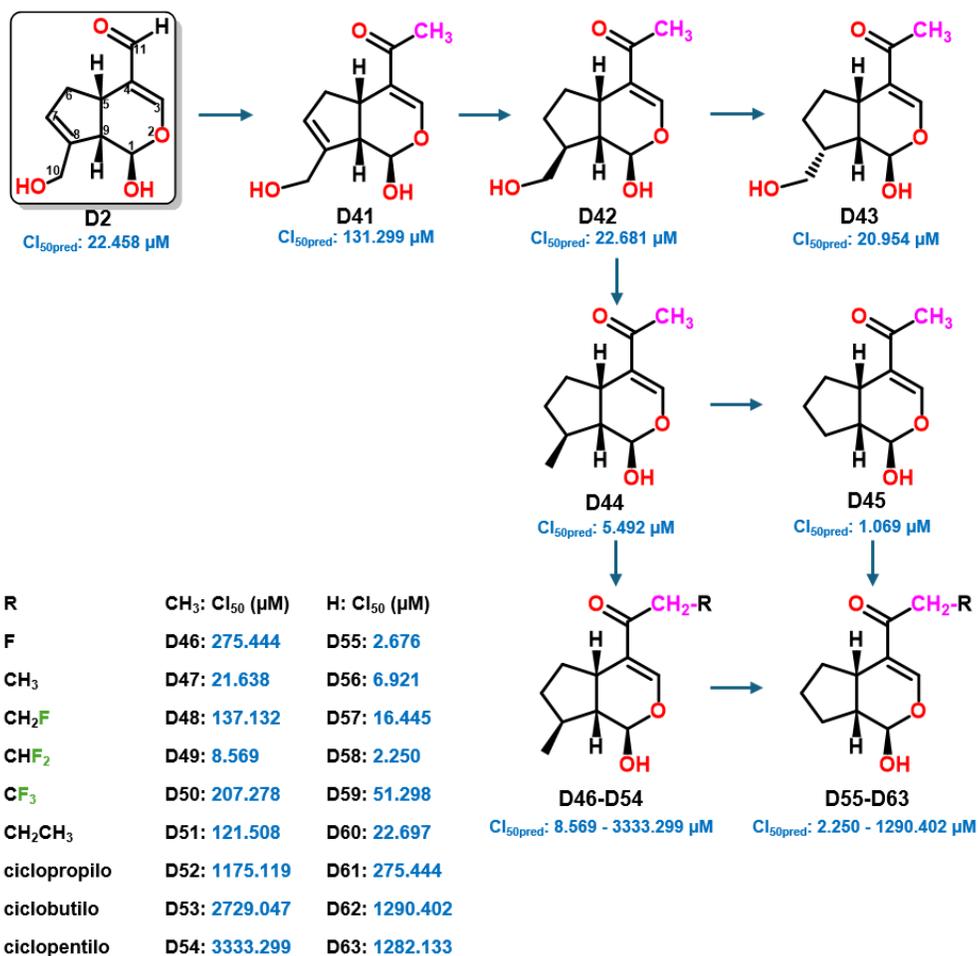


Figura 49. Cuarta etapa en el diseño de derivados de genipina.

La siguiente estrategia consistió en incorporar ciclos de tres, cuatro y cinco carbonos unidos al carbonilo; sin embargo, el derivado iridoide más activo fue D67 con  $Cl_{50pred}$ : 21.944 μM, y el resto fueron menos activos (Figura 50).

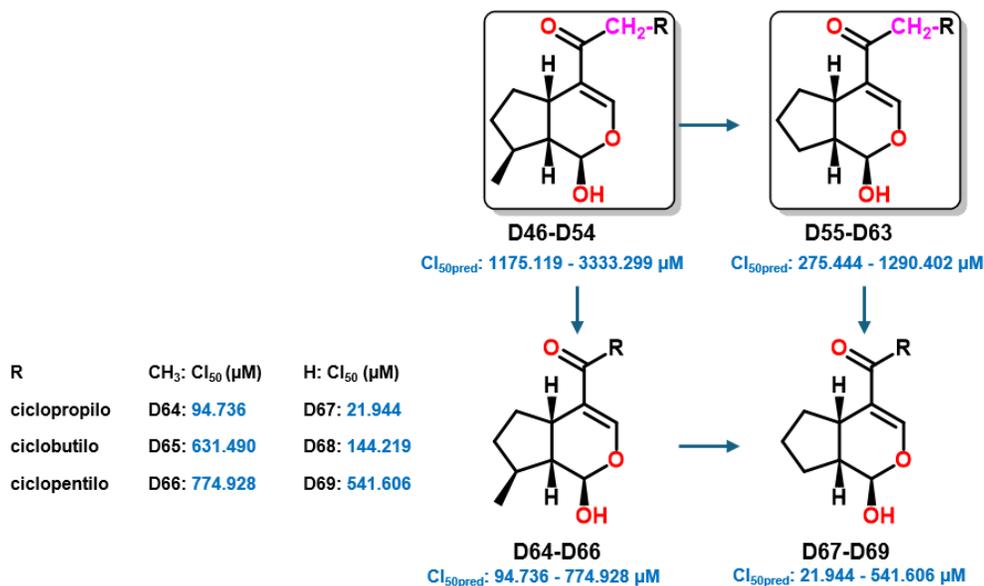


Figura 50. Quinta etapa en el diseño de derivados de genipina.

Para la sexta estrategia se propusieron agliconas de iridoides glicosilados reportados en la literatura (Figura 51, **D70-D72**), los cuales han mostrado actividad inhibitoria contra la DNA polimerasa (Pungitore *et al.*, 2012). Estas agliconas se caracterizan por poseer un hidroxilo en C6, y un hidroxilo o un hidroximetilo en C8. En el caso de la aglicona de harpágido (D71), ésta posee además un metilo en C8, y la aglicona de catalpol posee un grupo epoxi en C7-C8 (D70). Únicamente la aglicona de aucubina si presenta el doble enlace en C7-C8 (D72). Todos estos iridoides carecen de algún grupo funcional en C4, y todos mostraron tener mayor actividad predicha que los mejores iridoides diseñados de las estrategias anteriormente mencionadas, su Cl<sub>50pred</sub> se encontró en un intervalo entre 0.012 y 0.030 μM.

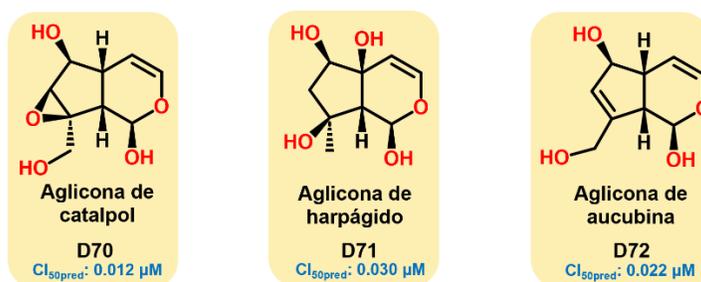


Figura 51. Sexta etapa en el diseño de derivados de genipina.

La séptima estrategia se basó en iridoides simples reportados en la literatura (Figura 52), los cuales se encuentran presentes en rutas biosintéticas de iridoides (Brown *et al.*, 2015; Nagatoshi *et al.*, 2011), tales como la 7-deoxi-loganetina que tiene un éster en C4 (**D73**), el ácido 7-deoxiloganético que se caracteriza por poseer un ácido carboxílico en C4 (**D74**), el iridotrial que tiene un aldehído como sustituyente en C4 (**D75**), y el 7-deoxiloganetol que

posee un hidroximetilo en C4 (**D76**). También se incluyó el derivado **D77** que posee un hidroxilo en C8. Todos los iridoides de este grupo tienen el sustituyente de C8 con estereoquímica hacia adelante. De este conjunto de derivados D74 y D77 tuvieron una mayor actividad predicha ( $Cl_{50pred}$ : 0.013 y 0.011  $\mu$ M, respectivamente) que la actividad reportada de eufrasina.

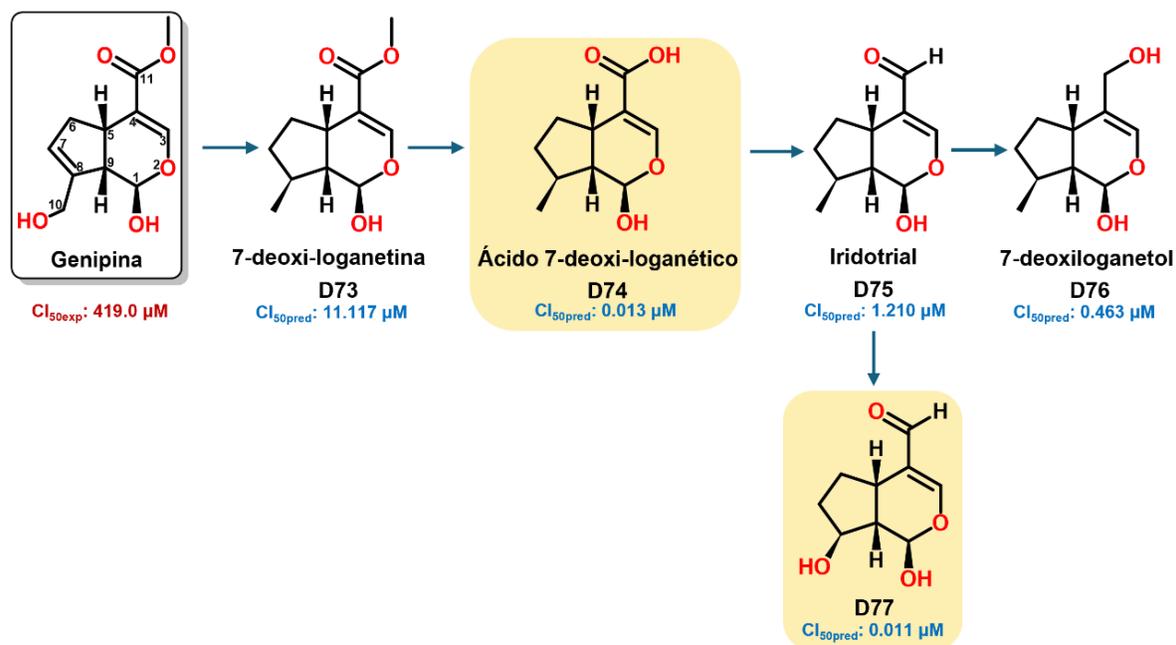


Figura 52. Séptima etapa en el diseño de derivados de genipina.

La octava estrategia consistió en evaluar el efecto del cambio del sustituyente en C4, partiendo del iridoide 7-deoxi-loganetina (D73): éster (**D78**), ácido carboxílico (**D79**), aldehído (**D80**) e hidroximetilo (**D81**) junto con el efecto de la ausencia de sustituyentes en el ciclopentano del biciclo del iridoide (Figura 53). Los iridoides D79, D80 y D81 fueron los que tuvieron la mayor actividad predicha que estuvieron en un intervalo de  $Cl_{50pred}$  entre 0.003 y 0.054  $\mu$ M.

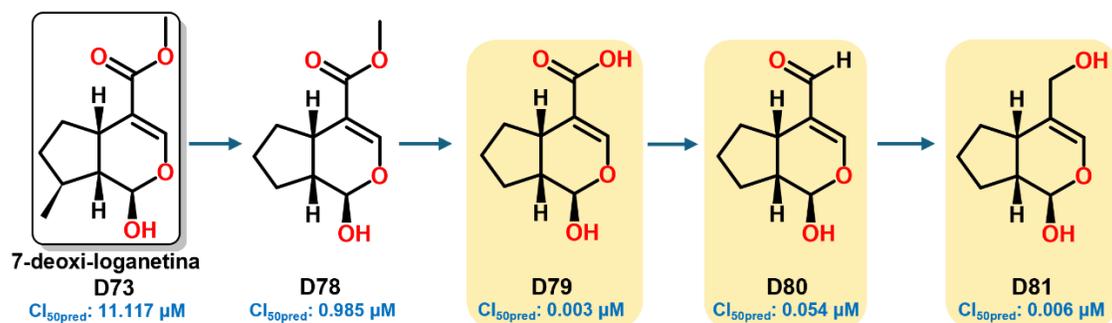


Figura 53. Octava estrategia en el diseño de derivados de genipina.

La última estrategia (Figura 54) se basó en la incorporación de un hidroxilo extra en C6, que derivaron de uno de los iridoides propuestos en la primera etapa y que resultaron con la mejor actividad predicha de tal estrategia, caracterizados por poseer un aldehído en C4 (D5). El primer iridoide de este conjunto es **D82**; posteriormente, se realizó el cambio del hidroximetilo en C8 por un metilo (**D83**), y también se propuso el derivado **D84** que se caracteriza por no poseer ningún sustituyente en C4. Finalmente se propusieron derivados de D82 y D83 que en vez del aldehído en C4 presentaran un hidroximetilo en esta posición (**D85** y **D86**). De este conjunto de iridoides D84 y D86 tuvieron una mayor actividad predicha ( $Cl_{50pred}$ : 0.001 y 0.103  $\mu$ M, respectivamente).

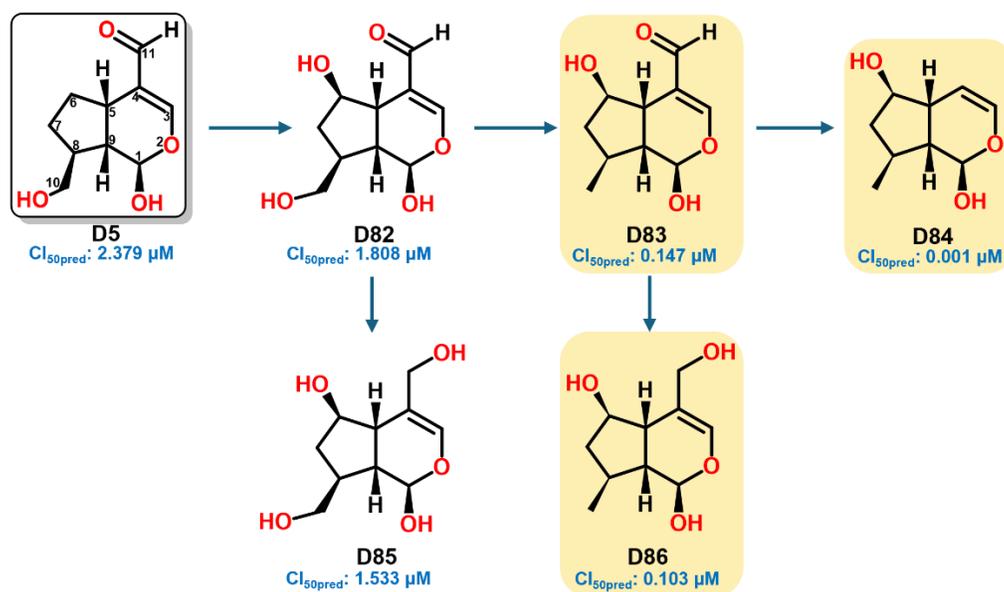
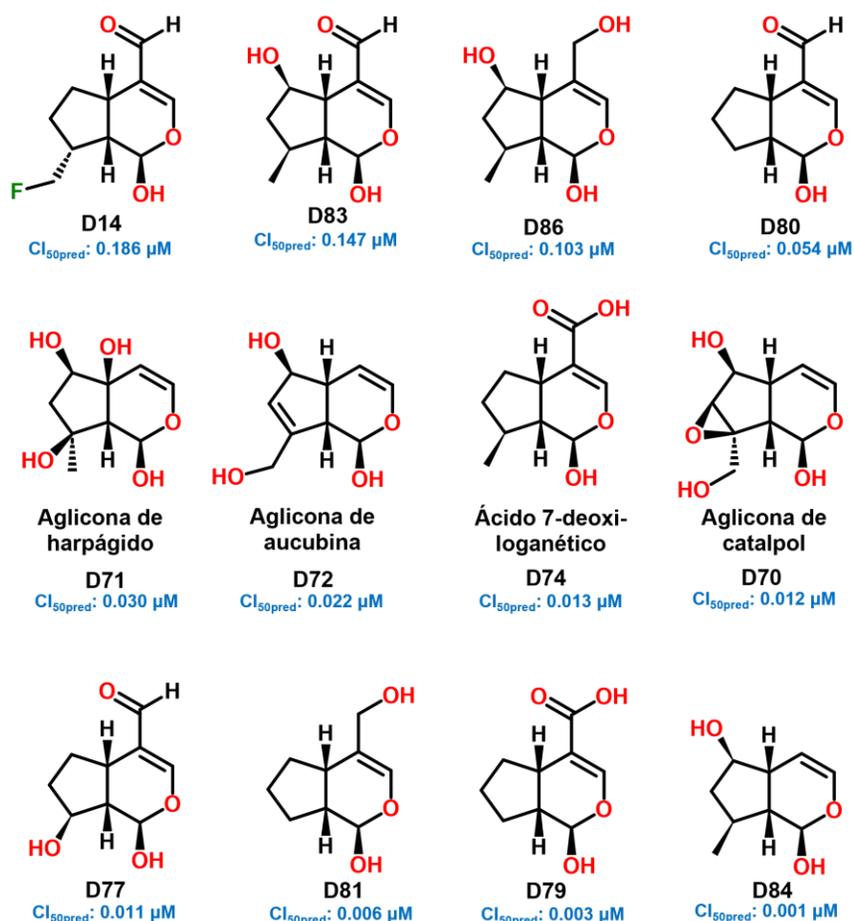


Figura 54. Novena etapa en el diseño de derivados de genipina.

En todos estos iridoides propuestos se decidió conservar el hidroxilo en C1 presente en genipina en estos iridoides propuestos, debido a su papel fundamental para la actividad citotóxica de los derivados de genipina, como fue reportado por Yang *et al.*, (2016), los cuales fueron probados en una línea celular de cáncer de páncreas (Panc-1).

Los descriptores moleculares de todos los 86 iridoides diseñados fueron calculados y se presentan en la Tabla A4 (Ver sección 11.- Anexos). Se aplicó el modelo QSAR para los iridoides diseñados con estos valores y se predijo la actividad biológica ( $Cl_{50pred}$ ) para todos los compuestos. Los resultados para los mejores candidatos se presentan en la Tabla 9. Finalmente, los mejores resultados en orden decreciente de su  $Cl_{50pred}$  fueron: 0.186, 0.147, 0.103, 0.054, 0.030, 0.022, 0.013, 0.012, 0.011, 0.006, 0.003 y 0.001  $\mu$ M para D14, D83, D86, D80, D71, D72, D74, D70, D77, D81, D79 y D84, respectivamente.

Después de aplicar el modelo QSAR de la ecuación (2), un conjunto de 12 iridoides tuvo una actividad biológica predicha más alta que la actividad experimental de eufrasina (Figura 55), esto es, su  $CI_{50pred}$  fue menor a  $0.2 \mu M$ . La mayoría de estos iridoides diseñados tuvieron un aldehído o un hidroximetilo en C4, pero cuatro de ellos carecieron de un sustituyente en esta posición. Sólo uno de ellos tuvo un ácido en esta posición C4: el iridoide D10. Todos los iridoides conservaron el hidroxilo en C1, y otros se caracterizaron por presentar un metilo o un hidroxilo en C8, o ambos, y un hidroxilo en C6. Sólo dos iridoides, D70 y D72, presentaron un hidroximetilo en C8, así como genipina, pero D60 tuvo un grupo epoxi entre C7 y C8. El iridoide D72 fue el único con un doble enlace en C7-C8, así como genipina.



**Figura 55.** Estructuras químicas de los mejores iridoides diseñados con base en genipina.

En la Tabla 9 se presentan los descriptores de estos 12 iridoides diseñados. Aquellos con un aldehído en C4 (D77, D80 y D83) tuvieron un GAP similar al de genipina; aquellos con un ácido o un hidroximetilo, o ningún sustituyente en C4, tuvieron un GAP menos negativo. D79, D80 y D83 tuvieron los valores más altos del momento dipolar, pero D72 y D81 tuvieron valores menores al momento dipolar que genipina (ver Tabla 3). D79 y D80 fueron

menores en área y volumen que los iridoides más citotóxicos. D70, D71 y D72 fueron más polares que genipina, y el resto de los iridoides fueron compuestos menos polares comparados a genipina, con valores de PSA en el rango de 42–61 Å<sup>2</sup>. Todos los iridoides propuestos tuvieron una afinidad mayor hacia el agua, excepto D81 y D84, el cual presentó una mayor afinidad a una fase lipídica, tal como artselaenina A y artselaenina B. Casi todos los compuestos fueron moléculas menos polarizables que genipina y los otros iridoides simples presentados en la Tabla 3. Estos iridoides tuvieron un número variable de donadores y aceptores de hidrógeno, que van desde 1 hasta 4, y desde 3 hasta 5, respectivamente.

**Tabla 9.** Descriptores moleculares de los mejores iridoides diseñados.

Ligando	CI <sub>50pred</sub> (μM)	GAP (kcal)	ρ (debye)	Área (Å <sup>2</sup> )	Volumen (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	LogP	LogS	α	β	# HBD	# HBA
D14	0.186	-122.68	4.37	211.90	193.67	41.090	0.32	-1.13	55.83	1.31	1	3
D70	0.012	-144.58	2.30	201.54	184.95	73.770	-1.50	0.32	54.89	1.28	3	5
D71	0.030	-145.63	3.19	207.72	190.41	80.817	-1.25	0.36	55.33	1.30	4	5
D72	0.022	-135.25	0.86	196.11	178.97	61.665	-0.79	-0.10	54.50	1.28	3	4
D74	0.013	-89.18	11.93	211.04	193.89	55.479	--	-0.58	56.19	1.30	1	4
D77	0.011	-123.99	3.36	197.34	178.62	60.872	-0.67	-0.11	54.59	1.29	2	4
D79	0.003	-599.13	12.32	190.51	175.42	54.222	--	-0.50	54.14	1.26	1	4
D80	0.054	-123.61	4.80	187.58	170.55	42.052	0.42	-1.04	53.94	1.26	1	3
D81	0.006	-138.78	0.69	196.25	176.32	47.478	0.55	-0.31	54.25	1.28	2	3
D83	0.147	-118.90	4.81	213.74	196.37	57.202	-0.41	-0.63	56.08	1.31	2	4
D84	0.001	-139.52	1.70	196.35	176.40	47.351	0.61	-0.08	54.25	1.29	2	3
D86	0.103	-140.01	1.99	219.39	201.10	61.709	-0.28	-0.31	56.25	1.32	3	4

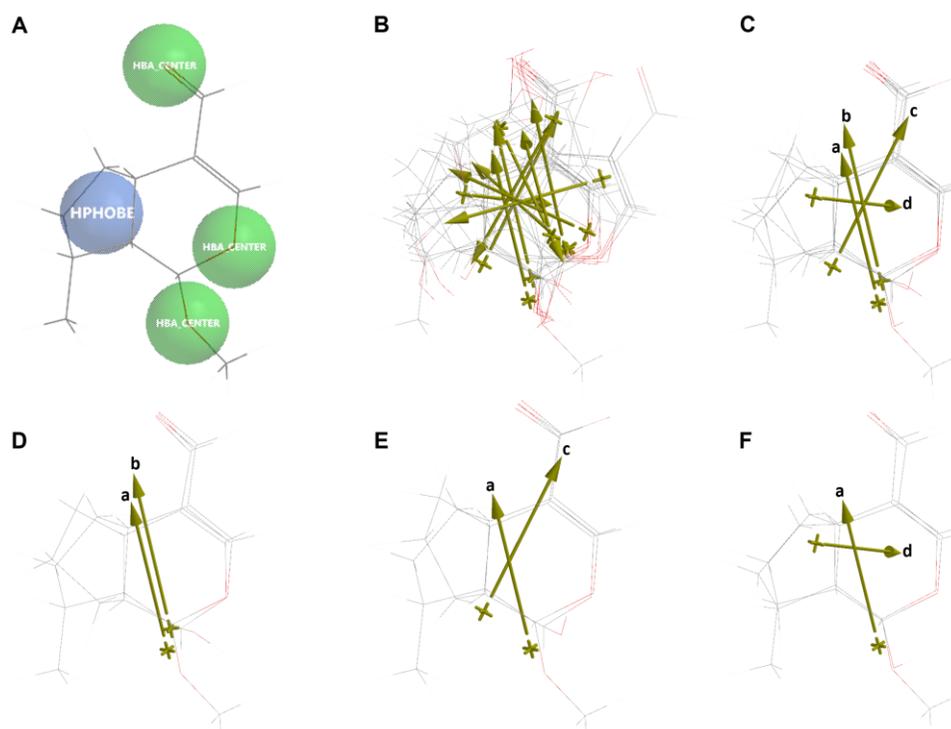
ρ: Momento dipolar; GAP: Diferencia entre E<sub>HOMO</sub> y E<sub>LUMO</sub>; α: Polarizabilidad; β: Ovalidad. \*Estos iridoides fueron analizados en su forma de anión. --: No fue determinado con el programa Spartan '20.

Las estructuras 3D de los mejores iridoides diseñados con base en la estructura de genipina, con sus respectivos vectores del dipolo se muestran en la Figura A6 (Ver sección 11.- Anexos). Curiosamente, solo D79, D80, D81 y D83 presentaron un vector del dipolo con una dirección similar a los iridoides simples más activos (eufrasina, campsinol, artselaenina A y artselaenina B); esto podría atribuirse al aldehído en C4, que fue común a estos cuatro iridoides diseñados. El resto de los iridoides presentaron un vector del dipolo con una diferente orientación. Esto fue influenciado por la presencia de otros sustituyentes en C4, o por la falta de sustituyentes en esta posición.

Cabe resaltar que el cambio del éster por el ácido carboxílico en C4 aumentó la potencia del iridoide comparado con genipina, pero el cambio del ácido carboxílico por un aldehído disminuyó la potencia del iridoide comparado a la CI<sub>50exp</sub> de genipina. La eliminación del

doble enlace en C7-C8 también incrementó la potencia de los iridoides. Además de la falta del doble enlace en C7-C8, la ausencia de cualquier sustituyente en el anillo del ciclopentano incrementó la actividad biológica. La incorporación de un hidroxilo en C8, o un hidroxilo extra en C6 (D70-D72) incrementó la potencia del compuesto. En algunos casos, el orden de la reactividad de los compuestos relacionados a las sustituciones en C4 es como sigue: ninguno>hidroximetilo>aldehído (D83, D84 y D86).

Luego se realizó el alineamiento con diez de los 12 mejores iridoides diseñados (D70, D71, D72, D74, D77, D79, D80, D81, D84 y D86) y el iridoide más activo y estructuralmente similar (artselaenina A) se muestra en la Figura 56. Los cuatro CFD's se seleccionaron en virtud de que fueron los que compartían en común los iridoides diseñados con artselaenina A. Los puntajes de alineamiento más altos fueron aquellos entre los iridoides diseñados D79, D80, y D81 con artselaenina A, y sus valores fueron 0.78, 0.77 y 0.99, respectivamente. El mejor puntaje de alineamiento se obtuvo con D81, comparado con artselaenina A (Figura 56,F). El alineamiento con D80 tuvo el menor puntaje de 0.78, pero la orientación del vector del dipolo fue paralelo al de artselaenina A (Figura 56,D). Estos iridoides no han sido evaluados contra células de cáncer cervicouterino hasta nuestro conocimiento.



**Figura 56.** Alineamiento de artselaenina A con los mejores iridoides diseñados. (A) Centros de similitud en común por CFD's de artselaenina A (los círculos morados representan los CFD's seleccionados para el alineamiento). (B) Alineamiento de artselaenina A con D70, D71, D72, D74, D77, D79, D80, D81, D84 y D86. (C) Alineamiento of artselaenina A con D80, D79, y D81. (D) Alineamiento de artselaenina A con D80. (E) Alineamiento de artselaenina A con D79. (F) Alineamiento de artselaenina A con D81. El vector del dipolo es representado por las flechas doradas para cada iridoide alineado (a: artselaenina A, b: D80, c: D79, d: D81).

Finalmente, se analizaron los gráficos de MEP de los diez mejores candidatos de los iridoides diseñados para evaluar las principales diferencias y similitudes para explicar su reactividad. La iso-superficie de -10 kcal/mol muestra el perfil electrostático de los iridoides diseñados (Figura A7, ver sección 11.- Anexos). La alta actividad predicha de los iridoides diseñados podría atribuirse a la alta densidad electrónica sobre el ácido carboxílico o el aldehído en C4, el hidroxilo en C1, y el oxígeno sp<sup>3</sup> del pirano. También, la mayor densidad electrónica se observa en el oxígeno del hidroximetilo en C4, y sobre los hidroxilos en C6, y C8. Este patrón de densidad electrónica se observa en artselaenina A, el cual fue el iridoide activo reportado más similar a D77, D80 y D84 (Figura A7,A,C,F, ver sección 11.- Anexos). Los iridoides D61 y D62 también presentan una alta densidad electrónica sobre el hidroximetilo en C8 (Figura A7,I,J).

En la Figura A8 (Ver sección 11.- Anexos) se muestran las regiones más susceptibles a un ataque electrofílico (color amarillo a rojo) y aquellos a un ataque nucleofílico (color azul). En todos los iridoides las regiones con mayor densidad electrónica se ubican en el oxígeno del carbonilo en C4, y el oxígeno del hidroxilo en C1, C6, C8 y C10, correlacionando con las distribuciones previas de MEP. Las regiones con menor densidad electrónica se ubican principalmente sobre el hidrógeno del aldehído en C4, y los otros hidrógenos de los hidroxilos en C1 y C10, lo que correlaciona con los otros gráficos de superficie, y fueron como las regiones del mapa del MEP de artselaenina A, principalmente D77, D80 y D84 (este último con una distribución electrónica extra en el oxígeno sp<sup>2</sup>). Los iridoides tales como D70 y D71 presentaron una mayor distribución electrónica debido a los hidroxilos presentes en sus estructuras, y en el caso de D70, debido a la presencia del grupo epoxi.

El diseño de fármacos con base en el ligando es una técnica que se ha usado desde hace décadas, como lo es el diseño de derivados de piperina, en el cual se hicieron modificaciones estructurales a la estructura de la piperina, que fue propuesta como compuesto líder dada su baja potencia, con el propósito de incrementar su actividad biológica como antiepiléptico (Fujita, 1995). En el inicio del estudio no se conocía el blanco terapéutico, sólo la actividad que ejercía el ligando. Los métodos que los autores realizaron fueron estudios de relación estructura-actividad, simplificación de la cadena lateral, y variaciones de sustituyentes en el anillo de benceno, así como en la región de la amida, entre otros. También se realizó un estudio QSAR, logrando generar un modelo matemático que se describiera y predijera la actividad biológica. Se obtuvieron nueve compuestos, de los cuales uno de ellos se llevó a estudios preclínicos (Fujita, 1995; Wang *et al.*, 1999).

## 8. CONCLUSIONES:

El iridoide genipina mostró actividad citotóxica en todas las líneas celulares evaluadas, de las cuales las más sensibles fueron CaSki (metastásica, HPV16), CaLo (IIB, HPV18), MCF-7 y BT-549 (triple negativo) con concentraciones inhibitorias medias 66, 59, 70 y 75  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Sin embargo, el iridoide genipósido no ejerció efecto citotóxico contra las líneas celulares de cáncer cervicouterino y de cáncer de mama en ninguna de las concentraciones y en las condiciones probadas.

Con respecto a los análisis de relación estructura-actividad (SAR) y de similitud molecular, se encontró que el momento dipolar es relevante para la actividad citotóxica contra la línea celular HeLa. También se observó que la presencia de diferentes grupos funcionales, como aldehído o ácido carboxílico, o la ausencia de cualquier sustituyente, en C4, el hidroxilo en C1, el hidroximetilo en C8, y la ausencia del doble enlace en C7-C8 influye en la actividad biológica de los iridoideos.

Derivado del estudio QSAR, se obtuvo un modelo matemático con habilidad de predicción de la actividad biológica contra HeLa, que revela que el momento dipolar es el descriptor molecular principal que impacta en la actividad biológica de los iridoideos.

Finalmente, los iridoideos diseñados incorporaron las características estructurales más relevantes de los iridoideos simples con mejor actividad citotóxica reportada con base en la estructura de genipina que fue el iridoide con mejor actividad citotóxica evaluado en el presente trabajo. Diez de los iridoideos diseñados (D80, D79, D77, D81, D84, D83, D86, D70, D71, y D72) mostraron mejor actividad citotóxica ( $CI_{50\text{pred}}$ : 0.002–0.146  $\mu\text{M}$ ) en comparación con el iridoide más activo reportado en la literatura (eufrasina,  $CI_{50\text{exp}}$ : 0.2  $\mu\text{M}$ ).

## 9. PERSPECTIVAS:

- Proponer las reacciones de síntesis y sintetizar los mejores iridoides diseñados (D80, D79, D77, D81, D84, D83, D86, D70, D71, y D72).
- Evaluar la actividad citotóxica de los mejores iridoides diseñados (D80, D79, D77, D81, D84, D83, D86, D70, D71, y D72) contra la línea celular HeLa.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular de genipina y los derivados más relevantes con la proteína UCP-2 mitocondrial, que de acuerdo con los hallazgos *in vitro* de Yang *et al.*, (2016), éste es un blanco de genipina en una línea celular de cáncer pancreático Panc-1, y podría ser también un blanco de genipina en la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa.

## 10. REFERENCIAS:

- American Cancer Society (ACS), (2017). **Quimioterapia para cáncer de origen primario desconocido.** [<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-origen-primario-desconocido/tratamiento/quimioterapia.html>, consultada el 10 de octubre de 2017.]
- Ayyasamy, V.; Owens, K.M.; Desouki, M.M.; Liang, P.; Bakin, A. (2011). **Cellular Model of Warburg Effect Identifies Tumor Promoting Function of UCP2 in Breast Cancer and Its Suppression by Genipin.** *PLOS ONE*, 6(9): e24792.
- Bai, G.; Chen, B.; Xiao, X.; Li, Y.; Liu, X.; Zhao, D.; Zhang, L.; Zhao, D. (2022). **Geniposide inhibits cell proliferation and migration in human squamous carcinoma cells via AMPK and JNK signaling pathways.** *Experimental and therapeutic medicine*, 24: 706.
- Balakrishnan, S.; Mukherjee, S.; Das, S.; Bhat, F.A.; Singh, P.R.; Patra, C.R.; Arunakaran, J. (2017). **Gold nanoparticles–conjugated quercetin induces apoptosis via inhibition of EGFR/PI3K/Akt–mediated pathway in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231).** *Cell Biochemistry & Function*, 35, 217–231.
- Barzaman, K.; Karami, J.; Zarei, Z.; Hosseinzadeh, A.; Kazemi, M.H.; Moradi-Kalbolandi, S.; Safari, E.; Farahmand, L. (2020). **Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments.** *International Immunopharmacology*, 84:106535.
- Becker, S. (2015). **A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge.** *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 131: S36-S39.
- Bianco, A. (1994). **Recent developments in iridoids chemistry.** *Pure and Applied Chemistry*, 66(10/11):2235-2338.
- Bimonte, S.; Barbieri, A.; Palma, G.; Rea, D.; Luciano, A.; D’Aiuto, M.; Arra, C., Izzo, F. (2015). **Dissecting the role of curcumin in tumour growth and angiogenesis in mouse model of human breast cancer.** *Biomed Research International*, 2015, 878134.
- Bishayee, K., Ghosh, S., Mukherjee, A., Sadhukhan, R., Mondal, J., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2013). **Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction.** *Cell Proliferation*, 46(2), 153–163.
- Brown, S.; Clastre, M.; Courdavault, V.; O’Connor, S.E. (2015). **De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:3205–3210.
- Burk, R.D.; Chen, Z.; Van Doorslaer, K. (2009). **Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity.** *Public Health Genomics* 12:281-290.
- Cancer Today, (2022). **Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide.** [[http://globocan.iarc.fr/Pages/burden\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx), consultada el 10 de octubre de 2023].

- Cao, H.; Feng, Q.; Xu, W.; Li, X.; Kang, Z.; Ren, Y.; Du, L. (2010). **Genipin induced apoptosis associated with activation of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p53 protein in HeLa cells.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(8):1343-1348.
- Compendio Nacional de Insumos para la Salud (CNIS), (2023). [[https://www.csg.gob.mx/contenidos/valoracioncientifica/compendio\\_nacional.html](https://www.csg.gob.mx/contenidos/valoracioncientifica/compendio_nacional.html)], consultada el 19 de abril de 2024.]
- Chambers, C.C.; Hawkins, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. (1996). **Model for aqueous solvation based on class IV atomic charges and first solvation shell effects.** *Journal of Chemical Physics*, 100:16385–1398.
- Chen, Z.; Xu, H.; Wang, X.; Liu, Z. (2017). **Lactobacillus raises *in vitro* anticancer effect of geniposide in HSC-3 human oral squamous cell carcinoma cells.** *Experimental and therapeutic medicine*, 14:4586-4594.
- Crosbie, E.J.; Einstein, M.H.; Franceschi, S.; Kitchener, H.C. (2013). **Human papillomavirus and cervical cancer.** *Lancet*, 382:889-899.
- Cui, W., Aouidate, A., Wang, S., Yu, Q., Li, Y., & Yuan, S. (2020). **Discovering anti-cancer drugs via computational methods.** *Frontiers in pharmacology*, 11.
- Dasari, S.; Wudayagiri, R.; Valluru, L. (2015). **Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment.** *Clinica Chimica Acta*, 445:7-11.
- Denny, L.; Prendiville, W. (2015). **Cancer of the cervix: Early detection and cost-effective solutions.** *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 131:S28-S32.
- Deore, A.B.; Dhumane, J.R.; Wagh, R.; Sonawane, R. (2019). **The stages of drug discovery and development process.** *Asian journal of pharmaceutical research and development*, 7(6):62–67.
- DeSantis, C.E.; Ma, J.; Gaudet, M.M.; Newman L.A.; Miller, K.D.; Sauer, A.G.; Jemal, A.; Siegel R.L. (2019). **Breast cancer statistics, 2019.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69:438-451.
- Dinda, B.; Debnath, S.; Harigaya, Y. (2007). **Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids.** A review, part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55:159-222.
- Doorbar, J. (2005). **The papillomavirus life cycle.** *Journal of Clinical Virology*, 32S:S7-S15.
- Eckert, H., & Bajorath, J. (2007). **Molecular similarity analysis in virtual screening: Bofoundations, limitations and novel approaches.** *Drug Discovery Today*, 12(5–6), 225–233.
- Feng, Q.; Cao, H.L.; Xu, W.; Li, X.R.; Ren, Y.Q.; Du, L.F. (2011). **Apoptosis induced by genipin in human leukemia K562 cells: involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest.** *Acta Pharmacologica Sinica*, 31:519–527.

- Fujita, T. (Ed.). (1995). **QSAR and drug design: New developments and applications**. Elsevier Science, pp. 303-304, 321-339.
- Fukuyama, Y., Minoshima, Y., Kishimoto, Y., Chen, I.-S., Takahashi, H., & Esumi, T. (2004). **Iridoid glucosides and p-coumaroyl iridoids from viburnum luzonicum and their cytotoxicity**. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1833–1838.
- Fukuyama, Y.; Minoshima, Y.; Kishimoto, Y.; Chen, I.S.; Takahashi, H.; Esumi, T. (2005). **Cytotoxic iridoid aldehydes from Taiwanese *Viburnum luzonicum***. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53:125-127.
- Ghanbari-Movahed, M., Jackson, G., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2021). **A systematic review of the preventive and therapeutic effects of naringin against human malignancies**. *Frontiers in pharmacology*, 12.
- Gramatica, P. (2013). **On the development and validation of QSAR models**. En *Methods in Molecular Biology* (pp. 499–526). Humana Press.
- Guía Práctica Clínica (GPC), (2010). **Prevención y detección oportuna del cáncer cérvico uterino en el primer nivel de atención**. Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
- Guía Práctica Clínica (GPC), (2017). **Tratamiento del Cáncer cervicouterino en segundo y tercer nivel de atención**. Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
- Guneydas, G.; Topcul, M.R. (2022). **Antiproliferative effects of curcumin different types of breast cancer**. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 23(3):911–917.
- Habtemariam, S.; Lentini, G. (2018). **Plant-derived anticancer agents: lessons from the pharmacology of geniposide and its aglycone, genipin**. *Biomedicines*, 6(39):1-28.
- Halgren, T.A. (1996). **Merck Molecular Force Field. I. Basis, form, scope, parameterization and performance of MMFF94**. *Journal of Computational Chemistry*, 17: 490-519.
- He, M.; Xia, L.; Li, J. (2021). **Potential Mechanisms of Plant-Derived Natural Products in the Treatment of Cervical Cancer**. *Biomolecules*, 11(10):1539.
- Hwang, H.; Kim, C.; Kim, S.M.; Kim, W.S.; Choi, S.H.; Chang, I.M.; Ahn, K.S. (2012). **The hydrolyzed products of iridoid glycoside with  $\beta$ -glucosidase treatment exert anti-proliferative effects through suppression of STAT3 activation and STAT3-regulated gene products in several human cancer cells**. *Pharmaceutical Biology*. 50:8-17.
- Hay, P.J.; Wadt, W.R. (1985). **Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi**. *Journal of Chemical Physics*, 82:284-298.
- Hong, H.Y.; Kim, B.C. (2007). **Mixed lineage kinase 3 connects reactive oxygen species to c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-induced mitochondrial apoptosis in genipin-**

**treated PC3 human prostate cancer cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(2):307-312.

- Iwaloye, O., Ottu, P. O., Olawale, F., Babalola, O. O., Elekofehinti, O. O., Kikiowo, B., Adegboyega, A. E., Ogbonna, H. N., Adeboboye, C. F., Folorunso, I. M., Fakayode, A. E., Akinjiyan, M. O., Onikanni, S. A., & Shityakov, S. (2023). **Computer-aided drug design in anti-cancer drug discovery: What have we learnt and what is the way forward?** *Informatics in Medicine Unlocked*, 41(101332), 101332.
- Jiménez, M.; Padilla, M.; Reyes, R.; Espinosa, L.; Meléndez, E.; Lira Rocha, A. (1995). **Iridoid glycoside constituents from *Castilleja tenuiflora*.** *Biochemical Systematics and Ecology* 23:455-456.
- Jo, M.J.; Jeong, S.; Yun, H.K.; Kim, D.Y.; Kim, B.R.; Kim, J.L.; Na, Y.J.; Park, S.H.; Jeong, Y.A.; Kim, B.G.; Ashktorab, H.; Smoot, D.T.; Heo, J.Y.; Han, J.; Lee, D.H.; Oh, S.C. (2019). **Genipin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis via downregulation of Stat3/mcl-1 pathway in gastric cancer.** *BMC Cancer*, 19(1):739.
- Kang, M.J.; Khanal, T.; Kim, H.G.; Lee, D.H.; Yeo, H.K.; Lee, Y.S.; Ahn, Y.T.; Kim, D.H.; Jeong, H.G.; Jeong, T.C. (2012). **Role of metabolism by human intestinal microflora in geniposide-induced toxicity in HepG2 cells.** *Archives of Pharmacal Research*, 35(4):733-738.
- Kashafi, E., Moradzadeh, M., Mohamadkhani, A., & Erfanian, S. (2017). **Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 573–577.
- Kim B.C.; Kim, H.G.; Lee, S.A.; Lim, S.; Park, E.H.; Lim, C.J. (2005). **Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway.** *Biochemical Pharmacology*, 1:70(9):1398-407.
- Kim E.S.; Jeong, C.S.; Moon A. (2012). **Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells** *Oncology Reports*, 27:567-572.
- Kim, M. S., Bak, Y., Park, Y. S., Lee, D. H., Kim, J. H., Kang, J. W., Song, H.-H., Oh, S.-R., & Yoon, D. Y. (2013). **Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells.** *Cell Biology and Toxicology*, 29(4), 259–272.
- Ko, H.; Kim, J.M.; Kim, S.J.; Shim, S.H.; Ha, C.H.; Chang, H.I. (2015). **Induction of apoptosis by genipin inhibits cell proliferation in AGS human gastric cancer cells via Egr1/p21 signaling pathway.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(19):4191-4196.
- Leon-Ferre, R.A.; Goetz, M.P. (2023). **Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer.** *BMJ*, 381:e071674.

- Li, J., Ma, J., Wang, K. S., Mi, C., Wang, Z., Piao, L. X., Xu, G. H., Li, X., Lee, J. J., & Jin, X. (2016). **Baicalein inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and expression of NF- $\kappa$ B-regulated target gene products.** *Oncology Reports*, 36(5), 2771–2776.
- Li, Z.; Zhang, T.B.; Jia, D.H.; Sun, W.Q.; Wang, C.L.; Gu, A.Z.; Yang, X.M. (2018). **Genipin inhibits the growth of human bladder cancer cells via inactivation of PI3K/Akt signaling.** *Oncology Letters*, 15:2619-2624.
- Lin, S.; Shen, Y. H.; Li, H. L.; Yang, X. W.; Chen, T.; Lu, L. H.; Huang, Z. S.; Liu, R. H.; Xu, X. K.; Zhang, W. D.; Wang, H. 2009. **Acylated iridoids with cytotoxicity from *Valeriana jatamansi*.** *Journal of Natural Products* 72:650-655.
- Liu, X.; Zhao, W.; Wang, W.; Lin, S.; Yang, L. (2017). **Puerarin suppresses LPS-induced breast cancer cell migration, invasion and adhesion by blockage NF- $\kappa$ B and Erk pathway.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 429–436.
- López-Saavedra, A.; Lizano-Soberón, M. (2006). **Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina.** *Cancerología* 1:31-55.
- Mailloux, R.J.; Adjeitey, C.N.; Harper, M.E. (2010). **Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents.** *PLoS One*. 5(10):e13289.
- Marquina, S.; Maldonado-Santiago, M.; Sánchez-Carranza, J.N.; Antúnez-Mojica, M.; González-Maya, L.; Razo-Hernández, R.S.; Alvarez, L. (2019). **Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27:43–54.
- Maggiore, G.; Vogt, M.; Stumpge, D.; Bajorath, J. (2014). **Molecular Similarity in Medicinal Chemistry.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 57:3186–3204.
- Marcotullio, M.C.; Loizzo, M.R.; Messina, F.; Temperini, A.; Tundis, R.; Menichini, F.; Curini, M. (2015). **Bioassay-guided fractionation of *Euphrasia pectinata* Ten. and isolation of iridoids with antiproliferative activity.** *Phytochemistry Letters*, 12:252–256.
- Meadows, K. L., & Hurwitz, H. I. (2012). **Anti-VEGF therapies in the clinic.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a006577–a006577.
- Merz, KM.; Ringe, D.; Reynolds, CH. (Eds.). (2010). **Drug design: structure and ligand-based approaches.** Cambridge University Press.
- Moreno-Escobar, J. A.; Bazaldúa, S.; Villarreal, M. L.; Bonilla-Barbosa, J. R.; Mendoza, S.; Rodríguez-López, V. (2011). **Cytotoxic and antioxidant activities of selected Lamiales species from Mexico.** *Pharmaceutical Biology*, 49(12):1243-1248.
- Mohs, R.C.; Greig, N.H. (2017). **Drug discovery and development: Role of basic biological research.** *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(4):651–657.

- Muñoz, N.; Boxch, F.X.; Castellsague, X.; Díaz, M.; De Sanjose, S.; Hammouda, D.; Shah, K.V.; Meijer, J.L.M. (2004). **Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective.** *International Journal of Cancer* 111:278-285.
- Nagatoshi, M.; Terasaka, K.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. (2011). **Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*.** *Journal of Biological Chemistry*, 286:32866–32874.
- National Cancer Institute (NIH), 2017. **Types of cancer treatment.** [<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>, consultada el 10 de octubre de 2017.]
- Neri-Numa, I.A.; Pessôa, M.A.; Arruda, H.S.; Pereira, G.A.; Paulino, B.N.; Angolini, C.F.F.; Gois, A.L.T.; Pastore, G. M. (2020). **Genipap (*Genipa americana* L.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids.** *Food Research International*, 134:1-10.
- Ohbayashi, N., Murayama, K., Kato-Murayama, M., Kukimoto-Niino, M., Uejima, T., Matsuda, T., Ohsawa, N., Yokoyama, S., Nojima, H., & Shirouzu, M. (2018). Structural basis for the inhibition of cyclin G-associated kinase by gefitinib. *ChemistryOpen*, 7(9), 713–719.
- Olotu, F. A., Agoni, C., Adeniji, E., Abdullahi, M., & Soliman, M. E. (2019). **Probing gallate-mediated selectivity and high-affinity binding of epigallocatechin gallate: A way-forward in the design of selective inhibitors for anti-apoptotic bcl-2 proteins.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3), 1061–1080.
- Ornano, L.; Feroci, M.; Guarcini, L.; Venditti, A.; Bianco, A. (2018). **Anti-HIV agents from nature: Natural compounds from *Hypericum hircinum* and carbocyclic nucleosides from iridoids.** *Studies in Natural Products Chemistry*, 56:173–228.
- Park, S.-H.; Ham, S.; Kwon, T.H.; Kim, M.S.; Lee, D.H.; Kang, J.-W.; Oh, S.-R.; Yoon, D.-Y. (2014). **Luteolin induces cell cycle arrest and apoptosis through extrinsic and intrinsic signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells.** *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology* 33, 219–231.
- Patrick, G.L. (2023). **An introduction to medicinal chemistry.** Oxford University Press. Pp 183-390.
- Peng, Y., Guo, C., Yang, Y., Li, F., Zhang, Y., Jiang, B., & Li, Q. (2015). **Baicalein induces apoptosis of human cervical cancer HeLa cells in vitro.** *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 2129–2134.
- Petersson, G.A.; Tensfeldt, T.G.; Montgomery, J.A. (1991). **A complete basis set model chemistry. III. The complete basis set-quadratic configuration interaction family of methods.** *Journal of Chemical Physics*, 94:6091–6101.
- Pham, T.H.; Page, Y.L.; Percevault, F.; Ferrière, F.; Flouriot, G.; Pakdel, F. (2021). **Apigenin, a partial antagonist of the estrogen receptor (ER), inhibits ER-positive**

- breast cancer cell proliferation through Akt/FOXM1 signaling.** *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 470.
- Prieto-Martínez, F.D.; López-López, E.; Juárez-Mercado, K.E.; Medina-Franco, J.L. (2019). **Computational Drug Design Methods-Current and Future Perspectives.** En Academic Press (Ed.) *In Silico Drug Design.* (pp. 19-44). Elsevier.
- Pungitore, C.R.; León, L.G.; García, C.; Martín, V.S.; Tonn, C.E.; Padrón, J.M. (2007). **Novel antiproliferative analogs of the Taq DNA polymerase inhibitor catalpol.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(5):1332-1335.
- Razo-Hernández, R.S.; Pineda-Urbina, K.; Velazco-Medel, M.A.; Villanueva-García, M.; Sumaya-Martínez, M.T.; Martínez-Martínez, F.J.; Gómez-Sandoval, Z. (2014). **QSAR study of the DPPH· radical scavenging activity of coumarin derivatives and xanthine oxidase inhibition by molecular docking.** *Central European Journal of Chemistry*, 12:1067–1080.
- Ríos, M.Y. (2015). **Química y farmacología de iridoides.** *Temas selectos de química de productos naturales.* Capítulo 4, 95-133.
- Saidi, I.; Baccari, W.; Marchal, A.; Waffo-Téguo, W.; Harrath, A.H.; Mansour, L.; Jannet, H.B. (2020a). **Iridoid glycosides from the Tunisian *Citharexylum spinosum* L.: Isolation, structure elucidation, biological evaluation, molecular docking and SAR analysis.** *Industrial Crops and Products*, 151:112440.
- Saidi, I.; Nimbarte, V.D.; Schwalbe, H.; Wafoo-Téguo, P.; Harrath, A.H.; Mansour, L.; Alwasel, S.; Jannet, H.B. (2020b). **Anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of extracts and phytochemicals from the Tunisian *Citharexylum spinosum* L.: Molecular docking and SAR analysis.** *Bioorganic Chemistry*, 102:104093.
- Sahu, R. K., Verma, V. V., Kumar, A., Tandon, S., Chandra Das, B., & Hedau, S. T. (2022). **In silico prediction and interaction of resveratrol on methyl-CpG binding proteins by molecular docking and MD simulations study.** *RSC Advances*, 12(18), 11493–11504.
- Salcedo, M.; Pina-Sanchez, P.; Vallejo-Ruiz, V.; Monroy-Garcia, A.; Aguilar-Lemarroy, A.; Cortes-Gutierrez, E. I.; Santos-Lopez, G.; Montoya-fuentes, H.; Grijalva, R.; Madrid-Marina, V.; Apresa-Garcia, T.; Hernandez, D.M.; Jave-Suarez, L.F.; Romero, P.; Poot, A.; Salgado, E.; Ramos-Gonzalez, P.; Gonzalez-Hernandez, R.; Canton, J.C.; Jimenez-Aranda, L.; Parra-Melquiadez, M.; Paniagua, L.; Mendoza, M.; Arreola, H.; Villegas, V.; Torres-Poveda, K.; Bahena-Roman, M.; Gonzalez-Yebra, B.; Taniguchi, K.; Rodea, C.; Mantilla-Morales, A.; Mora-Garcia, M.L.; Velazquez-Velazquez, C.K.; Cordova-Uzcanga, C.; Peralta, R.; López-Romero, R.; Marrero, D.; Bandala, C.; Reyes-Leyva, J.; Furuya, M.E.; Almeida, E.; Galvan, M.E.; Grijalva, I. (2014). **Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican Institute for Social Security.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(23):10061-10066.
- Sanchez-Carranza, J.N.; González-Maya, L.; Razo-Hernández, R.S.; Salas-Vidal, E.; Nolasco-Quintana, N.Y.; Clemente-Soto, A.F.; García-Arizmendi, L.; Sánchez-

- Ramos, M.; Marquina, S.; Alvarez, L. (2019). **Achillin Increases Chemosensitivity to Paclitaxel, Over-coming Resistance and Enhancing Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Resistant to Paclitaxel (Hep3B/PTX).** *Pharmaceutics*, 11:512.
- Scarinci, I.C.; Garcia, F.A.R.; Kobetz, E.; Partridge, E.E.; Brandt, H.M.; Bell, M.C.; Dignan, M.; Ma, G.X.; Daye, J.L.; Castle, P.E. (2010). **Cervical cancer prevention: new tools and old barriers.** *Cancer*, 116(11):2531-2542.
- Seo, H.-S.; Ku, J.M.; Choi, H.-S.; Woo, J.-K., Jang, B.-H.; Go, H.; Shin, Y.C.; Ko, S.-G. (2015). **Apigenin induces caspase-dependent apoptosis by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing SKBR3 breast cancer cells.** *Molecular Medicine Reports*, 12, 2977–2984.
- Singh, M., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Mahmood, Z., & Shukla, Y. (2011). **Tea polyphenols induce apoptosis through mitochondrial pathway and by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and akt activation in human cervical cancer cells.** *Oncology Research*, 19(6), 245–257.
- Singh, N.; Vayer, P.; Tanwar, S.; Poyet, J.-L.; Tsaïoun, K.; Villoutreix, B. O. (2023). **Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups.** *Frontiers in drug discovery*, 3.
- Shan, M.; Yu, S.; Yan, H.; Guo, S.; Xiao, W.; Wang, Z.; Zhang, L.; Ding, A.; Wu, Q.; Li, S. F.Y. (2017). **A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product.** *Molecules*, 22(1689):1-29.
- Shanmugam, M.K.; Shen, H.; Tang, F.R.; Arfuso, F.; Rajesh, M.; Wang, L.; Kumar, A.P.; Bian, J.; Goh, B.C.; Bishayee, A.; Sethi, G. (2018). **Potential role of genipin in cancer therapy.** *Pharmacological Research*, 133:195-200.
- Shen, L.-A., Peng, X., Bao, Y., Liu, C., Zhang, H., Li, J., Zhu, D., & Zhang, Q. (2023). **Design, synthesis and biological evaluation of quercetin derivatives as novel  $\beta$ -catenin/B-cell lymphoma 9 protein–protein interaction inhibitors.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 247(115075), 115075.
- Shendge, A.K.; Chaudhuri, D.; Basu, T.; Mandal, N. (2021). **A natural flavonoid, apigenin isolated from *Clerodendrum viscosum* leaves, induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 cells through the regulation of p53 and caspase-cascade pathway.** *Clinical and Translational Oncology*, 23, 718–730.
- Siddiqui, M.A.; Ahamed, M.; Ahmad, J.; Majeed Khan, M.A.; Musarrat, J.; Al- Khedhairi, A.A.; Alrokayan, S.A. (2012). **Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin.** *Food and Chemical Toxicology*, 50, 641–647.
- Sinha, S. & Vohora, D. (2018). **Drug discovery and development.** En *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research* (pp. 19–32). Elsevier.
- Śledź, P.; Cafilisch, A. (2018). **Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics.** *Current Opinion in Structural Biology*, 48:93-102.

- Souza, R. P., Bonfim-Mendonça, P. de S., Gimenes, F., Ratti, B. A., Kaplum, V., Bruschi, M. L., Nakamura, C. V., Silva, S. O., Maria-Engler, S. S., & Consolaro, M. E. L. (2017). **Oxidative stress triggered by apigenin induces apoptosis in a comprehensive panel of human cervical cancer-derived cell lines.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–18.
- Srinivasan, A.; Thangavel, C.; Liu, Y.; Shoyele, S.; Den, R.B.; Selvakumar, P.; Lakshmikuttyamma, A. (2016). **Quercetin regulates  $\beta$ -catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer.** *Molecular Carcinogenesis*, 55, 743–756.
- Stephens, P.J.; Devlin, F.; Chabalowski, C.F.; Frisch, M.J. (1994). **Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields: A comparison of local, nonlocal, and hybrid density functionals.** *Journal of Physical Chemistry*, 45:11623–11627.
- Stewart, J.P.J. (1989). **Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method.** *Journal of Computational Chemistry*, 10:209–220.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS). (2016). **Hoja de datos sobre cáncer de cuello uterino.** [<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>, consultada el 09 de octubre del 2017.]
- Vichai, V.; Kirtikara K. (2006). **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening.** *Nature protocols*, 1(3):1112-1116.
- Vici, P.; Mariani, L.; Pizzuti, L.; Sergi, D.; Di Lauro, L.; Vizza, E.; Tomao, F.; Tomao, S.; Cavallotti, C.; Paolini, F.; Venuti, A. (2014). **Inmunologic treatments for precancerous lesions and uterine cervical cancer.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33:29.
- Virtual Computational Chemistry Laboratory (VCCL), Disponible en línea: <https://vcclab.org/lab/alogps/> (consultado el 25 de agosto de 2023).
- Waks, AG.; Winer, EP. (2019). **Breast cancer treatment: A Review.** *Clinical Review & Education*, 321(3):288-300.
- Wang, C.J.; Wang, S.W.; Lin, J.K. (1991). **Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats.** *Cancer Letters*, 60, 95-102.
- Wang, L.; Zhao, D.-Y.; Zhang, Z.-H.; Zuo, C.-H.; Zhang, Y.; Quan Pei, Y.; Qing Lo, Y. (1999). **Trial of antiepilepsirine (AES) in children with epilepsy.** *Brain & Development*, 21(1), 36–40.
- Wang, H., Khor, T.O.; Shu, L.; Su, Z.Y.; Fuentes, F.; Lee, J.H.; Kong, A.N. (2012). **Plants against cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability.** *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(10): 1281-1305.

- Wang, Z.; Wang, N.; Han, S.; Wang, D.; Mo, S.; Yu, L.; Huang, H.; Tsui, K.; Shen, J.; Chen, J. (2013). **Dietary compound isoliquiritigenin inhibits breast cancer neoangiogenesis via VEGF/VEGFR-2 signaling pathway.** *PLoS ONE*, 8, e68566.
- Wang, C.; Xin, P.; Wang, Y.; Zhou, X.; Wei, D.; Deng, C.; Sun, S. (2018). **Iridoids and sfingolipids from *Hedyotis diffusa*.** *Fitoterapia*, 124:152-159.
- Wang, L., Yang, C., Xie, C., Jiang, J., Gao, M., Fu, L., Li, Y., Bao, X., Fu, H., & Lou, L. (2019). **Pharmacologic characterization of fluzoparib, a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor undergoing clinical trials.** *Cancer Science*, 110(3), 1064–1075.
- Wang, C.; Gong, X.; Bo, A.; Zhang, L.; Zhang, M.; Zang, E.; Zhang, C.; Li, M. (2020). **Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities, and Pharmacokinetics.** *Molecules*, 25, 287.
- Wavefunction, Inc. Spartan'20. Disponible en línea: <https://www.wavefun.com> (consultado el 30 de julio de 2023).
- Wu, X., Yang, Z., Dang, H., Peng, H., & Dai, Z. (2018). **Baicalein inhibits the proliferation of cervical cancer cells through the GSK3 $\beta$ -dependent pathway.** *Oncology Research*, 26(4), 645–653.
- Wu, H.-T.; Lin, J.; Liu, Y.-E.; Chen, H.-F.; Hsu, K.-W.; Lin, S.-H.; Peng, K.-Y.; Lin, K.-J.; Hsieh, C.-C.; Chen, D.-R. (2021). **Luteolin suppresses androgen receptor-positive triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis by epigenetic regulation of MMP9 expression via the AKT/mTOR signaling pathway.** *Phytomedicine*, 81, 153437.
- Xia, W., Liu, Z., Zong, R., Liu, L., Zhao, S., Bacus, S. S., Mao, Y., He, J., Wulfkühle, J. D., Petricoin, E. F., III, Osada, T., Yang, X.-Y., Hartman, Z. C., Clay, T. M., Blackwell, K. L., Lyerly, H. K., & Spector, N. L. (2011). **Truncated ErbB2 expressed in tumor cell nuclei contributes to acquired therapeutic resistance to ErbB2 kinase inhibitors.** *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(8), 1367–1374.
- Xia, X., Xia, J., Yang, H., Li, Y., Liu, S., Cao, Y., Tang, L., & Yu, X. (2019). **Baicalein blocked cervical carcinoma cell proliferation by targeting CCND1 via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.** *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2729–2736.
- Yang, L., Zhang, H.-W., Hu, R., Yang, Y., Qi, Q., Lu, N., Liu, W., Chu, Y.-Y., You, Q.-D., & Guo, Q.-L. (2009). **Wogonin induces G1 phase arrest through inhibiting Cdk4 and cyclin D1 concomitant with an elevation in p21Cip1 in human cervical carcinoma HeLa cells.** *Biochemistry and Cell Biology*, 87(6), 933–942.
- Yang, Y.; Yang, Y.; Hou, J.; Ding, Y.; Zhang, T.; Zhang, Y.; Wang, J.; Shi, C.; Fu, W.; Cai, Z. (2016). **The hydroxyl at position C1 of Genipin is the active inhibitory group that affects mitochondrial uncoupling protein 2 in Panc-1 cells.** *PLoS ONE*, 11, e0147026.

- Ye, J.; Li, J.; Wang, X.; Li, L. (2018). **Medicinal supplement genipin induces p53 and Bax-dependent apoptosis in colon cancer cells.** *Oncology Letters*, 16: 2957-2964.
- Ying, T.-H., Yang, S.-F., Tsai, S.-J., Hsieh, S.-C., Huang, Y.-C., Bau, D.-T., & Hsieh, Y.-H. (2012). **Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8/caspase-3-dependent pathway.** *Archives of Toxicology*, 86(2), 263–273.
- You, Y., He, Q., Lu, H., Zhou, X., Chen, L., Liu, H., Lu, Z., Liu, D., Liu, Y., Zuo, D., Fu, X., Kwan, H., & Zhao, X. (2020). **Silibinin induces G2/M cell cycle arrest by activating Drp1-dependent mitochondrial fission in cervical cancer.** *Frontiers in pharmacology*, 11.
- Young, R. C., Durant, G. J., Emmett, J. C., Ganellin, C. R., Graham, M. J., Mitchell, R. C., Prain, H. D., & Roantree, M. L. (1986). **Dipole moment in relation to hydrogen receptor histamine antagonist activity for cimetidine analogs.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 29(1), 44–49.
- Yu, X., Yang, Y., Li, Y., Cao, Y., Tang, L., Chen, F., & Xia, J. (2018). **Baicalein inhibits cervical cancer progression via downregulating long noncoding RNA BDLNR and its downstream PI3 K/Akt pathway.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 94, 107–118.
- Zhang, E., Zhang, Y., Fan, Z., Cheng, L., Han, S., & Che, H. (2020). **Apigenin inhibits histamine-induced cervical cancer tumor growth by regulating estrogen receptor expression.** *Molecules*, 25(8), 1960.

## 11. ANEXOS

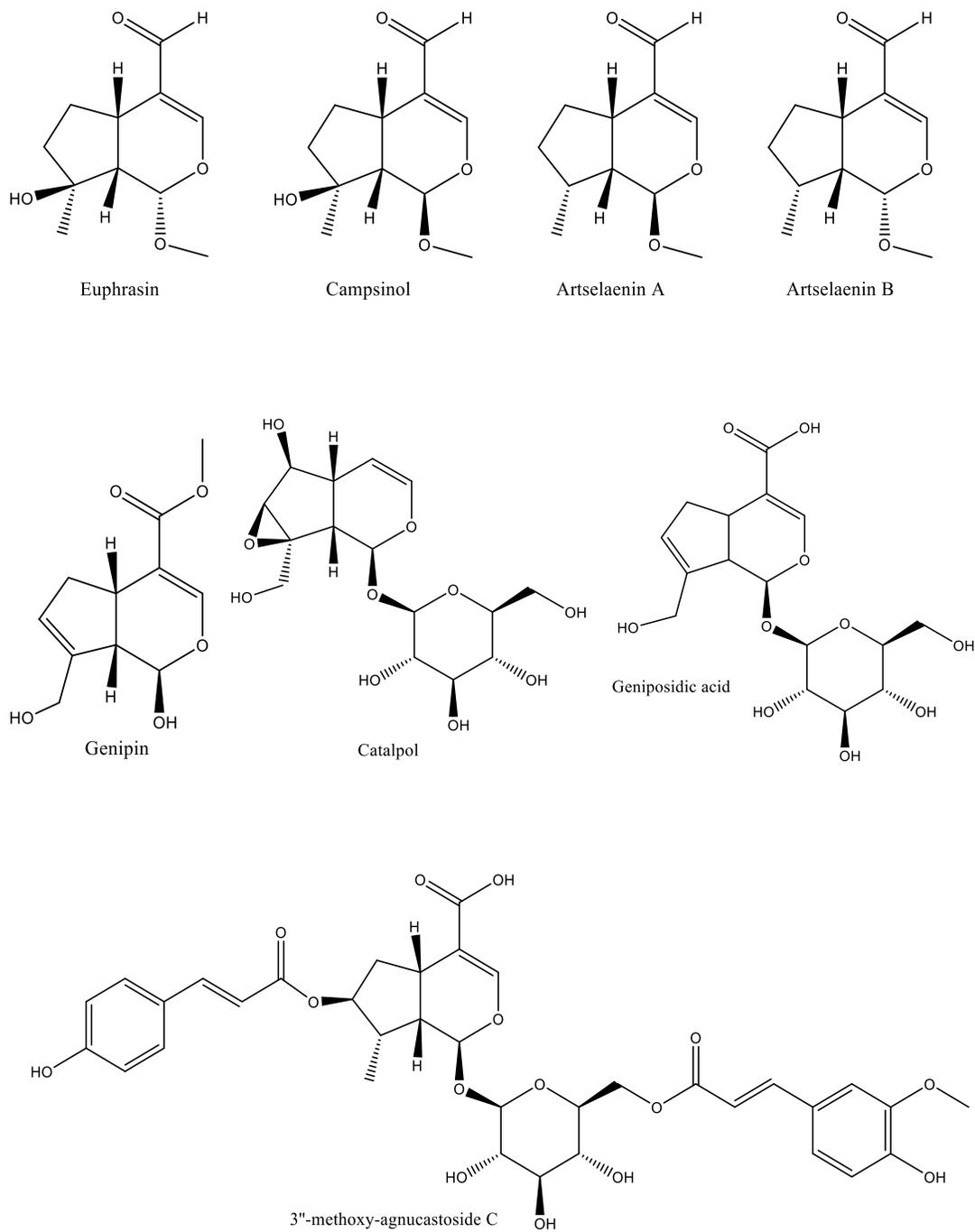


Figura A1. *Continúa.*

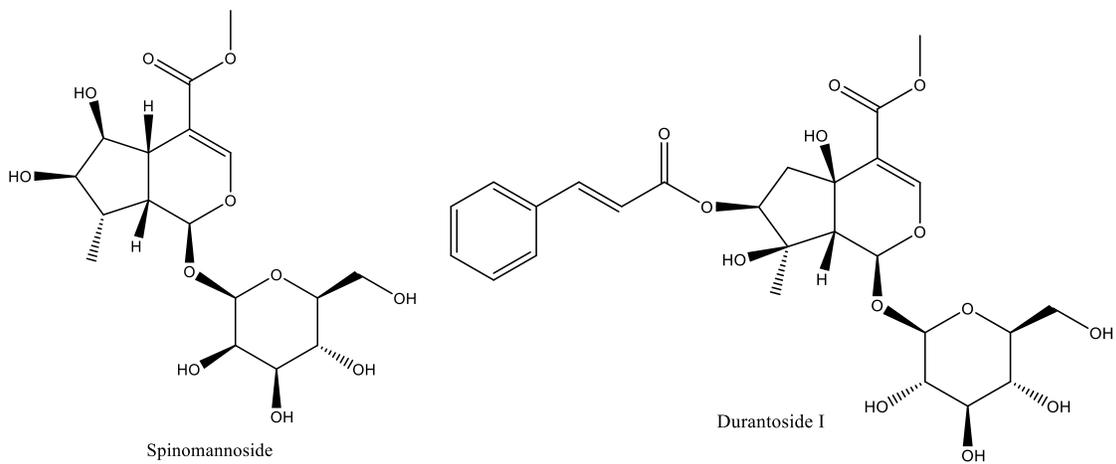
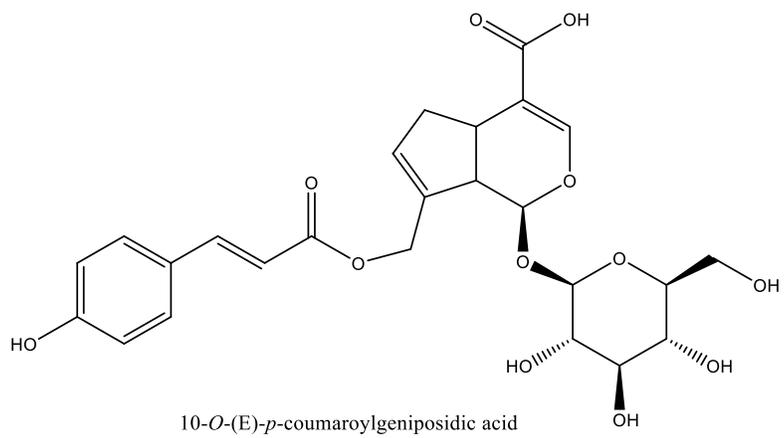
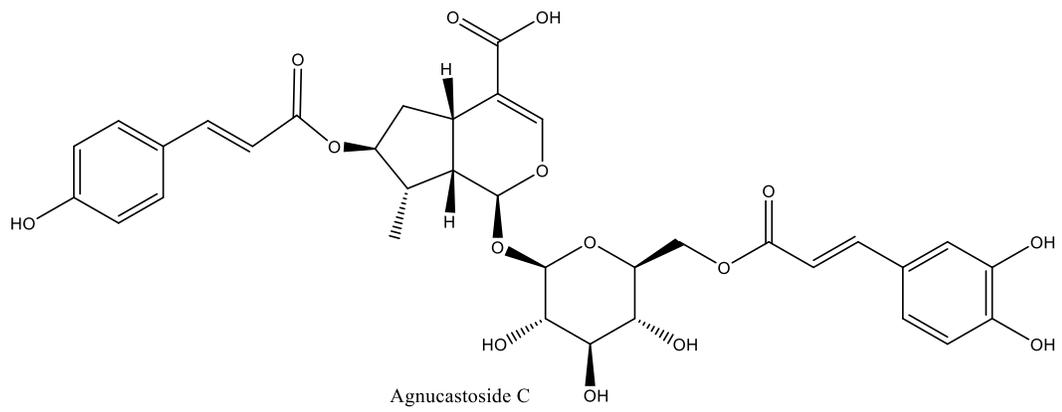


Figura A1. *Continúa.*

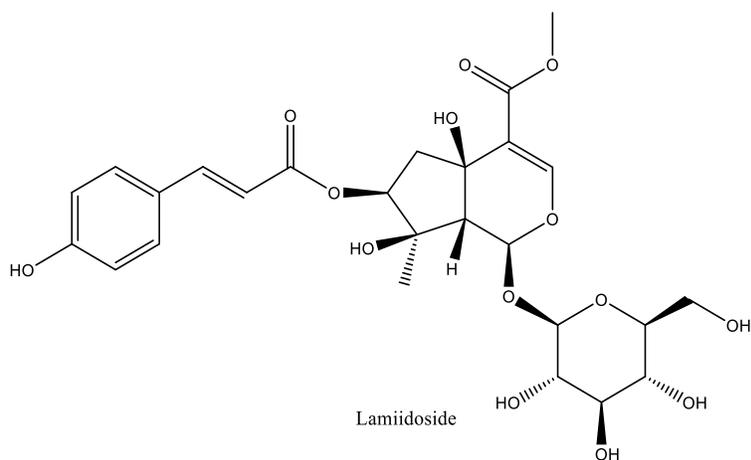
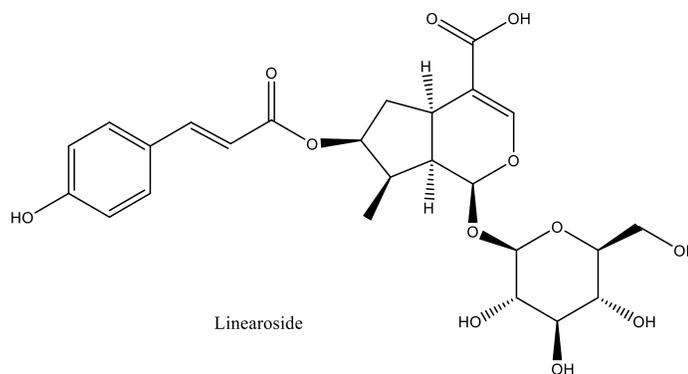
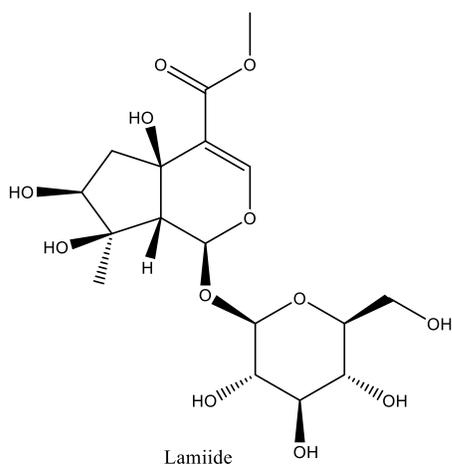
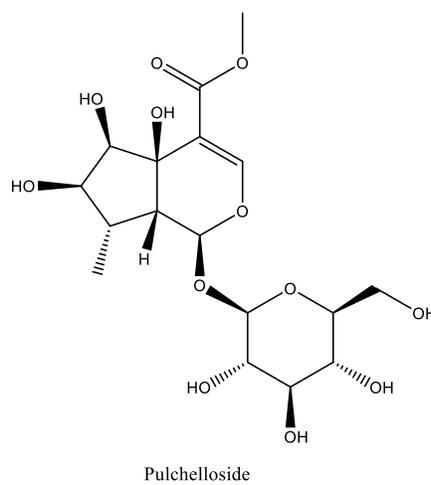
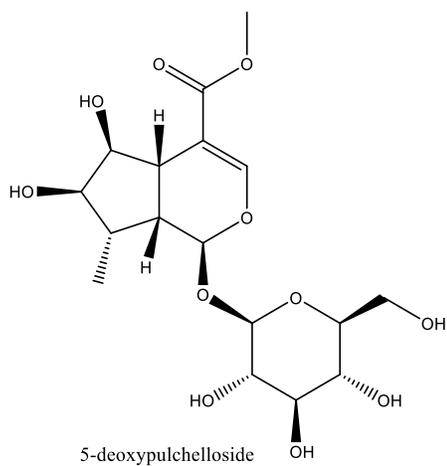


Figura A1. *Continúa.*

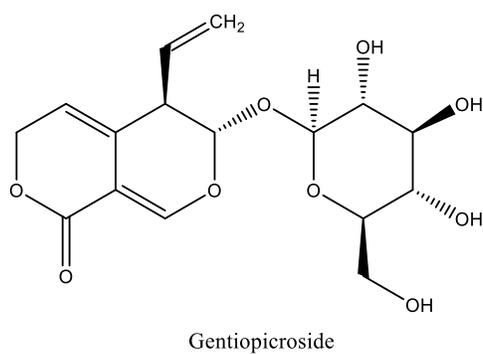
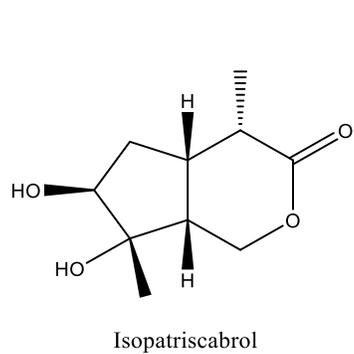
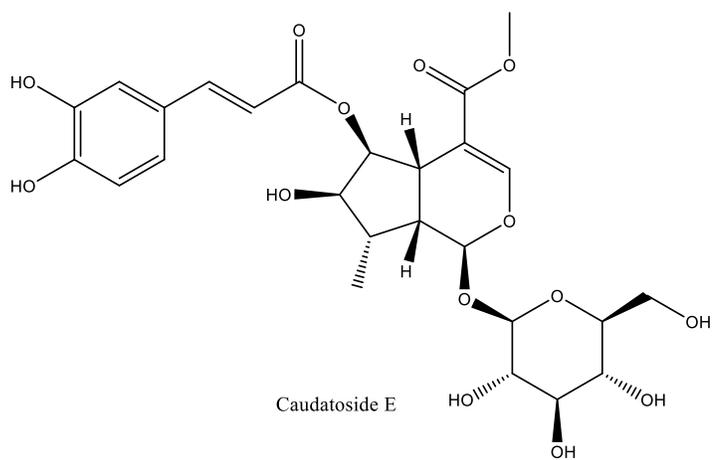
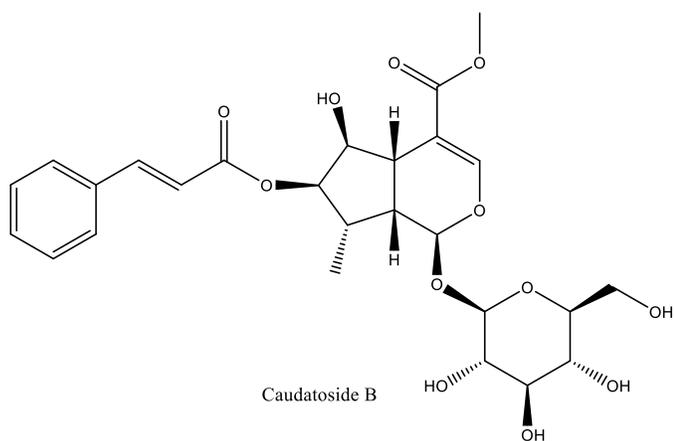


Figura A1. *Continúa.*

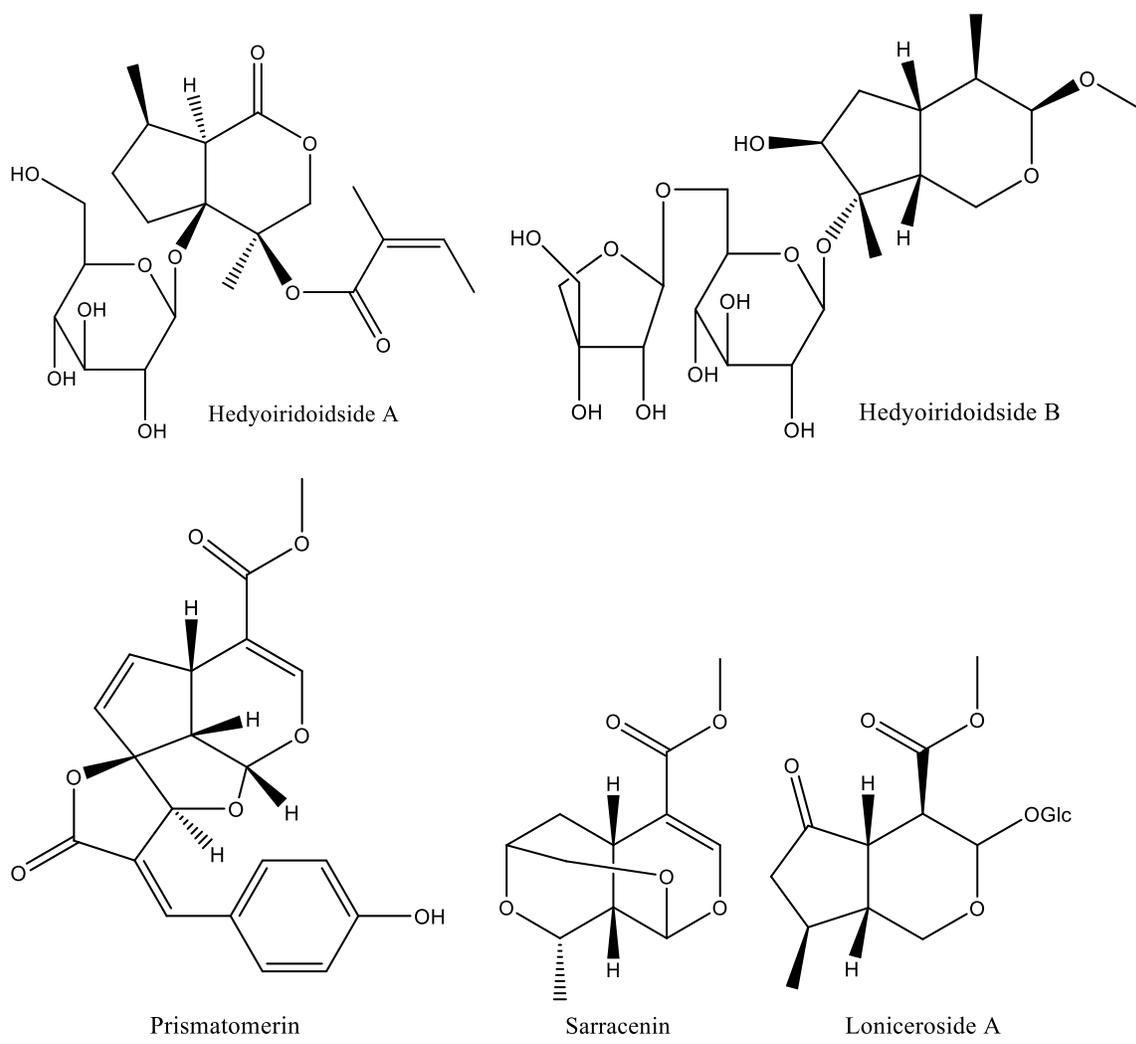
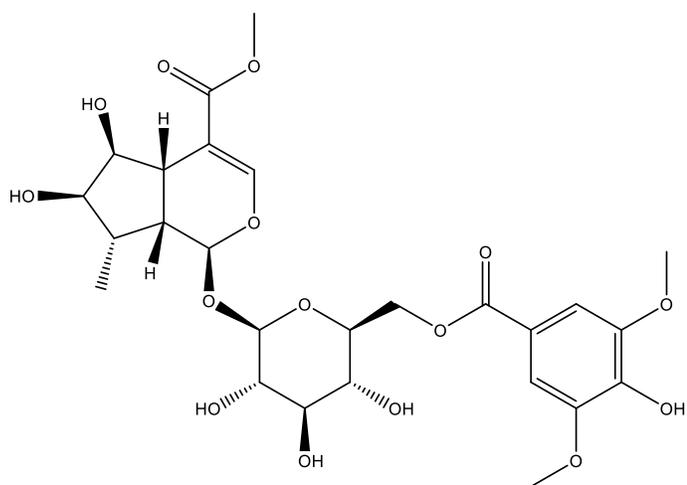
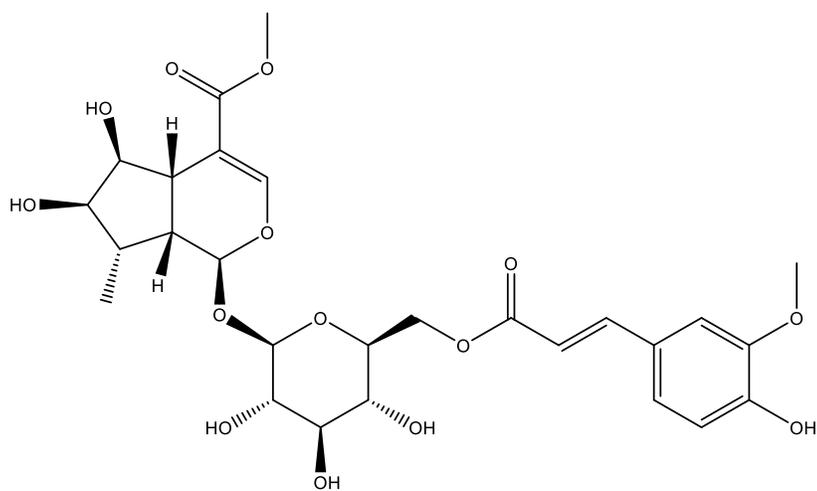


Figura A1. *Continúa.*

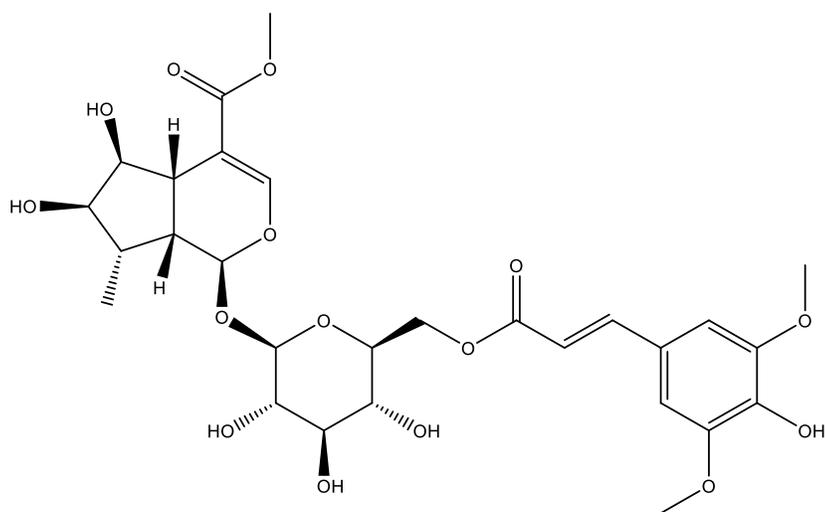


Tunispinoside B

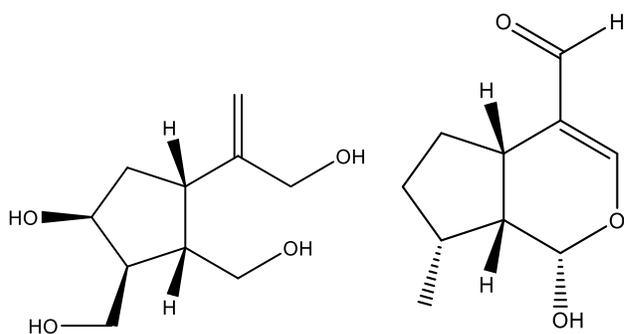


Tunispinoside C

Figura A1. *Continúa.*



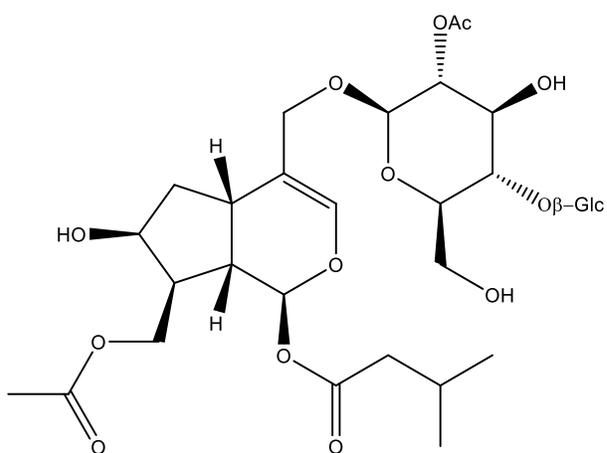
Tunispinoside D



Dioscoridin A

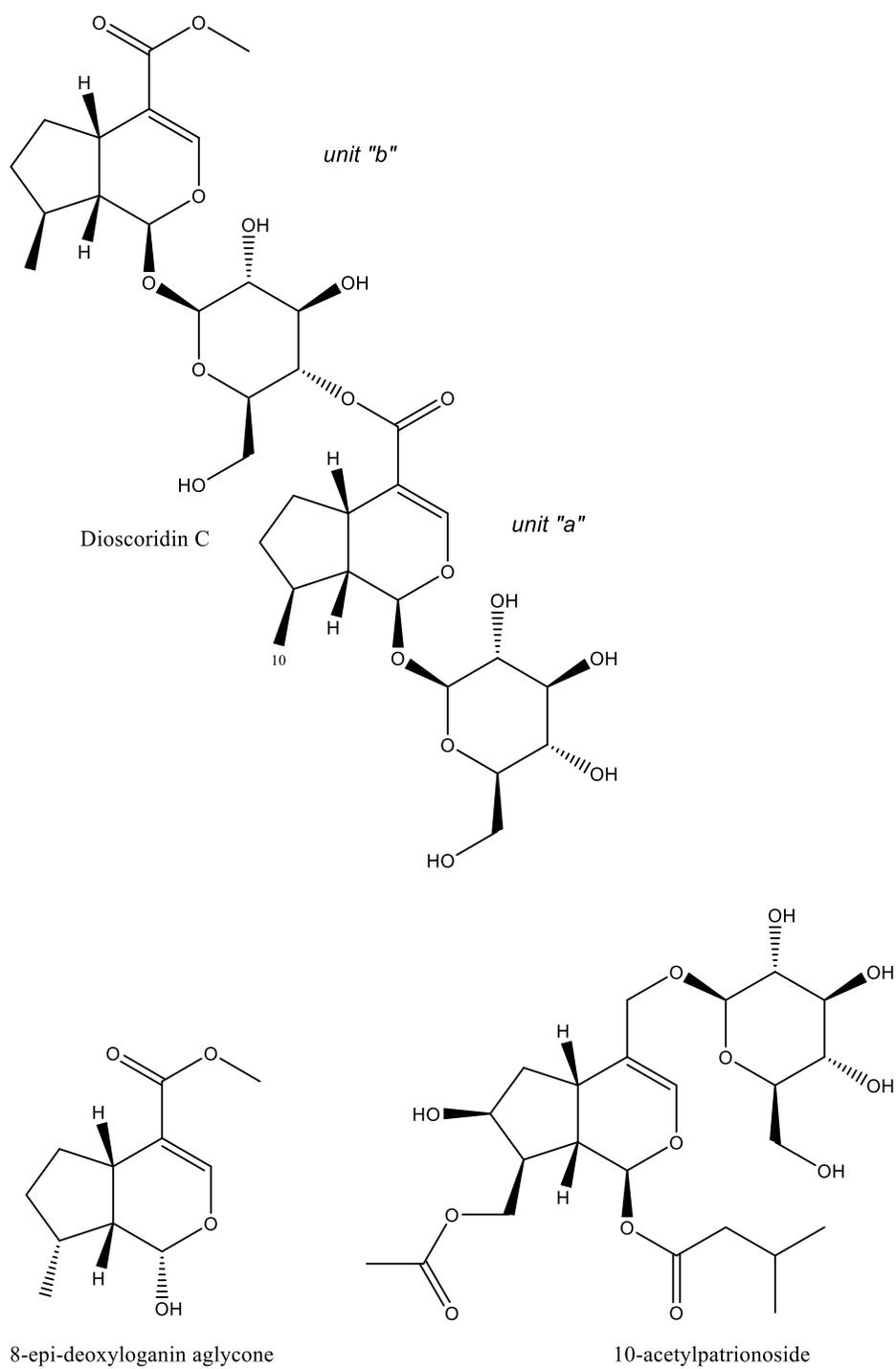
1-epi-bosnarol

Figura A15. *Continúa.*

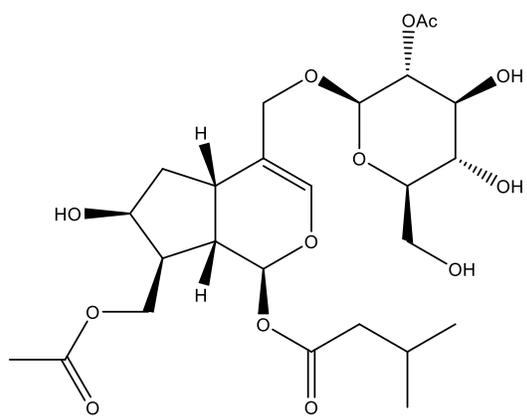


Dioscoridin B

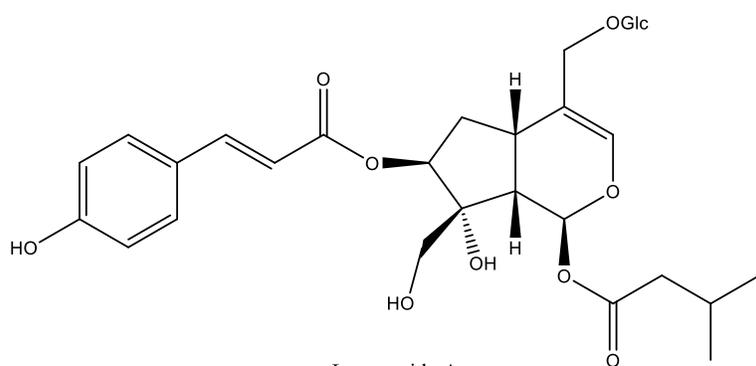
Figura A1. *Continúa.*



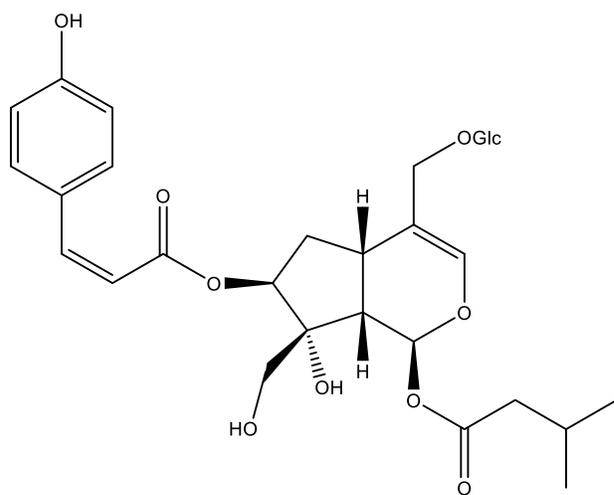
**Figura A1.** *Continúa.*



10,2'-diacetylpatrinoside



Luzonoside A



Luzonoside B

Figura A1. *Continúa.*

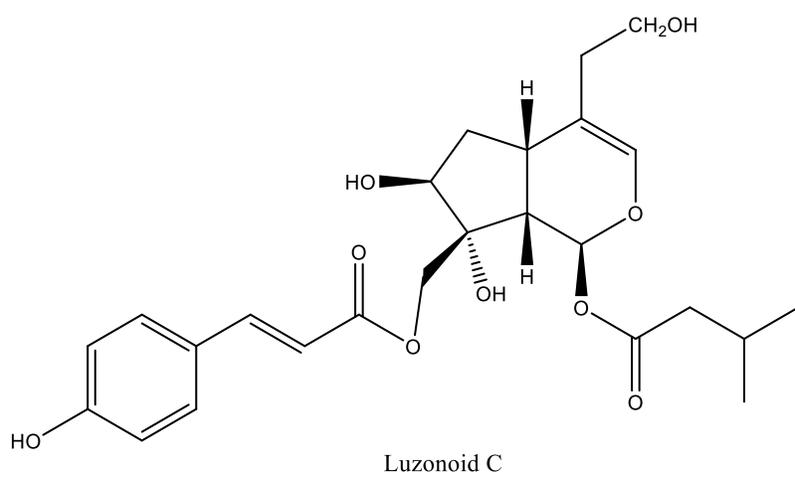
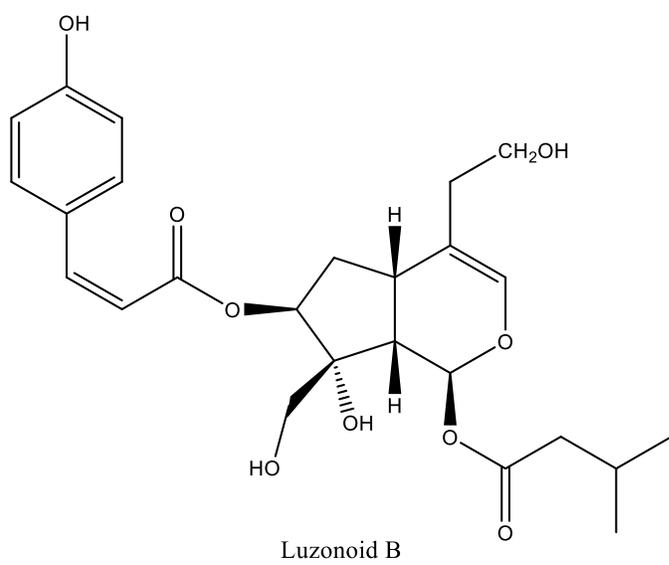
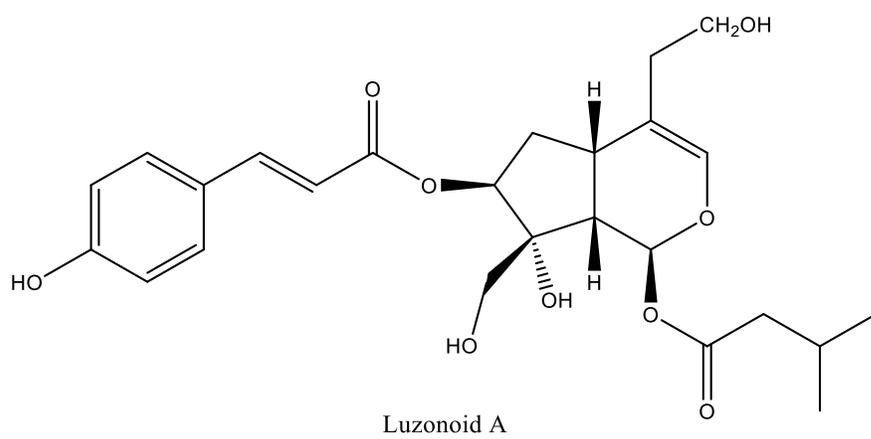
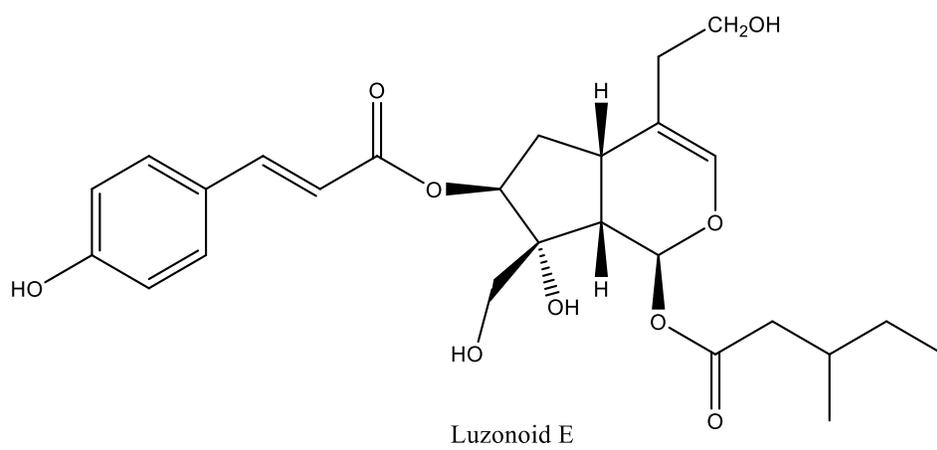
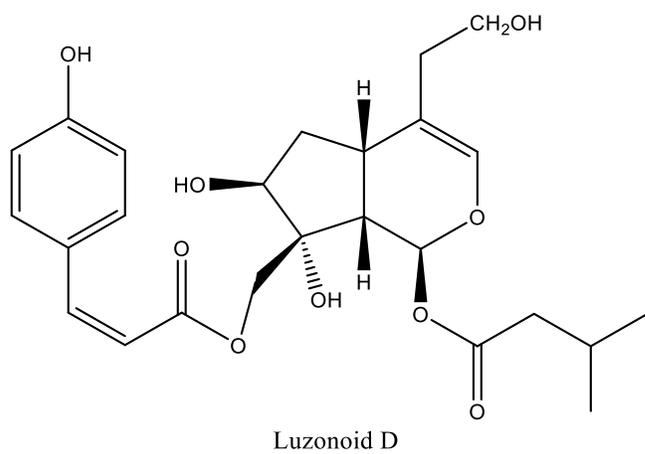
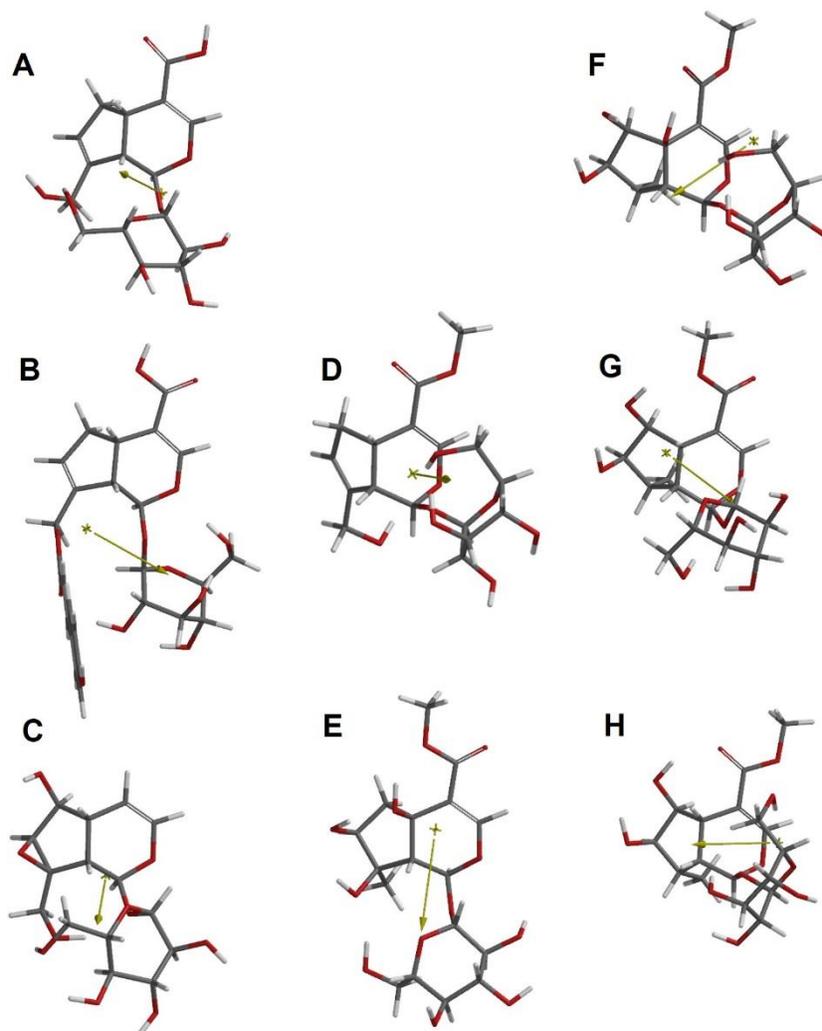


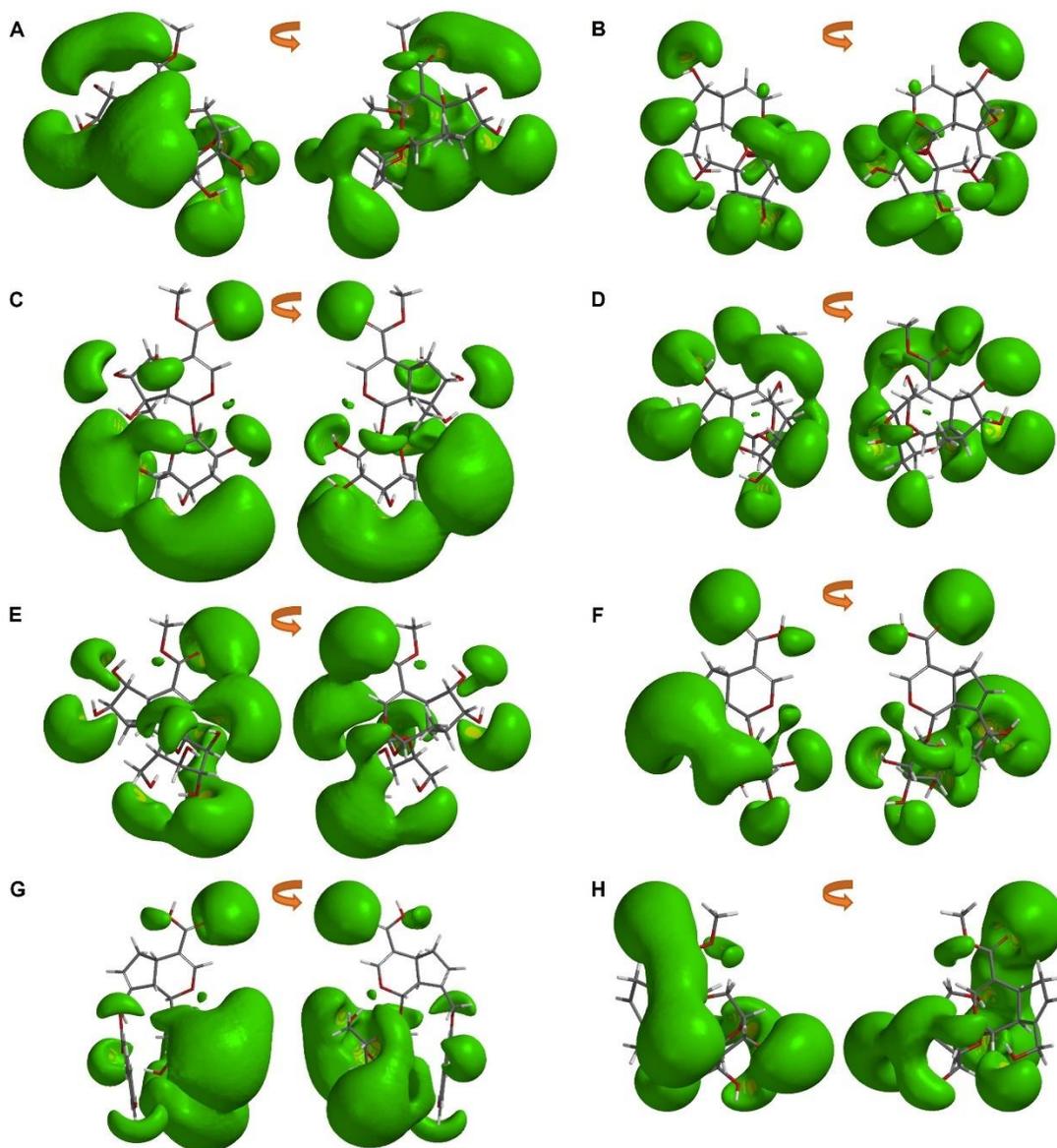
Figura A1. *Continúa.*



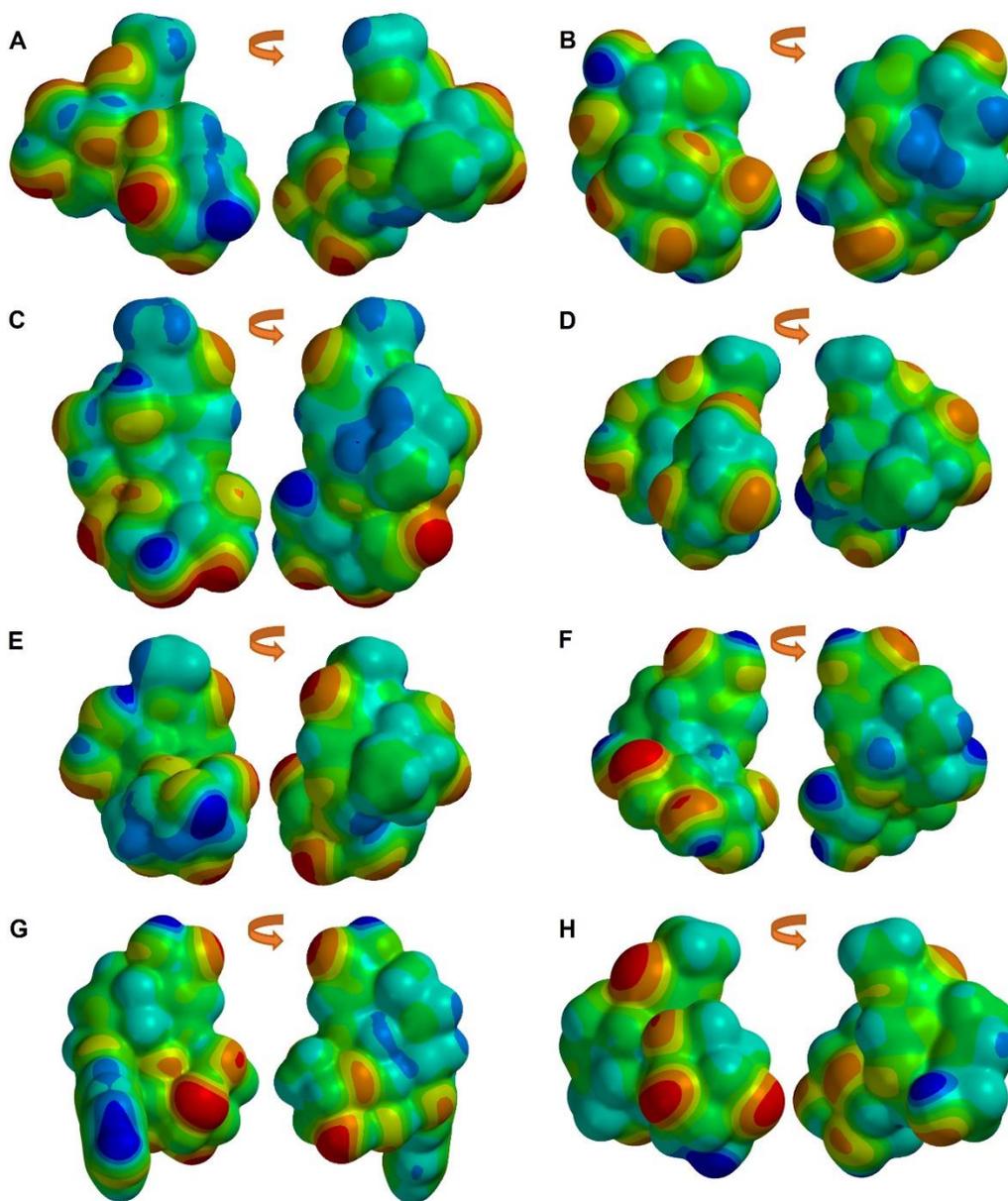
**Figura A1.** Estructuras 2D de iridoides con reporte de actividad citotóxica contra la línea celular HeLa.



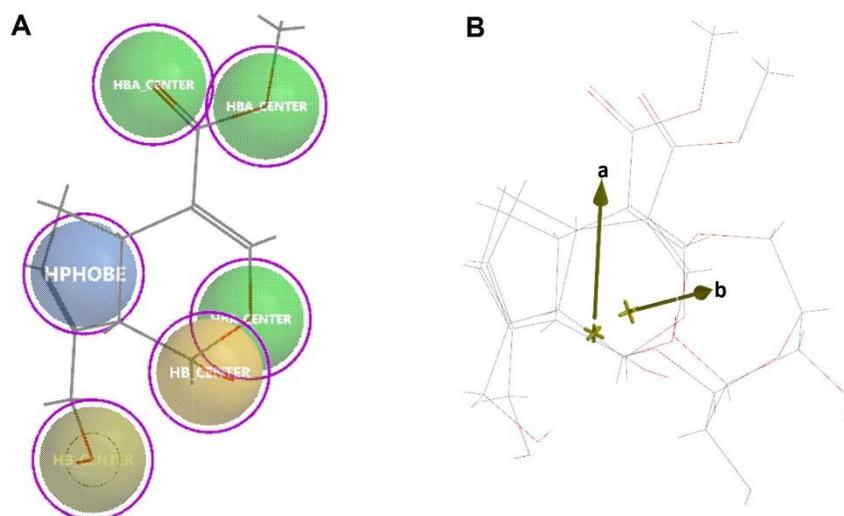
**Figura A2.** Estructuras 3D de iridoides glicosilados evaluados contra la línea celular HeLa, incluyendo el vector del dipolo (flecha dorada). (A) ácido geniposídico, (B) ácido 10-O-(E)-*p*-cumaroil geniposídico, (C) catalpol, (D) genipósido, (E) lamiido, (F) pulchelósido I, (G) 5-deoxi-pulchelósido I, (H) espinomanósido.



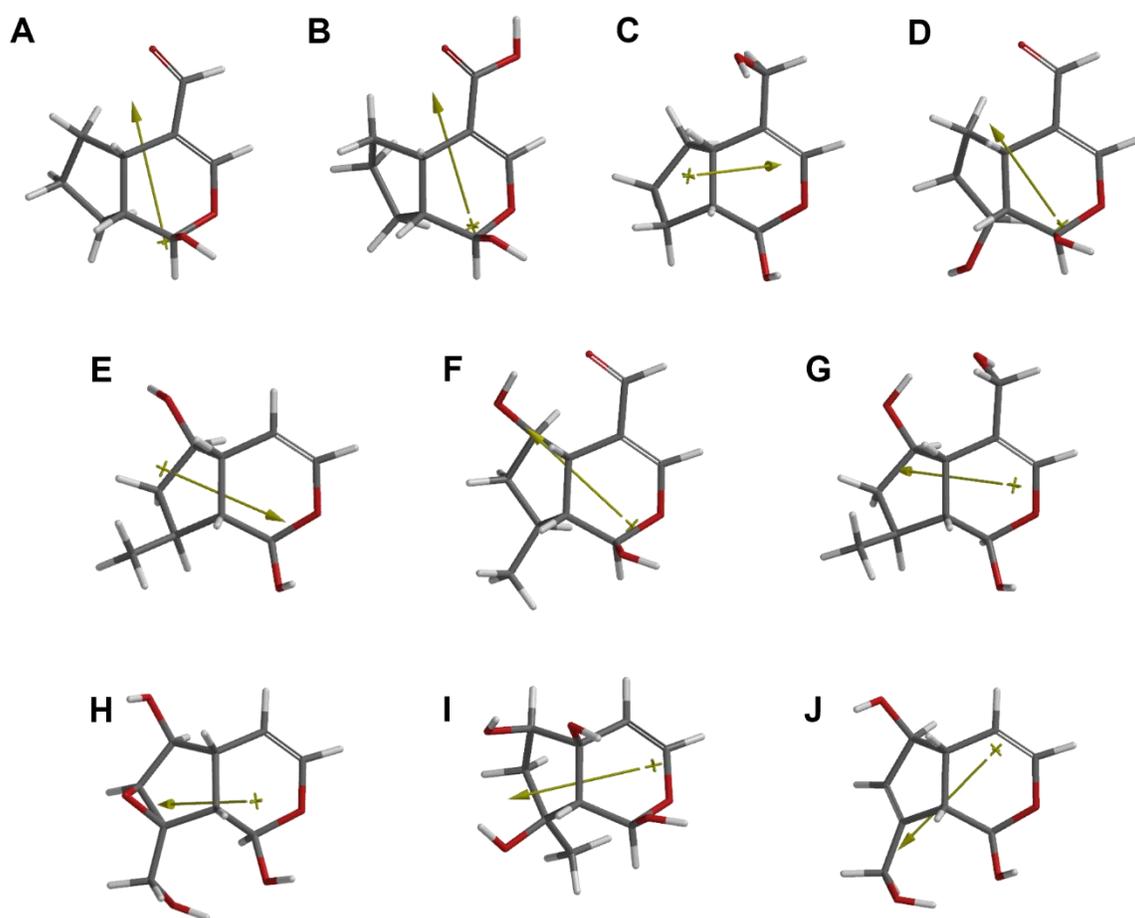
**Figura A3.** Iso-superficie del potencial electrostático molecular de -10 kcal/mol de iridoides glicosilados. (A) pulchelósido I, (B) catalpol, (C) lamiido, (D) espinomanósido, (E) 5-deoxi-pulchelósido I, (F) ácido geniposídico, (G) ácido 10-O-(E)-*p*-cumaroil geniposídico, (H) genipósido.



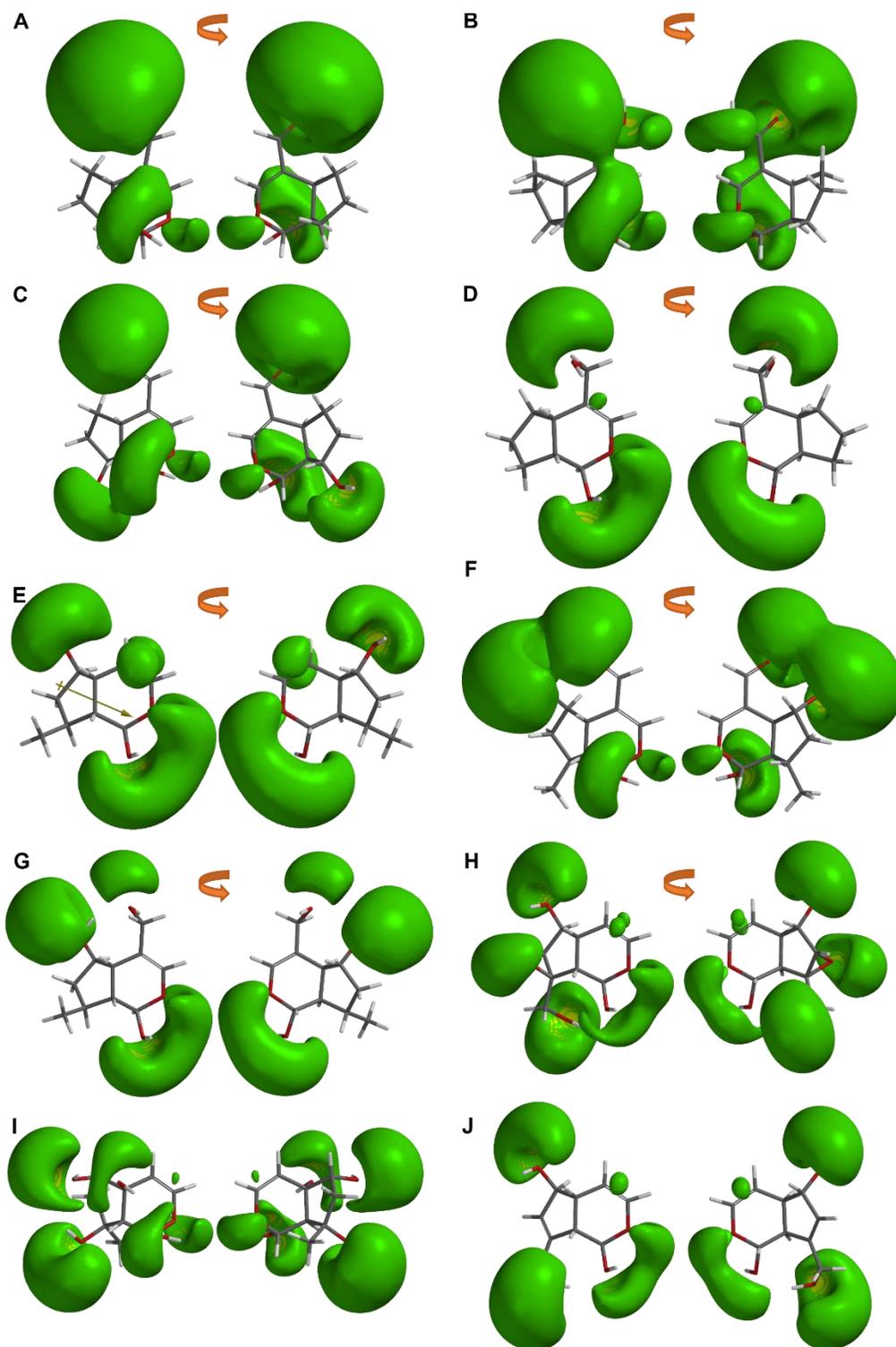
**Figura A4.** Mapa de potencial electrostático de iridoides glicosilados. (A) pulchelósido I, (B) catalpol, (C) lamiido, (D) espinomanósido, (E) 5-deoxi-pulchelósido I, (F) ácido geniposídico, (G) ácido 10-O-(E)-*p*-cumaroil geniposídico, (H) genipósido.



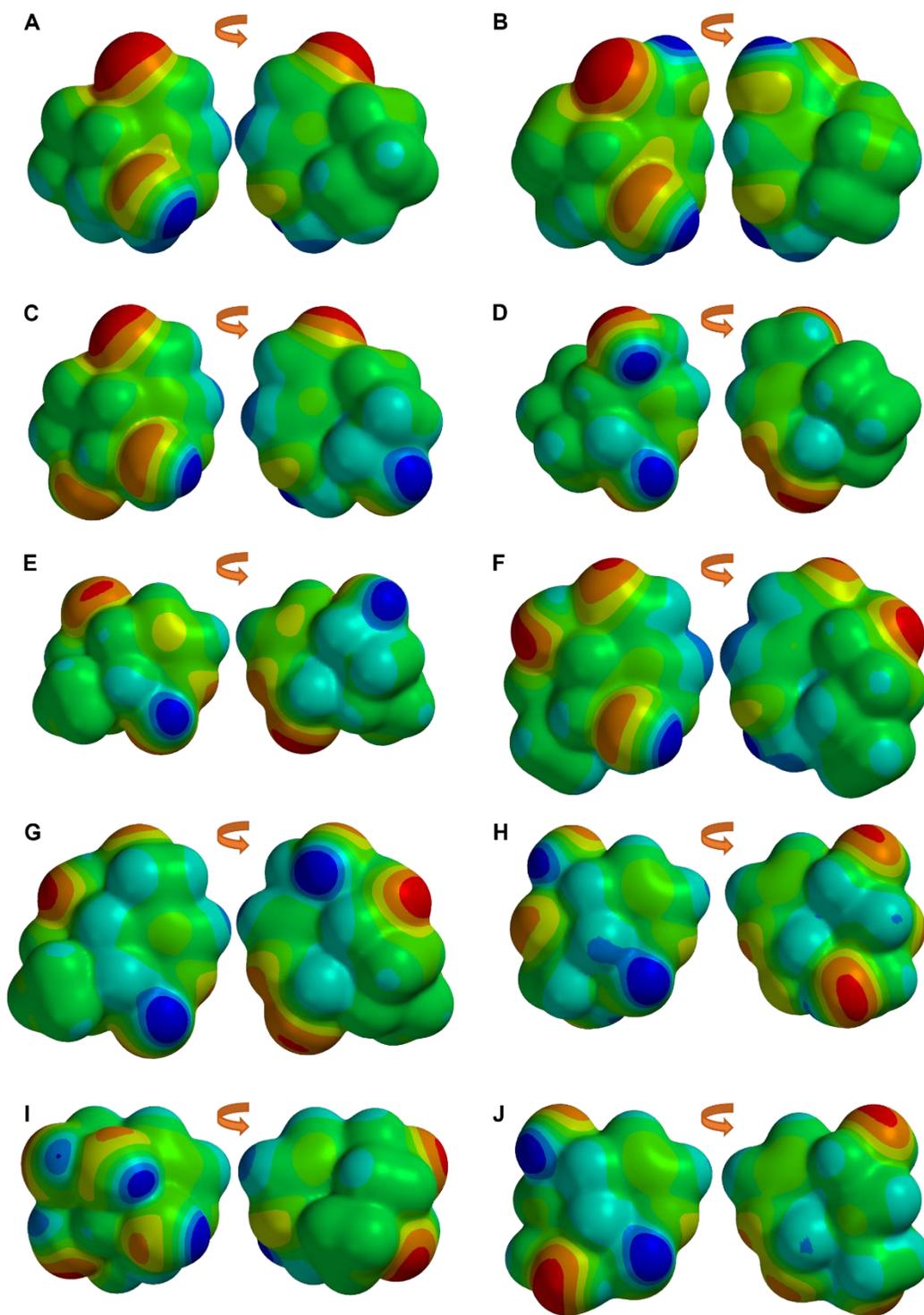
**Figura A5.** Alineamiento de genipina con genipósido. (A) Centros de similitud en común por CFD's de genipina (los círculos morados representan los CFD's seleccionados para el alineamiento), (B) El vector del dipolo es representado por las flechas doradas de ambos iridoides alineado (a: genipina, b: genipósido).



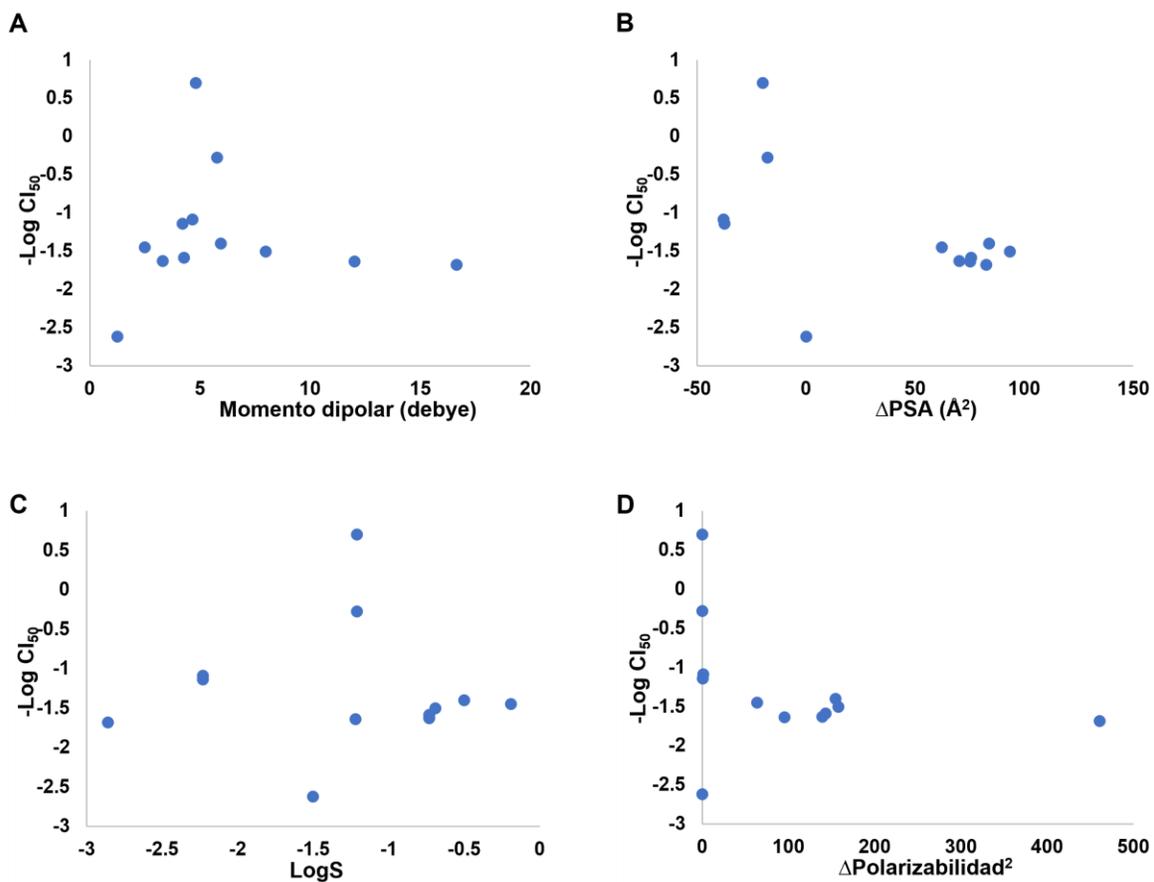
**Figura A6.** Estructuras 3D de los mejores iridoideos con base en genipina. Las flechas doradas representan el vector del dipolo en cada iridoide. (A) D80, (B) D79, (C) D77, (D) D81, (E) D84, (F) D83, (G) D86, (H) D70, (I) D71, (J) D72.



**Figure A7.** Iso-superficie del potencial electrostático molecular de -10 kcal/mol de los mejores iridoides diseñados. (A) D80, (B) D79, (C) D77, (D) D81, (E) D84, (F) D83, (G) D86, (H) D70, (I) D71, (J) D72.



**Figura A8.** Mapa de potencial electrostático de los mejores iridoides diseñados. (A) D80, (B) D79, (C) D77, (D) D81, (E) D84, (F) D83, (G) D86, (H) D70, (I) D71, (J) D72.



**Figura A9.** Correlaciones independientes entre la actividad biológica y los descriptores del modelo QSAR. (A) -Log Cl<sub>50</sub> vs momento dipolar, (B) -Log Cl<sub>50</sub> vs ΔPSA, (C) -Log Cl<sub>50</sub> vs LogS, (D) -Log Cl<sub>50</sub> vs ΔPolarizabilidad<sup>2</sup>.

**Tabla A1.** Iridoides con reporte de actividad citotóxica contra líneas de cáncer cervicouterino *in vitro*.

<b>Compuesto</b>	<b>Línea celular</b>	<b>Tiempo de exposición (h)</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µM)</b>
Eufrasin (Marcotullio <i>et al.</i> , 2015)	HeLa	48	0.2
Campsinol (Marcotullio <i>et al.</i> , 2015)	HeLa	48	1.9
Artselaenina A (Marcotullio <i>et al.</i> , 2015)	HeLa	48	13.8
Artselaenina B (Marcotullio <i>et al.</i> , 2015)	HeLa	48	12.3
Genipina (Cao <i>et al.</i> , 2010)	HeLa	24	397
3"-metoxi-agrucastósido C (Feng <i>et al.</i> , 2017)	HeLa	48	25.3
Ácido 10-O-(E)- <i>p</i> -cumaroilgeniposídico (Feng <i>et al.</i> , 2017)	HeLa	48	48.1
Agnucastósido C (Feng <i>et al.</i> , 2017)	HeLa	48	17.3
Linearósido (Feng <i>et al.</i> , 2017)	HeLa	48	38.3
Catalpol (Feng <i>et al.</i> , 2017)	HeLa	48	28.2
Espinomanósido (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	38.89
5-deoxi-pulchelósido I (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	42.47
Pulchelósido I (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	25.22
Lamiido (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	31.96
Durantósido I (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	34.85
Lamiidósido (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	17.28
Caudatósido B (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	35.34
Caudatósido E (Saidi <i>et al.</i> , 2020a)	HeLa	48	19.02
Isopatriscabrol (Li <i>et al.</i> , 2012)	HeLa	48	24.5
Gentiopicrosido (Hu <i>et al.</i> , 2021)	HeLa	48	1260
Hedioiridóidsido A (Wang <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	48	11.4
Hedioiridóidsido B (Wang <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	48	16.7
Ácido geniposídico (Wang <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	48	43.6
Prismatomerina (Krohn <i>et al.</i> , 2007)	KB-3-1	120	0.41
Sarracenina (Sheng <i>et al.</i> , 2019)	HeLa	48	67.80
Lonicerosido A (Qu <i>et al.</i> , 2020)	HeLa	24	5.5
Tunispinósido A (Saidi <i>et al.</i> , 2020b)	HeLa	48	17.99

Compuesto	Línea celular	Tiempo de exposición (h)	CI <sub>50</sub> (μM)
Tunispinósido B (Saidi <i>et al.</i> , 2020b)	HeLa	48	18.00
Tunispinósido C (Saidi <i>et al.</i> , 2020b)	HeLa	48	25.00
Tunispinósido D (Saidi <i>et al.</i> , 2020b)	HeLa	48	21.47
Dioscoridina A (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	>60
1- <i>epi</i> -bosnarol (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	<60
Dioscoridina B (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	>60
Dioscoridina C (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	>60
Aglicona de 8- <i>epi</i> -deoxyloganina (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	>60
10-acetylpatrinósido (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	>60
10,2'-diacetylpatrinósido (Kırmızıbekmez <i>et al.</i> , 2018)	HeLa	72	>60
Luzonósido A (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	3.39
Luzonósido B (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	4.67
Luzonoide A (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	2.89
Luzonoide B (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	3.11
Luzonoide C (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	3.57
Luzonoide D (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	4.56
Luzonoide E (Fukuyama <i>et al.</i> , 2004)	HeLa S3	72	7.40
Luzonial A (Fukuyama <i>et al.</i> , 2005)	HeLa S3	72	3.50
Luzonial B (Fukuyama <i>et al.</i> , 2005)	HeLa S3	72	1.93
Luzonidial A (Fukuyama <i>et al.</i> , 2005)	HeLa S3	72	24.50

**Tabla A2.** Matriz de correlación de Pearson.

<b>Variables</b>	<b>Momento dipolar</b>	<b>ΔPSA</b>	<b>LogS</b>	<b>ΔPolarizabilidad<sup>2</sup></b>
<b>Momento dipolar</b>	1	0.1818	0.2138	0.5893
<b>ΔPSA</b>	0.1818	1	0.1994	0.4912
<b>LogS</b>	0.2138	0.1994	1	0.0628
<b>ΔPolarizabilidad<sup>2</sup></b>	0.5893	0.4912	0.0628	1

**Tabla A3.** Valores del pKa de los iridoides ácidos.

<i>Ligando</i>	<i>pKa</i>
Ácido geniposídico	4.22
Ácido 10-O-(E)-p-cumaroil geniposídico	4.16
D1	4.51
D4	4.56
D7	4.56
D10	4.62
D29	4.72

**Tabla A4.** Descriptores moleculares de los iridoides diseñados. *Continúa.*

<b>Ligando</b>	<b>Cl<sub>50pred</sub></b> ( $\mu$ M)	<b>GAP</b> (kcal)	<b><math>\rho</math></b> (debye)	<b>Área</b> ( $\text{Å}^2$ )	<b>V</b> ( $\text{Å}^3$ )	<b>PSA</b> ( $\text{Å}^2$ )	<b>LogP</b>	<b>LogS</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>#</b> HBD	<b>#</b> HBA
D1*	147.019	-125.85	1.81	217.56	199.31	78.714	-0.52	-1.04	56.25	1.32	3	4
D2	22.458	-120.73	2.64	208.92	192.24	59.084	-0.79	-1.35	55.73	1.30	2	4
D3	17.448	-127.72	3.02	244.68	223.58	65.992	0.14	-1.07	58.20	1.37	2	4
D4*	6.478	-126.69	3.41	221.65	203.47	78.335	-0.12	-0.58	56.58	1.32	3	4
D5	2.379	-123.30	5.40	214.52	196.18	61.021	-0.38	-1.02	56.02	1.31	2	4
D6	15.777	-126.95	3.29	245.94	224.18	65.825	0.14	-1.07	58.26	1.38	2	4
D7*	8.264	-126.5	3.73	223.82	203.34	80.25	-0.12	-0.58	56.57	1.34	3	4
D8	147.019	-125.85	1.81	217.56	199.31	78.714	-0.52	-1.04	56.25	1.32	3	4
D9	11.783	-122.73	4.10	216.01	196.71	62.142	-0.41	-1.2	56.07	1.32	2	4
D10*	3.439	-123.30	6.44	219.6	200.68	60.798	-0.01	-1.12	56.39	1.32	2	4
D11	4.244	-123.12	5.94	220.74	200.82	61.263	-0.01	-1.12	56.40	1.33	2	4
D12	0.286	-122.45	3.61	206.94	189.55	42.02	-0.08	-1.16	55.49	1.30	1	3
D13	0.291	-123.8	3.2	210.58	193.53	41.979	0.32	-1.13	55.80	1.30	1	3
D14	0.186	-122.68	4.37	211.9	193.67	41.09	0.32	-1.13	55.83	1.31	1	3
D15	25.174	-122.56	3.47	218.12	199.03	41.939	0.44	-1.88	56.26	1.32	1	3
D16	8.552	-123.82	2.79	221	203	41.821	0.84	-1.66	56.57	1.32	1	3
D17	4.890	-122.67	4.42	222.08	202.97	40.996	0.84	-1.66	56.58	1.33	1	3
D18	11.783	-122.73	4.1	216.01	196.71	62.142	-0.41	-1.2	56.07	1.32	2	4
D19	3.439	-123.3	6.44	219.6	200.68	60.798	-0.01	-1.12	56.39	1.32	2	4
D20	4.244	-123.12	5.94	220.74	200.82	61.263	-0.01	-1.12	56.4	1.33	2	4
D21	35.513	-128.21	3.95	219.07	198.98	65.082	0.36	-1.29	56.2	1.33	2	4

GAP: Diferencia entre E<sub>HOMO</sub> y E<sub>LUMO</sub>;  $\rho$ : Momento dipolar; V: Volumen;  $\alpha$ : Polarizabilidad;  $\beta$ : Ovalidad. \*Estos iridoides fueron analizados en su forma de anión. --: No fue determinado con el programa Spartan'20.

**Tabla A4.** Descriptores moleculares de los iridoides diseñados. *Continúa.*

Ligando	CI <sub>50pred</sub> ( $\mu$ M)	GAP (kcal)	$\rho$ (debye)	Área ( $\text{Å}^2$ )	V ( $\text{Å}^3$ )	PSA ( $\text{Å}^2$ )	LogP	LogS	$\alpha$	$\beta$	# HBD	# HBA
D22	1.566	-128.28	4	199.75	180.67	64.951	0.03	-0.85	54.71	1.29	2	4
D23	64.239	-134.93	2.47	228.2	205.86	56.451	0.83	-1.56	56.69	1.35	2	4
D24	4.084	-133.99	4.17	241.33	219.48	51.97	0.6	-1.28	57.8	1.37	2	4
D25	4.279	-137	4.34	249.84	225.37	52.539	0.81	-1.28	58.25	1.4	2	4
D26	12.370	-135.26	4.02	255.21	229.88	52.563	1.31	-1.45	58.63	1.41	2	4
D27	1077.961	-533.02	6.25	257.4	233.22	51.275	--	-2.35	58.99	1.4	2	4
D28	24.178	-140.36	3.98	246.76	239.11	52.53	0.94	-1.58	59.33	1.42	2	4
D29*	29.890	-540.05	3.67	272.36	250.18	50.028	0.89	-1.72	60.35	1.42	2	4
D30	188.380	-130.04	3.66	288.14	266.22	49.777	1.31	-2.13	61.64	1.44	2	4
D31	1065.149	-138.33	4.29	305.36	282.82	51.735	1.73	-2.52	62.9	1.47	2	4
D32	2.923	-135.08	2.4	208.54	187.58	56.438	0.5	-1.1	55.2	1.32	2	4
D33	0.883	-137.74	2.13	225.54	202.41	52.922	0.27	-0.93	56.38	1.35	2	4
D34	0.588	-140.9	4.11	230.88	207.2	52.801	0.48	-0.94	56.74	1.36	2	4
D35	1.964	-129.17	4.96	233.03	210.51	51.527	0.98	-1.21	57.13	1.36	2	4
D36	1476.849	-136.4	5.49	239.97	215.68	51.589	--	-2.35	57.47	1.38	2	4
D37	5.345	-137.7	2.26	246.55	221.08	52.731	0.61	-1.22	57.9	1.39	2	4
D38	10.182	-129.02	3.56	253.51	232.11	50.21	0.56	-1.47	58.88	1.39	2	4
D39	78.668	-130.53	3.51	269.44	248.1	50.269	0.98	-1.86	60.16	1.41	2	4
D40	456.621	-138.22	4.33	286.35	264.62	51.888	1.4	-2.23	61.42	1.44	2	4
D41	131.299	-120.42	2.63	229.19	210.22	61.867	-0.01	-1.52	57.19	1.34	2	4
D42	22.681	-120.85	4.28	232.76	214.18	60.492	0.39	-1.33	57.51	1.34	2	4
D43	20.954	-120.23	4.83	233.82	214.32	60.926	0.39	-1.33	57.33	1.35	2	4
D44	5.492	-121.04	4.05	224.89	206.79	41.505	1.52	-1.64	56.91	1.33	1	3
D45	1.069	-121.19	4.05	205.95	188.56	41.547	1.19	-1.42	55.43	1.3	1	3
D46	275.444	-505.46	2.89	258.12	237.65	40.393	2.09	-2.3	59.41	1.39	1	3
D47	21.638	-122.19	3.23	244.69	225.37	40.061	2.17	-1.87	58.4	1.37	1	3
D48	137.132	-120.89	3.85	250.54	230.24	39.951	1.82	-2.22	58.81	1.38	1	3
D49	8.569	-120.14	4.76	256.53	235.02	40.276	1.95	-1.79	59.21	1.39	1	3
D50	207.278	-118.78	6.57	261.08	239.07	40.651	2.61	-2.41	59.55	1.4	1	3
D51	121.508	-122.26	3.13	264.9	243.79	40.089	2.59	-2.2	59.9	1.4	1	3
D52	1175.119	-121.91	3.11	276.76	255.71	40.739	2.42	-2.62	60.87	1.42	1	3
D53	2729.047	-122.09	2.95	292.14	271.56	40.779	2.84	-2.86	62.15	1.44	1	3

GAP: Diferencia entre E<sub>HOMO</sub> y E<sub>LUMO</sub>;  $\rho$ : Momento dipolar; V: Volumen;  $\alpha$ : Polarizabilidad;  $\beta$ : Ovalidad. \*Estos iridoides fueron analizados en su forma de anión. --: No fue determinado con el programa Spartan'20.

**Tabla A4.** Descriptores moleculares de los iridoides diseñados. *Continúa.*

Ligando	CI <sub>50</sub> pred ( $\mu$ M)	GAP (kcal)	$\rho$ (debye)	Área ( $\text{Å}^2$ )	V ( $\text{Å}^3$ )	PSA ( $\text{Å}^2$ )	LogP	LogS	$\alpha$	$\beta$	# HBD	# HBA
D54	3333.299	-122.08	3.01	305.93	287.51	40.105	3.26	-3.06	63.44	1.45	1	3
D55	2.676	-118.35	2.24	213.18	194.21	41.271	1.2	-1.48	55.91	1.31	1	3
D56	6.921	-121.33	2.9	227.28	207.57	40.391	1.84	-1.66	56.97	1.34	1	3
D57	16.445	-120.24	3.53	233.02	212.41	40.307	1.49	-1.83	57.37	1.35	1	3
D58	2.25	-119.35	4.24	238.48	217.09	40.325	1.62	-1.52	57.76	1.37	1	3
D59	51.298	-118.8	5.6	243.29	220.98	41.009	2.28	-2.09	58.08	1.38	1	3
D60	22.697	-121.41	2.78	247.4	225.98	40.377	2.26	-1.85	58.46	1.38	1	3
D61	275.444	-505.46	2.89	258.12	237.65	40.393	2.09	-2.3	59.41	1.39	1	3
D62	1290.402	-121.14	2.8	273.51	253.54	40.435	2.51	-2.62	60.7	1.41	1	3
D63	1282.133	-121.09	2.7	288.39	269.65	40.352	2.93	-2.72	62.01	1.43	1	3
D64	94.736	-121.47	3.38	254.6	236.87	40.669	2.24	-2.13	59.34	1.38	1	3
D65	631.490	-122.3	3.16	268.57	252.58	40.051	2.66	-2.52	60.61	1.39	1	3
D66	774.928	-123.62	3.15	284.17	268.82	40.524	3.08	-2.64	61.91	1.41	1	3
D67	21.944	-120.7	3	236.69	218.98	41.081	1.91	-1.83	57.9	1.35	1	3
D68	144.219	-121.22	2.81	250.72	234.64	40.355	2.33	-2.18	59.16	1.36	1	3
D69	541.606	-122.14	2.92	265.73	250.8	39.881	2.75	-2.48	60.47	1.38	1	3
D70	0.012	-144.58	2.3	201.54	184.95	73.77	-1.5	0.32	54.89	1.28	3	5
D71	0.030	-145.63	3.19	207.72	190.41	80.817	-1.25	0.36	55.33	1.3	4	5
D72	0.022	-135.25	0.86	196.11	178.97	61.665	-0.79	-0.1	54.5	1.28	3	4
D73	11.117	-126.98	2.29	237.49	216.71	46.402	1.28	-1.53	57.65	1.36	1	3
D74	0.013	-89.18	11.93	211.04	193.89	55.479	--	-0.58	56.19	1.3	1	4
D75	1.210	-123.43	4.8	206.65	188.8	42.041	0.75	-1.46	55.42	1.3	1	3
D76	0.463	-139.77	0.59	215.39	194.54	47.457	0.88	-0.94	55.72	1.33	2	3
D77	0.011	-123.99	3.36	197.34	178.62	60.872	-0.67	-0.11	54.59	1.29	2	4
D78	0.985	-127.89	2.2	219.28	198.11	47.446	0.95	-1.12	56.13	1.33	1	3
D79	0.003	-599.13	12.32	190.51	175.42	54.222	--	-0.5	54.14	1.26	1	4
D80	0.054	-123.61	4.8	187.58	170.55	42.052	0.42	-1.04	53.94	1.26	1	3
D81	0.006	-138.78	0.69	196.25	176.32	47.478	0.55	-0.31	54.25	1.29	2	3
D82	1.808	-119.3	4.54	221.22	203.82	76.266	-1.54	-0.47	56.68	1.32	3	5
D83	0.147	-118.9	4.81	213.74	196.37	57.202	-0.41	-0.63	56.08	1.31	2	4
D84	0.001	-139.52	1.7	196.35	176.4	47.351	0.61	-0.08	54.25	1.29	2	3
D85	1.533	-137.43	2.62	226.1	208.66	80.151	-1.41	-0.24	56.89	1.33	4	5
D86	0.103	-140.01	1.99	219.39	201.1	61.709	-0.28	-0.31	56.25	1.32	3	4

GAP: Diferencia entre E<sub>HOMO</sub> y E<sub>LUMO</sub>;  $\rho$ : Momento dipolar; V: Volumen;  $\alpha$ : Polarizabilidad;  $\beta$ : Ovalidad. \*Estos iridoides fueron analizados en su forma de anión. --: No fue determinado con el programa Spartan'20.

## Article

# Ligand-Based Drug Design of Genipin Derivatives with Cytotoxic Activity against HeLa Cell Line: A Structural and Theoretical Study

Diana López-López <sup>1,†</sup>, Rodrigo Said Razo-Hernández <sup>2,\*</sup>, César Millán-Pacheco <sup>1</sup>,  
Mario Alberto Leyva-Peralta <sup>3</sup>, Omar Aristeo Peña-Morán <sup>4</sup>, Jessica Nayelli Sánchez-Carranza <sup>1</sup>  
and Verónica Rodríguez-López <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Mexico; diana.lopezl@uaem.edu.mx (D.L.-L.); cmp@uaem.mx (C.M.-P.); jessica.sanchez@uaem.mx (J.N.S.-C.)
- <sup>2</sup> Laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Mexico
- <sup>3</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, H. Caborca, Sonora 83621, Mexico; mario.leyva@unison.mx
- <sup>4</sup> Departamento de Ciencias Farmacéuticas, División de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Quintana Roo, Chetumal 77019, Mexico; omar.moran@uqroo.edu.mx
- \* Correspondence: rodrigo.razo@uaem.mx (R.S.R.-H.); veronica\_rodriguez@uaem.mx (V.R.-L.)
- † Taken in part from the Ph.D. thesis of Diana López-López.



**Citation:** López-López, D.; Razo-Hernández, R.S.; Millán-Pacheco, C.; Leyva-Peralta, M.A.; Peña-Morán, O.A.; Sánchez-Carranza, J.N.; Rodríguez-López, V. Ligand-Based Drug Design of Genipin Derivatives with Cytotoxic Activity against HeLa Cell Line: A Structural and Theoretical Study. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1647. <https://doi.org/10.3390/ph16121647>

Academic Editors: Halil İbrahim Ciftci, Belgin Sever and Hasan Demirci

Received: 9 October 2023

Revised: 20 November 2023

Accepted: 21 November 2023

Published: 23 November 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Cervical cancer is a malignant neoplastic disease, mainly associated to HPV infection, with high mortality rates. Among natural products, iridoids have shown different biological activities, including cytotoxic and antitumor effects, in different cancer cell types. Geniposide and its aglycone Genipin have been assessed against different types of cancer. In this work, both iridoids were evaluated against HeLa and three different cervical cancer cell lines. Furthermore, we performed a SAR analysis incorporating 13 iridoids with a high structural similarity to Geniposide and Genipin, also tested in the HeLa cell line and at the same treatment time. Derived from this analysis, we found that the dipole moment (magnitude and direction) is key for their cytotoxic activity in the HeLa cell line. Then, we proceeded to the ligand-based design of new Genipin derivatives through a QSAR model ( $R^2 = 87.95$  and  $Q^2 = 62.33$ ) that incorporates different quantum mechanic molecular descriptor types ( $\rho$ ,  $\Delta PSA$ ,  $\Delta$ Polarizability<sup>2</sup>, and  $\log S$ ). Derived from the ligand-based design, we observed that the presence of an aldehyde or a hydroxymethyl in C4, hydroxyls in C1, C6, and C8, and the lack of the double bond in C7–C8 increased the predicted biological activity of the iridoids. Finally, ten simple iridoids (D9, D107, D35, D36, D55, D56, D58, D60, D61, and D62) are proposed as potential cytotoxic agents against the HeLa cell line based on their predicted IC<sub>50</sub> value and electrostatic features.

**Keywords:** cytotoxic iridoids; SAR; DFT; dipole moment; QSAR; ligand-based design

## 1. Introduction

Cancer is a group of diseases characterized by abnormal cells that grow uncontrollably, and do not recognize cell death signaling [1]. Then, these abnormal cells can invade adjoining tissues and spread to other body organs in a process named metastasis. In 2020, 19 million new cases were diagnosed and 9.9 million deaths by cancer worldwide were reported for men and women, being the second cause of death [2].

Cervical cancer is a malignant neoplastic disease, originating in women's cervixes. It is the fourth cause of incidence and death in women between 0 and 85 years globally, with 604 127 new cases and 341 831 deaths reported in 2020 [2]. Human papillomavirus (HPV) infection is the principal cause of cervical cancer. HPV16 and HPV18 are the two main

high-risk HPVs related to cervical cancer development, and they are present in 70–75% of cervical cancer patient biopsies, with HPV16 the most carcinogenic subtype [3].

Since the actual chemotherapeutic treatments are not selective and, in many cases, cancer cells have developed resistance to them, finding new anti-cancer compounds with desirable selectivity toward cancer cells is crucial nowadays [4].

Vincristine, irinotecan, etoposide, and paclitaxel are plant-derived drugs used to treat cervical cancer clinically, alone, and as neoadjuvant chemotherapy with other chemotherapeutics such as cisplatin [5–9]; natural products are essential molecules since they comprise 50% of anti-tumor drugs [10,11]. Iridoids, a diverse class of secondary metabolites, are present in numerous plant families, with a prevalent occurrence in Apocynaceae, Loganiaceae, Scrophulariaceae, and others [12,13]. Across cultures and civilizations, iridoid-rich plants have been employed for their medicinal properties [12,13].

Structurally, iridoids are atypical monoterpenoids and are generally described as cyclopentane [C]-pyran. The cyclopentane is fused to a six-member oxygenated ring, forming the iridoid skeleton as a bicycle system [14,15]. The cyclopentane is fused to a six-member oxygenated ring, forming the iridoid skeleton as a bicycle system [14]. Over 2500 known iridoids are derived from nature, distinguished by the iridoid skeleton's type and number of substituents [15]. The present work is related to two principal groups: simple iridoids and iridoid glycosides. Simple iridoids are iridoids that have a simple modification of the cyclopentane ring, and such modifications could be hydroxyl, acyloxy, keto, epoxy, chlorine, and olefins. Iridoid glycosides comprise a cyclopentane ring linked to a dihydropyran ring, with a sugar moiety commonly in R1; mainly, they are  $\beta$ -D-glucosides, and could have many different substituents in the sugar moiety such as coumaroyl, feruloyl, caffeoyl, and cinnamoyl groups [13] (Figure S1). Iridoid glycosides are sources of lead molecules as they share high modifiability and rapid absorption [12].

Iridoids have demonstrated significant bioactivity, with a growing body of research suggesting their potential in the prevention and treatment of cancer [12,16,17]. These compounds exhibit a range of pharmacological effects, including anti-inflammatory, antioxidant, and anti-proliferative activities, making them intriguing candidates for anticancer interventions. Studies have delved into the specific mechanisms through which iridoids exert their anticancer effects. In vitro studies about Geniposide and Genipin as potential compounds against different types of cancer cells have been reported [18–25]. Iridoids appear to target various hallmarks of cancer; these include inhibiting uncontrolled cell growth, promoting apoptosis, and impeding angiogenesis. The ability of iridoids to modulate multiple pathways involved in cancer development and progression makes them attractive candidates for further investigation [17]. The exploration of iridoids as anticancer agents represents a dynamic and evolving field within cancer research. While challenges exist, the multifaceted pharmacological activities of iridoids make them promising candidates for further investigation and potential development into novel cancer therapeutics.

Molecular similarity analysis is important in drug discovery because it helps to identify new drug candidates based on the structural and/or functional similarity of other drugs [26]. Moreover, ligand-based drug design is a method that combines mathematical modeling, and the physicochemical and structural properties, of a variety of biologically active chemical structures, to find the key elements that trigger their biological activity. This information is employed for the discovery of new structurally different drug candidates or for the optimization of lead compounds. Quantitative structure activity relationships (QSAR) in cancer are a powerful tool that considers strict statistical parameters to generate an equation or an algorithm that describes the relationship between the biological activity and one or more properties of the compounds [27].

The aim of the present work was to evaluate Geniposide and Genipin against different cervical cancer cells. From the obtained results, a molecular similarity analysis was undertaken using several active iridoids to explain the biological activity of Geniposide and Genipin. This molecular similarity analysis was undertaken by comparing the electronic properties (molecular potential maps and dipole moment) of all the iridoids. We found

that the dipole moment is crucial for the biological activity of simple iridoids. Finally, after generating a QSAR model, we carried out a ligand-based drug design of new simple iridoids with potential cytotoxic activity.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. In Vitro Cytotoxic Activity of Geniposide and Genipin

Table 1 shows the IC<sub>50</sub> values of Geniposide and Genipin in three cervical cancer cell lines. Geniposide exhibited no activity in these cell lines. Genipin exerted a similar effect in the CaSki and CaLo cell lines and exhibited less potency in the INBL cell line. Although these cancer cell lines are from the cervix, they exhibit different molecular characteristics. CaSki is associated with HPV16 and derived from metastasis, while both CaLo and INBL are associated with HPV18. However, CaLo represents an early stage (stage IIB), while INBL represents a metastatic stage (stage IVB) according to the FIGO classification [28]. This suggests that Genipin could potentially affect cervical cancer cells from both high-risk HPV types (16 and 18) and from different stages of the disease.

**Table 1.** Cytotoxic activity of Geniposide and Genipin in cervical cancer cell lines (IC<sub>50</sub>: μM).

Cell Lines	Geniposide	Genipin	Cisplatin	Podophyllotoxin
CaSki	>1000	65.930 ± 4.420	0.640 ± 0.080	0.025 ± 0.001
CaLo	>1000	58.970 ± 9.040	0.240 ± 0.020	0.014 ± 0.002
INBL	>1000	178.800 ± 12.990	1.340 ± 0.160	0.011 ± 0.001
HaCaT <sup>1</sup>	>1000	106.250 ± 9.290	1.150 ± 0.140	0.050 ± 0.006

<sup>1</sup> HaCaT is a non-tumorigenic cell line of immortalized keratinocytes and was used as control.

In the literature, there is a vast number of glycosylated iridoids against various types of cancer in vitro. However, in this study, Geniposide did not exert any cytotoxic effects in any of the cell lines tested. On the contrary, Genipin emerged as an active compound against all the tested cell lines. Similar findings regarding the effects of Geniposide and its aglycone, Genipin, have been reported in relation to other types of cancer cell lines: *MCF-7 breast*, *HT-29 colon*, *K562 leukemia*, *U251 glioma*, *786-0 renal*, and *PC-3 prostate* [29]. Some iridoid glycosides do not inherently possess antiproliferative activity; instead, they exhibit effects on human cancer cells once they undergo hydrolysis [30]. Our objective was to investigate the relationship between the chemical structure, molecular features, and the cytotoxic activity of both iridoids.

### 2.2. Cytotoxic Iridoids Assessed against the HeLa Cell Line

To understand the lack of activity of Geniposide and the low activity of Genipin, both of which were tested against cervical cancer cells, we conducted a search for reported iridoids with cytotoxic effects against cervical cancer in vitro. We identified forty-four iridoids (Figure S2), primarily evaluated in cervical cancer cell lines, including HeLa, KB-3-1, and HeLa-S3, with exposure times of 24, 48, and 72 h [31–43]. Table 2 lists the 13 iridoids that were selected because they were assessed in the same cell line (HeLa) and for the same treatment duration (48 h). Additionally, these iridoids exhibited structural similarities to Geniposide and Genipin, with minor variations in their substituents over the core of the iridoid skeleton; iridoids with greater modification on the sugar core were not considered.

**Table 2.** Cytotoxic iridoids against cervical cancer HeLa cells.

Compound	Cell Line	Exposure Time (h)	IC <sub>50</sub> (μM)
Euphrasin <sup>1</sup>	HeLa	48	0.20
Campsinol <sup>1</sup>	HeLa	48	1.90
Artseleinen B <sup>1</sup>	HeLa	48	12.30
Artseleinen A <sup>1</sup>	HeLa	48	13.80

**Table 2.** *Cont.*

Compound	Cell Line	Exposure Time (h)	IC <sub>50</sub> (μM)
Pulchelloside I <sup>2</sup>	HeLa	48	25.22
Catalpol <sup>3</sup>	HeLa	48	28.20
Lamiide <sup>2</sup>	HeLa	48	31.96
Spinomannoside <sup>2</sup>	HeLa	48	38.89
5-deoxypulchelloside I <sup>2</sup>	HeLa	48	42.47
Geniposidic acid <sup>4</sup>	HeLa	48	43.60
10- <i>O</i> -( <i>E</i> )- <i>p</i> -coumaroylgeniposidic acid <sup>3</sup>	HeLa	48	48.10
Genipin	HeLa	48	419.00 <sup>5</sup>
Geniposide	HeLa	48	NA <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Compounds from [31]; <sup>2</sup> compounds from [39]; <sup>3</sup> compounds from [32]; <sup>4</sup> compounds from [33]; <sup>5</sup> experimental data. NA: not active.

As there was no reported cytotoxic activity of Geniposide and Genipin against the HeLa cell line in the literature, as indicated by its IC<sub>50</sub> at 48 h [34], we conducted our own test using the MTS method. The IC<sub>50</sub> for Genipin at this time of treatment was found to be 419 ± 27.25 μM, with paclitaxel used as the positive control (IC<sub>50</sub>: 15.8 ± 0.67 nM).

The structures of the 13 iridoids listed in Table 2 are depicted in Figure 1. Among these, five iridoids are simple (non-glycosylated, including Genipin), and eight iridoids are glycosylated (including Geniposide). All these iridoids were tested against the HeLa cell line under the same treatment condition of 48 h. The chemical structures of these iridoids typically featured substituents such as: methyl, hydroxyl, hydroxymethyl, ester, acid, aldehyde, and glucose. In some specific cases, mannose, epoxy, and *p*-coumaroyl substituents were also present. The iridoid skeleton (as shown in Figure S1) in certain instances exhibited a double bond between C7 and C8, like Genipin and geniposide.

Subsequently, to obtain more precise geometry and energy values of the molecules, a reoptimization process was undertaken using the density functional theory (DFT) approach. The objective was to analyze the structure–activity relationship of the iridoids (Figure 1) based on their electronic distribution and derived properties (polarizability, hardness, molecular electrostatic potential, and dipole moment).

### 2.3. Structural and Molecular Analysis of Genipin and Other Simple Iridoids

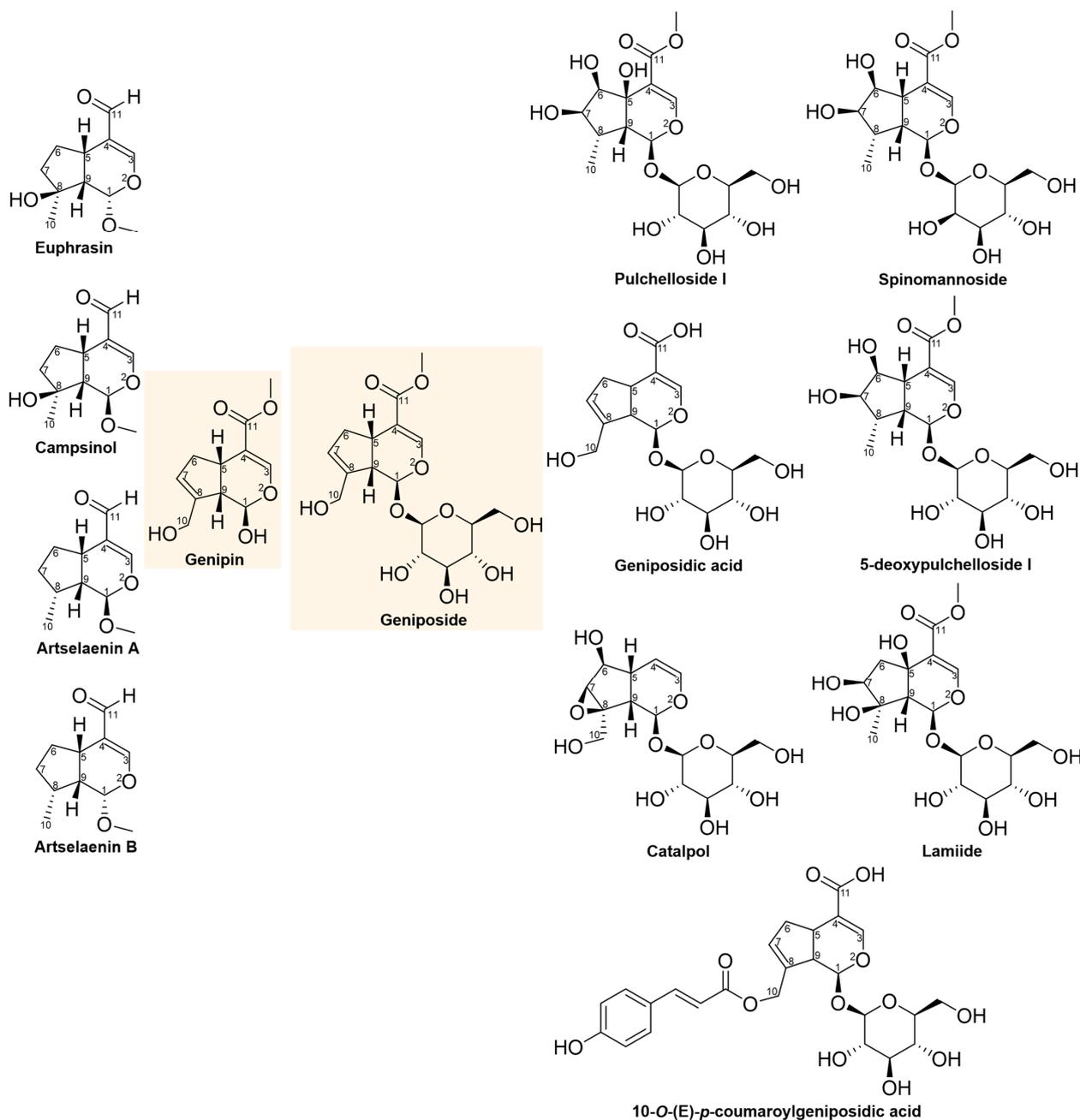
As an initial step, Euphrasin, Campsinol, Artselaenin A, and Artselaenin B [31] were compared in terms of their structure, activity, and molecular descriptors against Genipin. Table 3 presents the IC<sub>50</sub> experimental values, and molecular descriptors calculated with Spartan'20, for the lowest-energy conformer of each simple iridoid, such as dipole moment, area, volume, polar surface area (PSA), ovality, LogP, polarizability, and the number of hydrogen bond donors (HBD) and acceptors (HBA). The first four simple iridoids demonstrated the highest potency, with their IC<sub>50</sub> values being less than 14 μM, compared to Genipin. Genipin, in contrast, was 30- to 2000-fold less active. Artselaenin A had a GAP<sub>HOMO-LUMO</sub> value more like that of Genipin. However, they differ in terms of polarity, as evidenced by the polar surface area values. Genipin had a higher value for this descriptor (64.589 Å<sup>2</sup>) compared to the others (ranging from 26.808 to 46.922 Å<sup>2</sup>).

**Table 3.** Molecular descriptors of simple iridoids with reported cytotoxic activity (IC<sub>50</sub>) against the HeLa cell line.

Ligand	IC <sub>50</sub> (μM)	GAP <sub>HOMO-LUMO</sub> (kcal)	Dipole moment (debye)	Area (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	Ovality	LogP	Polarizability	HBD Count	HBA Count
Euphrasin	0.20	−123.01	4.81	234.27	216.65	44.645	1.34	−0.10	57.69	1	4
Campsinol	1.90	−122.30	5.78	236.86	216.59	46.922	1.36	−0.10	57.69	1	4
Artselaenin B	12.3	−125.40	4.67	227.13	208.64	26.808	1.34	1.11	57.01	0	3
Artselaenin A	13.8	−121.90	4.20	228.14	209.46	27.236	1.34	1.11	57.11	0	3
Genipin	419.00	−126.18	1.26	239.61	219.74	64.589	1.36	−0.26	57.91	2	5

The dipole moment of the remaining simple iridoids was higher, ranging from 4.2 to 5.78 debye, compared to Genipin, which exhibited a lower dipole moment of 1.26 debye.

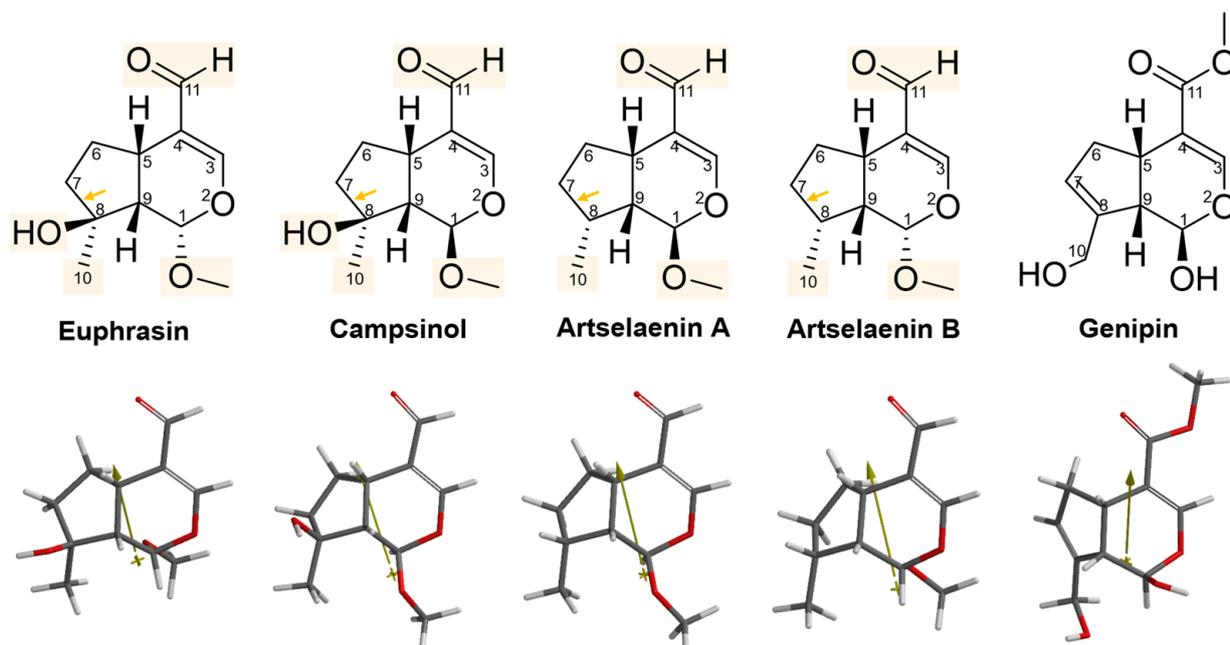
The dipole moment is a measure of the polarity of a molecule, established when there is an unequal distribution of electrons due to differences in electronegativity within the molecule. Consequently, the degree of electron distribution inequality is greater in simple iridoids than in Genipin, which appears to favor their biological activity. Additionally, Euphrasin and Campsinol exhibited hydrophilic properties like those of Genipin, while Artselaenin A and B displayed greater hydrophobicity than the others. Genipin also featured more HBD and HBA. The first iridoids closely resembled Genipin in terms of size (area and volume) and shape, as evidenced by their ovality values (ranging from 1.34 to 1.36). Furthermore, they shared similar polarizability values (ranging from 57.01 to 57.91).



**Figure 1.** Chemical structures of iridoids tested against the HeLa cell line; Genipin and Geniposide are the central iridoids in this study marked in yellow color.

The 2D and 3D structures of simple iridoids are presented in Figure 2. Genipin has several structural differences compared to the other simple iridoids: it has a carbomethoxy

group at C11, while the others have an aldehyde group. It has a double bond between C7 and C8 and the others lack this structural feature. In addition, it has a hydroxyl group at C10 instead of a hydroxyl group at C8. Genipin presents a free hydroxyl at C1, while in the other iridoids there is a methoxy group. Furthermore, the dipole angle in Genipin differs from that of Euphrasin, Campsinol, Artselaenin A, and Artselaenin B (Figure 2).

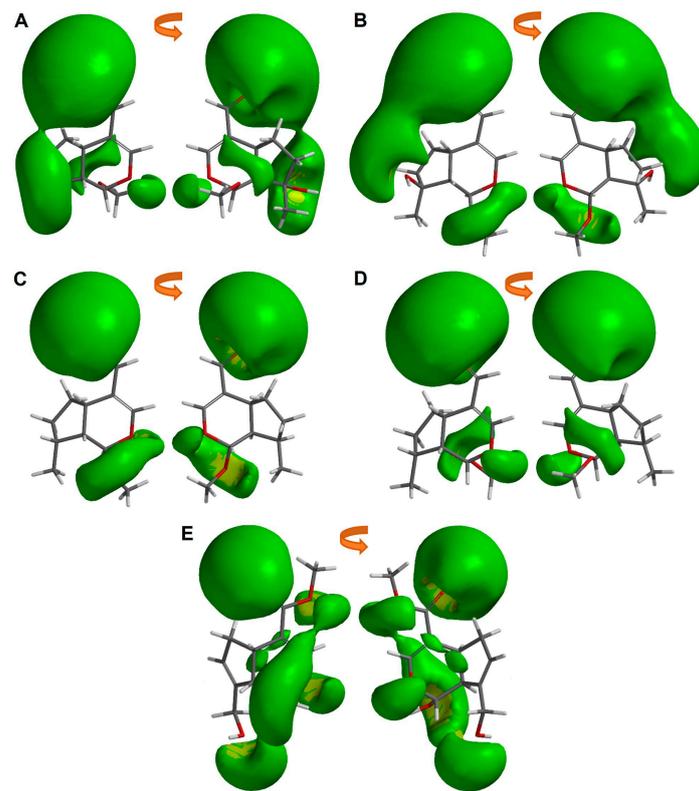


**Figure 2.** The 2D and 3D structures of simple iridoids including Genipin. The yellow rectangles indicate the change or addition of some substituents with respect to Genipin, the arrows indicate the lack of the double bond in cyclopentane respect to Genipin. The dipole vector is shown as a gold arrow over the 3D structures.

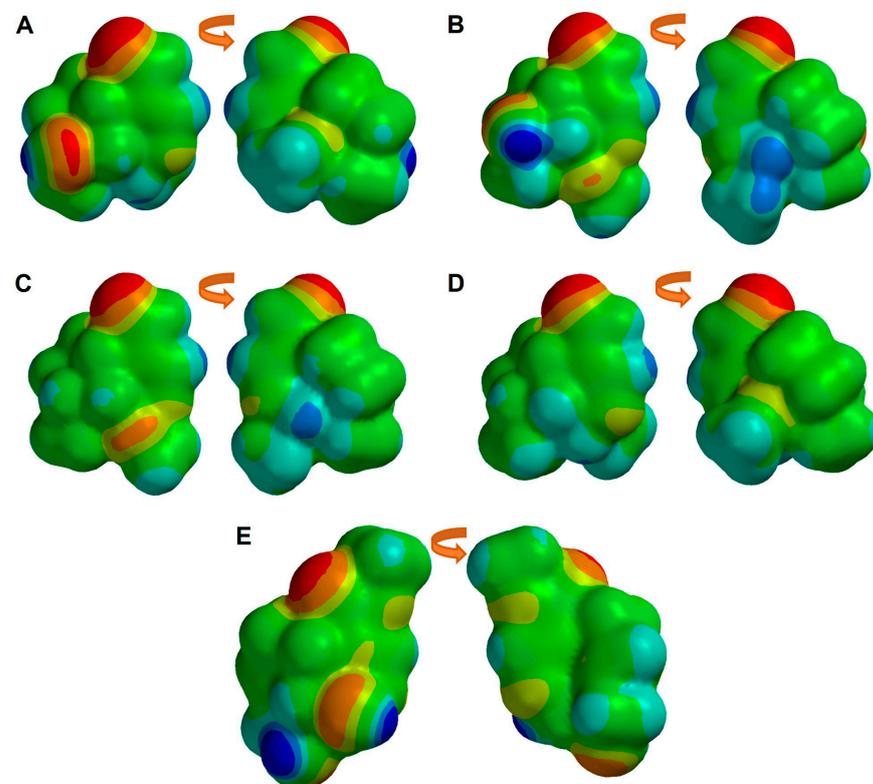
After analyzing the dipole orientation and magnitude, our interest turned to the electrostatic potential distribution of each iridoid. For that reason, an iso-surface of  $-10$  kcal/mol value of MEP was obtained (see Figure 3). It is noteworthy that the most cytotoxic iridoids (Figure 3A,B) exhibit a higher electrostatic distribution in the aldehydic substituent at C4, which also features a hydroxyl at C8. Genipin, on the other hand, shows a divided electrostatic distribution on its substituent in C4 (partially over the  $sp^2$  and  $sp^3$  oxygens) and a greater electrostatic distribution in the pyran ring, along with the hydroxyl at C1 and C10. These observations revealed specific regions where the simple iridoids could interact with positively charged species at an energy level of  $-10$  kcal/mol. The higher electron density over the aldehydic group and the hydroxyl group in C8 allows a better interaction with the possible target of these iridoids.

Then, the MEP map was obtained (Figure 4), indicating the regions more susceptible to an electrophilic attack (yellow to red color) and those more susceptible to a nucleophilic attack (blue color). The regions with more electronic density are located at the oxygen of the aldehydic group at C4, and the oxygen of the hydroxyl at C8. In the case of Genipin, these zones of higher electron density also correspond to the  $sp^2$  and  $sp^3$  oxygens, the oxygen of the hydroxyl at C1, and the oxygen of the hydroxyl at C10, correlating with our earlier observations regarding molecular electrostatic distributions.

These molecular descriptors and structural features affect the reactivity of the simple iridoids, particularly the substituent at C4 (aldehyde or ester), added to the forward hydroxyl at C8. Now, we are interested in studying the physicochemical differences between the conformer of lower energy of Geniposide and Genipin.



**Figure 3.** Molecular electrostatic potential iso-surface of  $-10$  kcal/mol of simple iridoids. (A) Euphrasin, (B) Campsinol, (C) Artselaenin A, (D) Artselaenin B, (E) Genipin.



**Figure 4.** Molecular electrostatic potential map of simple iridoids: (A) Euphrasin, (B) Campsinol, (C) Artselaenin A, (D) Artselaenin B, (E) Genipin. Zero, negative, and positive values of MEP are depicted as green, red, and blue colored regions, respectively.

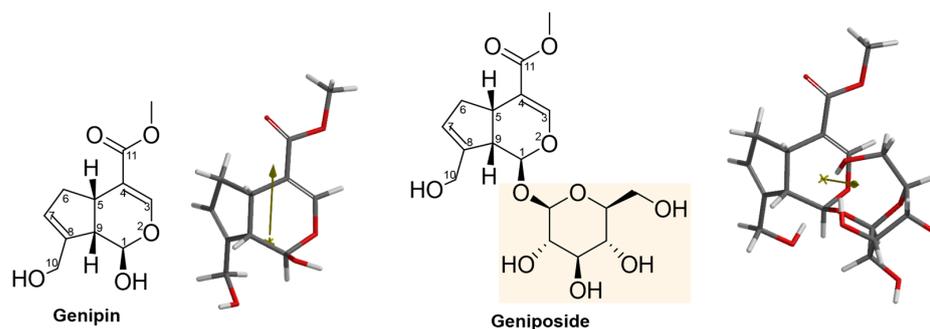
#### 2.4. Structural and Molecular Analysis of Genipin and Geniposide

Genipin and Geniposide descriptors are presented in Table 4. Geniposide was inactive against cervical cancer cells, but Genipin was cytotoxic against the HeLa cell line. Both iridoids differ in the  $GAP_{HOMO-LUMO}$ , LogP, and dipole moment. Due to the presence of a glucose unit in Geniposide, the size and the volume increased considerably compared to the Genipin 132 and 136 units, respectively. Also, the molecular shape is different between them, as we can see from the ovality parameter (1.36 for Genipin and 1.53 for Geniposide). The polarity of Geniposide was 2.5-fold higher than Genipin, based on the molecular charge and the polar surface area.

**Table 4.** Molecular descriptors of simple iridoids with reported cytotoxic activity against the HeLa cell line.

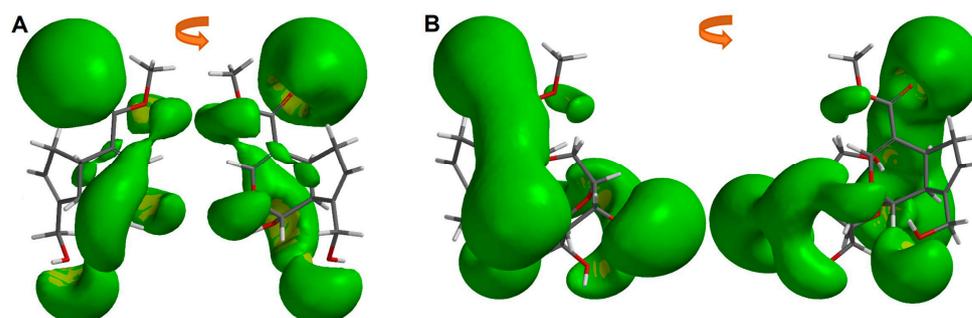
Ligand	IC <sub>50</sub> (μM)	GAP <sub>HOMO-LUMO</sub> (kcal)	Dipole Moment (debye)	Area (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	Ovality	LogP	Polarizability	HBD Count	HBA Count
Genipin	419.00	-126.18	1.26	239.61	219.74	64.589	1.36	-0.26	57.91	2	5
Geniposide	NA	-128.37	3.41	371.47	355.38	119.843	1.53	-2.00	68.89	5	9

Moreover, the Genipin and Geniposide 2D and 3D structures are displayed in Figure 5. The only structural difference between them is the glucose moiety at C1. We can observe the contrary direction of the vector dipole, that in Genipin is directed to the carbonyl at C11, and in Geniposide is directed to the glucose moiety, specifically to two hydroxyl groups in the sugar.



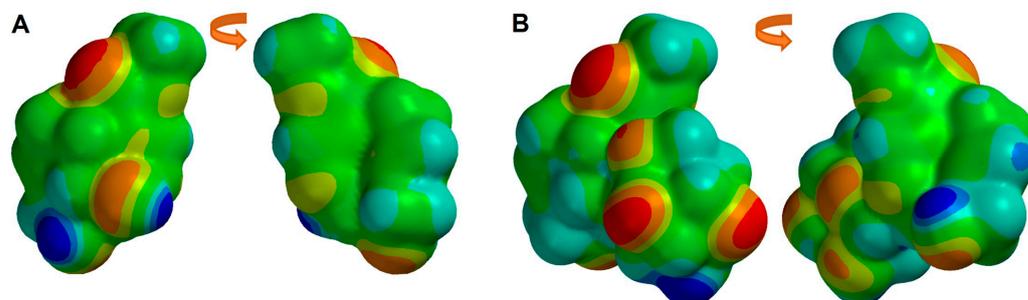
**Figure 5.** The 2D and 3D structures of Genipin and Geniposide. Yellow rectangle indicates the addition of the glucose with respect to Genipin. The dipole vector is shown as a gold arrow over the 3D structures.

After analyzing the dipole orientation and magnitude, we obtained the molecular electrostatic potential iso-surface of  $-10$  kcal/mol showing the electrostatic profile of both iridoids (Figure 6). A higher electronic distribution in the carbonyl at C11 until the 3' and 6' hydroxyls of the sugar is observed in Geniposide, while in Genipin a different pattern is presented. In these green zones, intermolecular interactions could take place, such as hydrogen bonds or electrostatic interactions with a positively charged group.



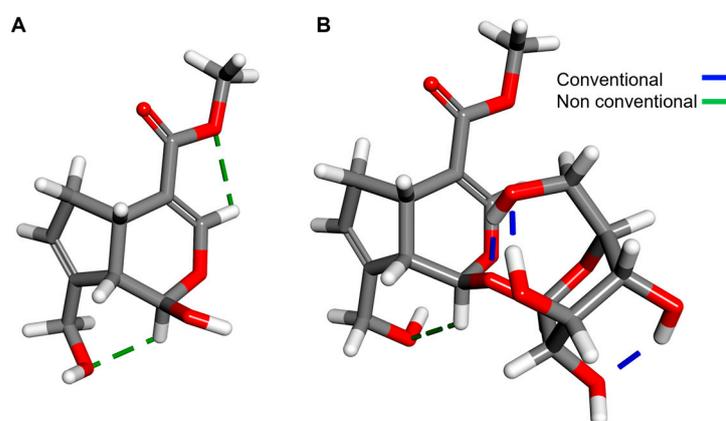
**Figure 6.** Molecular electrostatic potential iso-surface of  $-10$  kcal/mol of (A) Genipin, (B) Geniposide.

The regions with more electron density of both iridoids are displayed in Figure 7. In Geniposide, these regions are located mainly at the oxygen of the carbonyl at C11, the oxygen of the hydroxyl at C10, and the 3', 4', and 6' hydroxyls in the sugar. In Genipin these zones of more electron density also correspond to the carbonyl at C11, the sp<sup>3</sup> oxygen of the ester at C11, the oxygen of the hydroxyl at C1, and the hydroxyl at C10.



**Figure 7.** Molecular electrostatic potential map of (A) Genipin, (B) Geniposide. Zero, negative, and positive values of MEP are depicted as green, red, and blue colored regions, respectively.

Finally, intramolecular hydrogen bonds are observed in Figure 8. These intramolecular interactions were displayed and obtained with the Discovery Studio 2021 software [44]. In Genipin, two non-conventional hydrogen bonds are present, while in Geniposide there is one non-conventional and three conventional hydrogen bonds. Sugar conformation in Geniposide causes the formation of these types of strong interactions that confer stability to the iridoid.



**Figure 8.** Intramolecular H bonds in (A) Genipin, (B) Geniposide.

The increased polarity of Geniposide due to the incorporation of the glucose in C1, and the distribution of this molecular charge, impact on the electronic distribution, and finally on the inactivity of the iridoid, unlike Genipin. Now, our interest is turned to comparing the physicochemical differences between Geniposide and active iridoid glycosides.

### 2.5. Structural and Molecular Analysis of Geniposide and Other Iridoid Glycosides

In Table 5 are listed some descriptors related to the reactivity, solubility, shape, and size of active iridoid glycosides and Geniposide. The iridoid glycosides Pulchelloside I, Catalpol, Lamiide, Spinomannoside, 5-deoxypulchelloside I, geniposidic acid, and 10-O-(E)-p-coumaroylgeniposidic acid have a similar cytotoxic activity against the HeLa cell line (25.22–48.10  $\mu$ M). However, compared to the inactive Geniposide, all of them are different in size, and in HBD and HBA. Conversely, Geniposide was similar in form, as given by the ovality parameter, and in the polarizability, but it was quite different in the molecular charge distribution given by the dipole moment, and it was less polar compared to the

rest of the iridoids (less hydrophilic). The anion forms of geniposidic acid and 10-O-(E)-*p*-coumaroylgeniposidic acid were considered since these charged forms exist predominantly at physiologic pH (7.4). The pKa value of the acids are shown in Table S2.

**Table 5.** Calculated molecular descriptor values and experimental biological activity (IC<sub>50</sub>) of iridoid glycosides and Geniposide tested against the HeLa cell line.

Ligand	IC <sub>50</sub> (μM)	GAP <sub>HOMO-LUMO</sub> (kcal)	Dipole Moment (debye)	Area (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	Ovality	LogP	Polarizability	HBD Count	HBA Count
Pulchelloside I	25.22	−121.84	5.95	383.69	372.30	148.544	1.53	−3.30	70.33	7	11
Catalpol	28.20	−144.80	2.50	324.51	320.55	126.832	1.43	−3.24	65.89	6	10
Lamiide	31.96	−116.96	7.99	392.42	373.46	158.057	1.56	−3.48	70.47	7	11
Spinomannoside	38.89	−124.51	4.28	381.33	367.08	140.269	1.54	−2.51	69.87	5	10
5-deoxypulchelloside I	42.47	−125.49	3.32	374.98	365.07	134.805	1.52	−2.51	69.70	6	10
Geniposidic acid *	43.60	−85.84	12.02	353.50	335.17	139.852	1.51	--	67.68	5	10
10-O-(E)- <i>p</i> -coumaroylgeniposidic acid *	48.10	−61.97	16.64	481.01	476.36	147.201	1.63	--	79.38	5	11
Geniposide	NA	−128.37	3.41	371.47	355.38	119.843	1.53	−2.00	68.89	5	9

\* These iridoids were analyzed in their anion form.

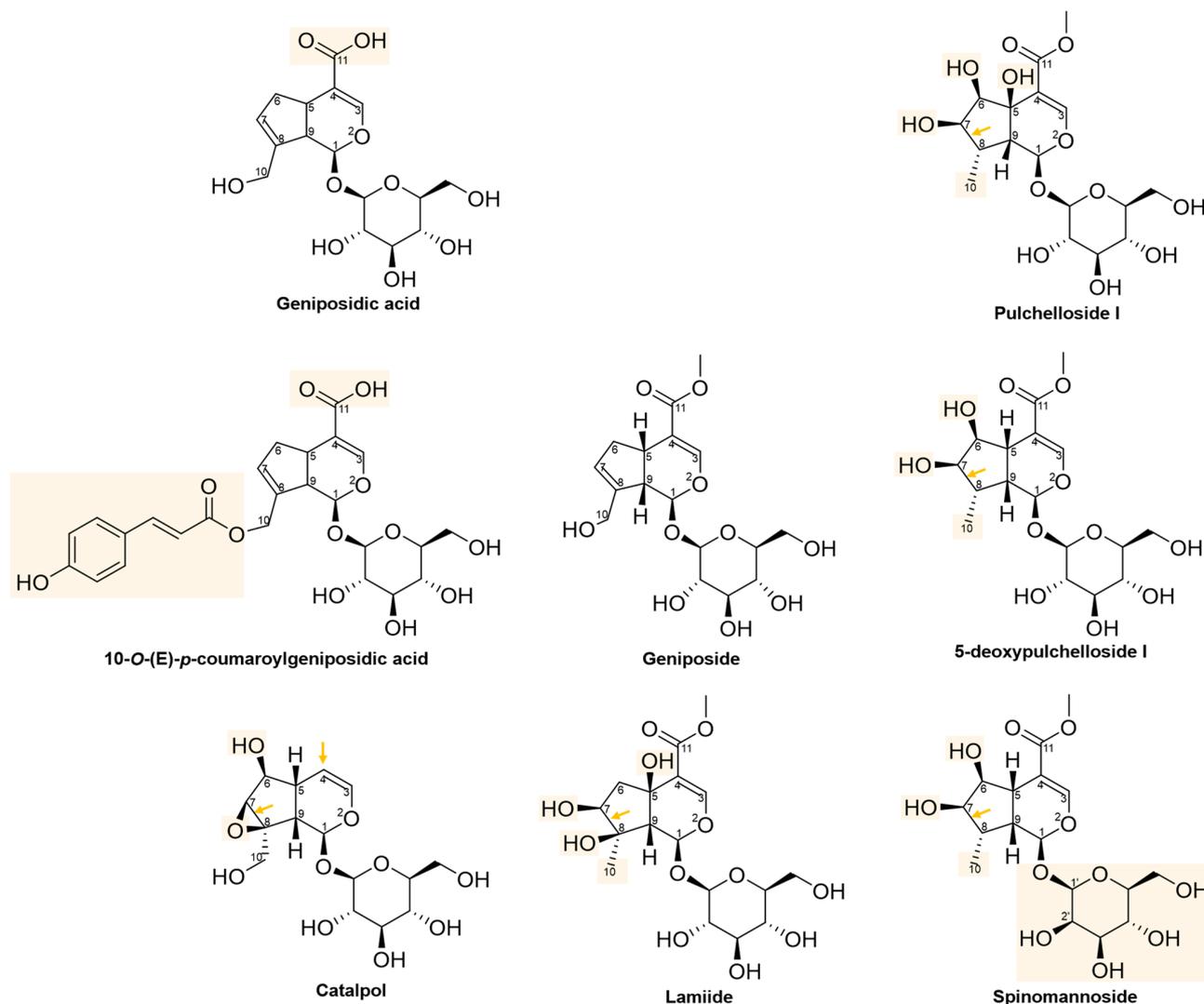
The 2D structures of iridoid glycosides are presented in Figure 9. These iridoids have a glucose moiety at C1, except Spinomannoside, which contains a mannosyl at C1 instead of the glucosyl. The 5-deoxypulchelloside has two extras' hydroxyls at C6 and C7, lacks the double bond in C7–C8, and has a methyl instead of the hydroxymethyl at C8. Pulchelloside I, in addition to these structural differences compared to Geniposide, also presents an extra hydroxyl at C5. Spinomannoside, which is structurally very similar to 5-deoxypulchelloside, contains a mannose at C1 instead of the glucose. Lamiide presents a hydroxyl at C5, C7, and C8, lacks the double bond in C7–C8, and has a methyl instead of the hydroxymethyl at C8. Catalpol presents an epoxy in C7–C8, lacks the double bond in C7–C8, contains a hydroxyl at C6, and lacks the ester at C4 compared to Geniposide. Geniposidic acid has an acid at C4, just like 10-O-(E)-*p*-coumaroylgeniposidic acid (this last one additionally presents a *p*-coumaroyl group at C10), contrary to Geniposide, which presents an ester at C4. These structural changes, compared to Geniposide, seem to confer cytotoxic activity against the HeLa cell line.

The 3D structures of the iridoid glycosides, showing the dipole vector, are displayed in Figure S3. The most similar to Geniposide is Catalpol, although the conformation of the sugar is very different compared to Geniposide. In Pulchelloside I and Spinomannoside, the conformation of the sugar was more like the one displayed in Geniposide. It is noteworthy how the conformation of the iridoids impacted on their size and shape, as is noted in the area, volume, and ovality values. For example, Pulchelloside I and Lamiide, although they have the same number and type of substituents, the conformation of the glucose increased the area in Lamiide (Figure S3).

Moreover, we were interested in visualizing the regions where the intermolecular interactions can occur. For this reason, an iso-surface of −10 kcal/mol value of MEP was obtained (Figure S4). It can be observed that the most cytotoxic glycosylated iridoid (Figure S4f) has a higher electrostatic distribution, principally on the region rich in hydroxyls on the cyclopentane, which are excellent acceptors of hydrogen bonds. This electrostatic distribution is also present on the oxygen of the carbonyl at C11 and is extended until the hydroxyl at C6. In the case of geniposidic acid (Figure S4a), a similar region and electrostatic distribution is present, principally due to the hydroxymethyl at C8. The rest of iridoid glycosides show several and similar electron density regions where the intermolecular interactions could occur.

In addition, we obtained the MEP map of the glycosylated iridoids (Figure S5). The regions with more electron density in Geniposide are located mainly at the oxygen of the carbonyl at C11, the oxygen of the hydroxyl at C10, and the 3', 4', and 6' hydroxyls of the sugar. A greater number of susceptible regions to electrophilic and nucleophilic attacks

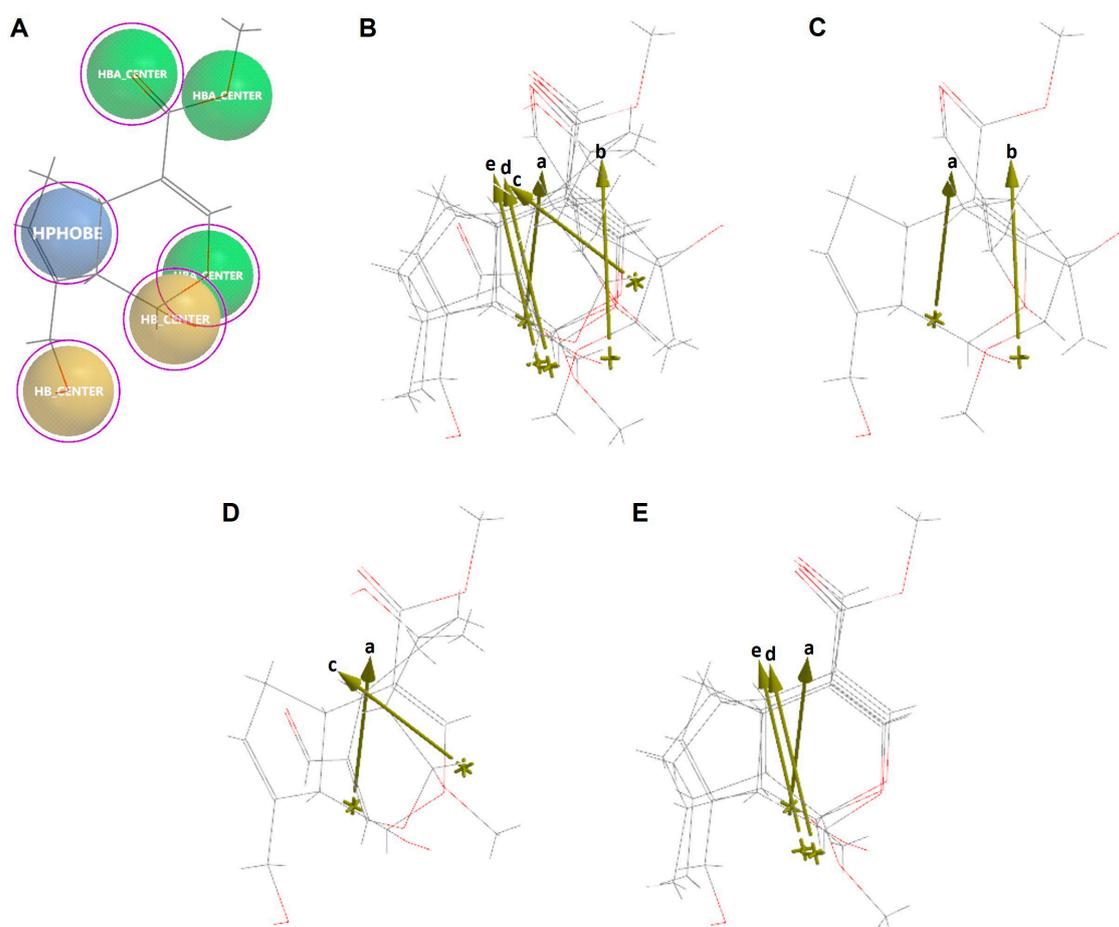
are observed in glycosylated iridoids. Additionally, we performed molecular similarity analysis of the most cytotoxic iridoids and the central iridoids of this study.



**Figure 9.** The 2D chemical structures of iridoid glycosides. The yellow rectangles indicate the change or addition of some substituents with respect to Geniposide, the arrows indicate the lack of the double bond in cyclopentane, and the lack of the substituent at C4 with respect to Geniposide.

## 2.6. Molecular Similarity Analysis of Iridoids

Molecular similarity analysis of the simple iridoids with Genipin was performed based on the chemical function descriptors (CFDs). The alignment and the dipole vector of the five iridoids are presented in Figure 10. Five CFDs were selected in Genipin as they were common with the other four simple iridoids (Euphrasin, Campsinol, Artselaenin A, and Artselaenin B). The most active iridoids, Euphrasin and Campsinol, did not align well with Genipin (Figure 10C,D); their alignment scores were 0.50 and 0.49, respectively. Otherwise, Artselaenin A and Artselaenin B, in which the only difference is the stereochemistry of the methoxy group at C1, had parallel dipole vectors that present a different orientation to the dipole vector of Genipin (Figure 10E); their alignment scores were 0.56 and 0.50, respectively.



**Figure 10.** Alignment of Genipin with simple iridoids Euphrasin, Campsinol, Artselaenin A, and Artselaenin B. (A) Common similarity centers by CFDs of Genipin (purple circles represent the CFDs selected for the alignment). (B) Alignment of Genipin with simple iridoids. (C) Alignment of Artselaenin A with Euphrasin. (D) Alignment of Artselaenin A with Campsinol. (E) Alignment of Artselaenin A with Artselaenin A and Artselaenin B. Dipole vector represented by gold arrows of each iridoid aligned is shown (a: Genipin, b: Euphrasin, c: Campsinol, d: Artselaenin A, e: Artselaenin B).

Additionally, to verify the difference in the chemical natures between Geniposide and its aglycone Genipin, we performed a molecular similarity analysis by the CFD alignment that is shown in Figure S6. Six CFDs were selected in Genipin as they were also common to Geniposide; the alignment score was 0.65. Although Geniposide and Genipin share those selected CFDs, it is evident that there is a difference in their orientation and the direction of the dipole vector, which could explain the lack of biological activity of Geniposide (Figure S6).

### 2.7. Ligand-Based Drug Design of Genipin Derivatives

Afterward, we were interested in designing iridoids based on Genipin's structure. We noticed that the dipole vector correlated with the biological activity of the most cytotoxic iridoids (Table 3). Therefore, we obtained the dimensional components of the dipole vector of these simple iridoids. The Cartesian coordinates of the dipole vector were transformed to polar spherical coordinates and their values are presented in Table 6, where  $\rho$  corresponds to the dipole moment magnitude,  $\theta$  is the angle in the polar coordinates, and  $\varphi$  is the azimuthal angle.

**Table 6.** Magnitude and polar spherical coordinates of the dipole vector of simple active iridoids and their experimental biological activity values ( $IC_{50}$ ).

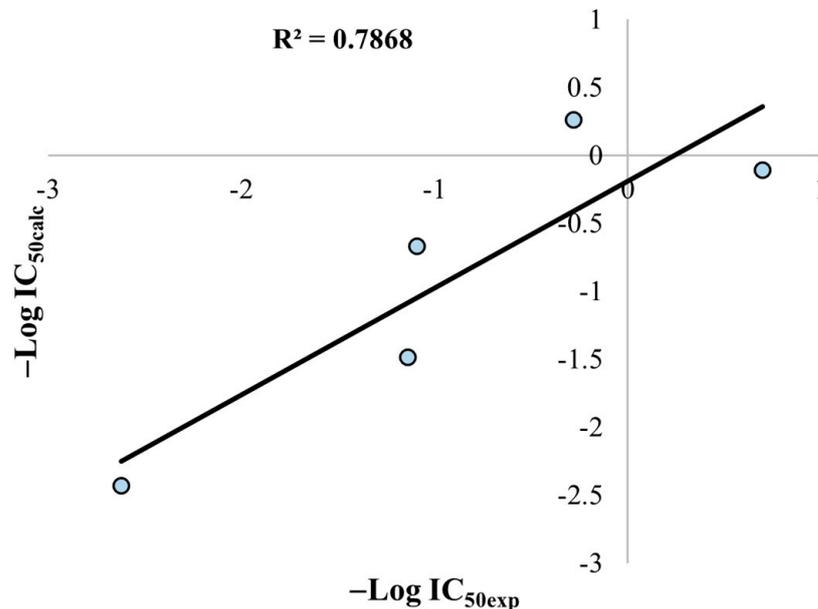
Ligand	$\rho$ (debye)	$\theta$	$\varphi$	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
Euphrasin	4.81	0.8097	1.6749	0.20
Campsinol	5.78	-1.0080	1.3527	1.90
Artselaenin B	4.67	0.9716	1.3933	12.3
Artselaenin A	4.20	-1.3515	1.1341	13.8
Genipin	1.26	1.5078	2.2265	419.00

Derived from this set of data, a multilinear regression analysis considering the azimuthal angle ( $\varphi$ ), the dipole moment magnitude ( $\rho$ ), and the potency of the iridoids ( $-\log IC_{50}$ ), was performed and we obtained a mathematical model that describes the biological activity of simple iridoids:

$$-\log IC_{50} = 1.5425(\varphi) + 0.8941(\rho) - 6.9922 \quad (1)$$

$$R = 0.89; R^2 = 0.79; s = 0.79; F = 3.69; n = 5$$

According to this equation and its statistical parameters, the potency of simple iridoids will increase proportional to the magnitude of the dipole moment and the azimuthal angle  $\varphi$ . Then, we plotted the linear correlation between the calculated and the experimental activity, which is displayed in Figure 11. The squared correlation ( $R^2$ ), which explain the variance of the description model, is shown in the plot. The plot of Figure 11 shows that the mathematical model has an acceptable descriptive ability, considering the limited number of compounds employed for the model.

**Figure 11.** Linear correlation of the calculated activity ( $IC_{50calc}$ ) versus experimental activity ( $IC_{50exp}$ ).

Derived from this analysis we observed that the dipole moment was crucial for the activity of the iridoids, but the model considering the magnitude and the angle  $\varphi$  of the dipole vector was only descriptive, and not predictive for other iridoids. For this reason, we considered all 13 iridoids to perform a QSAR study using molecular descriptors related to the electronic nature of the compounds. QSAR models of a small set of molecules have been successfully employed to help explain their biological activity.

## 2.8. QSAR Analysis

The final QSAR model indicates once again the influence of the dipole moment on the activity of the iridoids, as shown in Equation (2). Moreover, the difference of the polar surface area of the iridoids with respect to Genipin ( $\Delta PSA$ ), the solubility of the iridoids in water ( $\text{LogS}$ ), and the difference in the polarizability of the iridoids with respect to Genipin ( $\Delta \text{Polarizability}$ ) are relevant for the biological activity.

$$-\text{LogIC}_{50} = 0.1118(\rho) - 0.07433(\Delta PSA) + 2.56022(\text{LogS}) + 0.02923(\Delta \text{Polarizability}^2) + 1.26184 \quad (2)$$

$$R = 93.781; R^2 = 87.95; R_{ADJ}^2 = 81.07; s = 0.3563 F = 12.78; n = 13$$

$$R^P = 0.622; R^N = -0.208; Q_{LOO}^2 = 62.33$$

The values of the molecular descriptors considered in the QSAR model are listed in Table 7. In addition, all the experimental values of the cytotoxic activity against the HeLa cell line ( $\text{IC}_{50}$ ) are shown. From Table 7, it can be seen that the most potent iridoids (simple iridoids) have a lower PSA value than Genipin, since its difference ( $\Delta PSA$ ) is negative. This agrees with our QSAR equation since the negative coefficient indicates that increasing the PSA value of the iridoids compared to Genipin will negatively affect its cytotoxic activity against the HeLa cell line. On the contrary, an increase in the solubility or the polarizability of the iridoids will favor the cytotoxic activity of iridoids according to their coefficient positive sign. These descriptors can work as counterweights of each other, specially  $\Delta PSA$  and  $\text{LogS}$ . It is worth mentioning that all the iridoids used for the construction of the QSAR model have a  $\text{LogS}$  negative value, that reflects their hydrophobic nature. This feature affects the positive contributions of the dipole moment and the  $\Delta \text{Polarizability}$ , descriptors related to the electron density distribution over the iridoid framework. Iridoids glycoside have higher values for the dipole moment,  $\Delta PSA$ , and  $\Delta \text{Polarizability}$ . Nevertheless, some of them have a lower  $\text{LogS}$  value than Genipin, and this can be related to their sugar moiety and its ability to form intramolecular hydrogen bonds, making the iridoid glycosides more hydrophobic.

**Table 7.** Values of the molecular descriptors present in the QSAR model and the biological activity ( $\text{IC}_{50}$ ) of simple and glycosylated iridoids.

Ligand	$\rho$ (debye)	$\Delta PSA(\text{\AA}^2)$	$\text{LogS}$	$\Delta \text{Polarizability}^2$	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$
Euphrasin	4.81	−19.944	−1.21	0.048	0.20
Campsinol	5.78	−17.667	−1.21	0.048	1.90
Artselaenin B	4.67	−37.781	−2.23	0.810	12.30
Artselaenin A	4.20	−37.353	−2.23	0.640	13.80
Pulchelloside I	5.95	83.955	−0.50	154.256	25.22
Catalpol	2.50	62.243	−0.19	63.680	28.20
Lamiide	7.99	93.468	−0.69	157.754	31.96
Spinomannoside	4.28	75.680	−0.73	143.042	38.89
5-deoxypulchelloside I	3.32	70.216	−0.73	139.004	42.47
Geniposidic acid <sup>1</sup>	12.02	75.260	−1.22	95.453	43.60
10-O-(E)-p-coumaroylgeniposidic acid <sup>1</sup>	16.64	82.610	−2.86	460.961	48.10
Genipin	1.26	0	−1.50	0	419.00

<sup>1</sup> These iridoids were analyzed in their anion form.

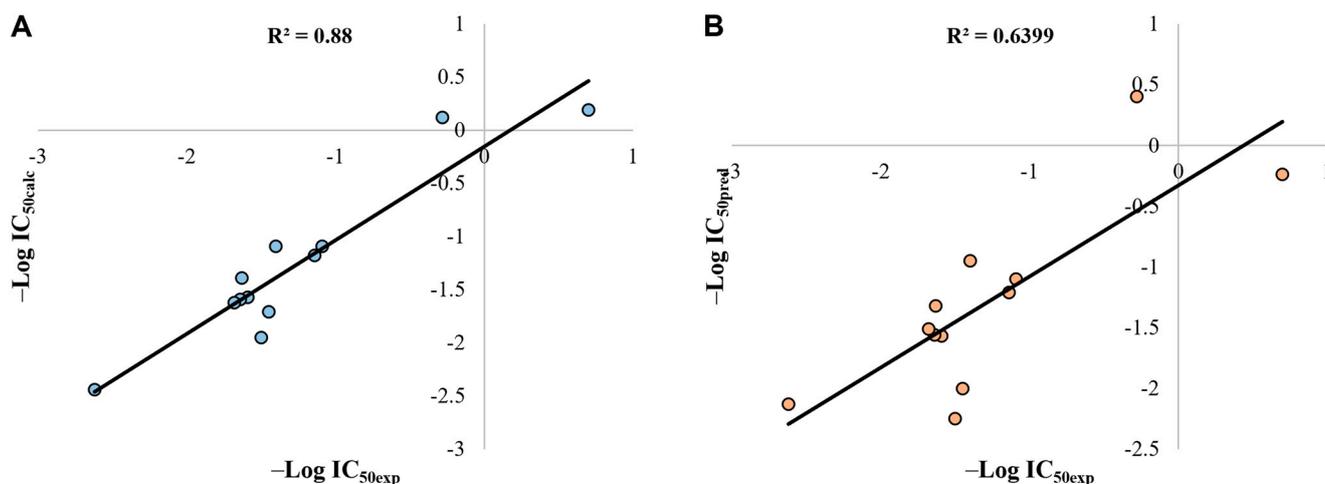
All the experimental biological activities ( $-\text{Log IC}_{50\text{exp}}$  is represented as  $Y_{\text{exp}}$ ), the calculated and predicted biological activities ( $-\text{Log IC}_{50\text{calc}}$  is represented as  $Y_{\text{calc}}$  and  $-\text{Log IC}_{50\text{pred}}$  is represented as  $Y_{\text{pred}}$ ) by the QSAR model, and leverage values ( $\text{Hat}$ ) of iridoids are presented in Table 8. Also, the calculation error and prediction error values that state the differences between  $Y_{\text{exp}}$  and both  $Y_{\text{calc}}$  and  $Y_{\text{pred}}$ , are presented by the  $\text{residual}_{\text{calc}}$  and the  $\text{residual}_{\text{pred}}$  terms, respectively.

**Table 8.** Values of the cytotoxic experimental  $Y_{exp}$ , calculated  $Y_{calc}$ , and predicted  $Y_{pred}$  activities, and residual<sub>calc</sub> and residual<sub>pred</sub> values are shown.

Ligand	$Y_{exp}$	$Y_{calc}$	$Y_{pred}$	Hat	residual <sub>calc</sub>	residual <sub>pred</sub>
Euphrasin	0.70	0.19	−0.24	0.451	−0.51	−0.93
Campsinol	−0.28	0.12	0.40	0.403	0.40	0.68
Artselaenin B	−1.09	−1.09	−1.10	0.389	0	−0.01
Artselaenin A	−1.14	−1.18	−1.21	0.377	−0.04	−0.07
Pulchellose I	−1.40	−1.09	−0.95	0.305	0.32	0.46
Catalpol	−1.45	−1.71	−2.00	0.524	−0.26	−0.55
Lamiide	−1.50	−1.95	−2.25	0.407	−0.44	−0.75
Spinomannoside	−1.59	−1.57	−1.57	0.231	0.02	0.02
5-deoxypulchellose I	−1.63	−1.39	−1.32	0.244	0.24	0.31
Geniposidic acid <sup>1</sup>	−1.64	−1.59	−1.56	0.387	0.05	0.08
10-O-(E)-p-coumaroylgeniposidic acid <sup>1</sup>	−1.68	−1.62	−1.51	0.656	0.06	0.17
Genipin	−2.62	−2.44	−2.13	0.627	0.18	0.49

<sup>1</sup> These iridoids were analyzed in their anion form.

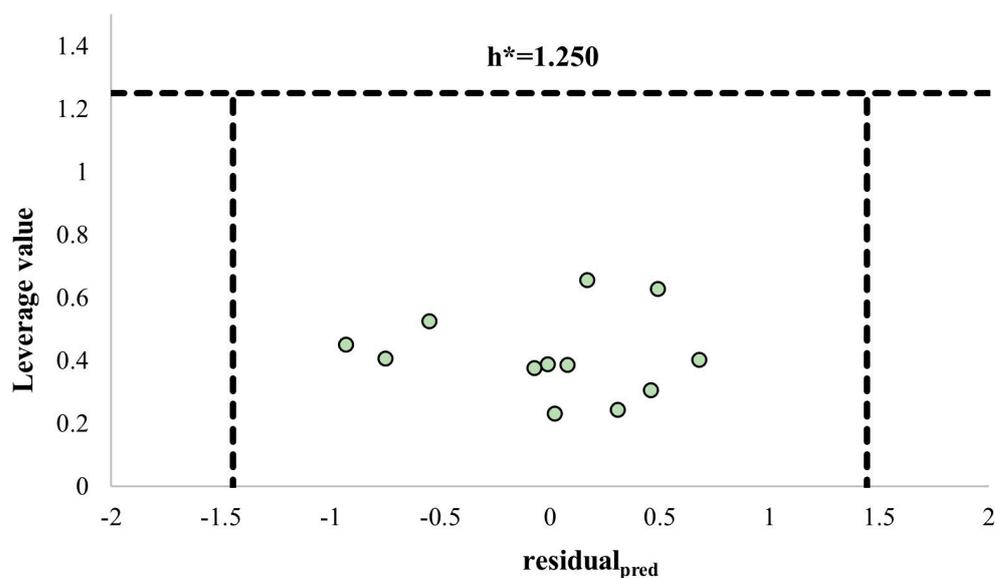
Figure 12 displays the descriptive and predictive ability of the QSAR model, according to the squared regression coefficient ( $R^2$ )—that corresponds to the value of the explained variance in the description and the prediction ( $Q^2$ )—our model has an acceptable ability to predict biological activity. Campsinol and Lamiide were the outliers of the correlation prediction, since the polar surface area of Lamiide was higher than the PSA value for other similar iridoids, and consequently the difference with the PSA of Genipin did not permit a reasonable adjustment.



**Figure 12.** (A) Linear correlation of calculated activity ( $Y_{calc}$ ) versus experimental activity ( $Y_{exp}$ ). (B) Linear correlation of predicted activity ( $Y_{pred}$ ) versus experimental activity ( $Y_{exp}$ ).

William's plot, based on the prediction residuals and the leverage values, was used to define the applicability domain of the model (Figure 13). Structural ( $h > h^*$ ) and response outliers ( $\text{residual}_{pred} > 3\text{SDEP}$ ) can be observed outside the area limited by the three dashed black lines. These lines represent the warning leverage ( $h^*$ , dashed horizontal line), and three times the standard deviation in the prediction error ( $3 \times \text{SDEP}$ , dashed vertical lines). All the iridoids fell within the applicability domain of the model, suggesting the application of the model for predicting the cytotoxic activity of new iridoids with remarkably high molecular and structural similarity.

Now, we proceed to design iridoids based on the principal structural characteristics of Genipin. As Genipin is an active molecule with low potency, it could be considered as the lead compound in anticancer drug development.



**Figure 13.** The William plot of prediction residuals versus leverage values of iridoids. The horizontal dashed line shows the warning leverage ( $h^* = 3p/n$ ,  $n$  is the number of iridoids, and  $p$  is the number of descriptors in the model plus one), and the two vertical dashed lines indicate the limits within which all residuals should lie ( $3 \times \text{SDEP} = 1.444$ ).

The 2D structures of a set of iridoids based on the structure of Genipin, including some derived from glycosylated iridoids, are shown in Figure 14. The hydroxyl at C1 of Genipin was conserved in these proposed iridoids, due to its crucial role for the cytotoxic activity of Genipin derivatives, as reported by Yang et al. [45] for a pancreatic cancer cell line (Panc-1). Some structural elements of simple active iridoids (Euphrasin, Campsinol, Artselaenin A, and Artselaenin B) were considered. First, we decided to change the functional group of C4, as we saw its effect on simple and glycosylated iridoids in an increased biological activity, following this order: ester (Genipin), carboxylic acid (D1), and aldehyde (D2). We also considered primary amide (D21–D23) and ketone (D24–D26) as substituents of C4. Then, we evaluated the effect of the lack of the double bond in C7–C8 in the biological activity, plus the effect of the functional group present in C4, with both stereoisomers of the hydroxymethyl at C8 (see Figure 14). We also evaluated the introduction of fluorine in position 3 of the iridoid skeleton in three cases. For those Genipin derivatives we also modified the substituent of C10, represented by  $R_1$ . These Genipin derivatives are comprised from D1–D8, and D12–D26. The rest of the iridoids were based on the simple iridoids reported in the literature, some present in iridoid biosynthetic pathways [46,47], such as 7-deoxyloganetic alcohol (D27, also named 7-deoxyloganetol), 7-deoxyloganetic aldehyde (D28, also named iridotrial), 7-deoxyloganetic acid (D29), and 7-deoxyloganetin (D30). These iridoids include D9–D11, D27–D59, D63–D90, with diverse structural modifications in C4, conserving the carbonyl and adding methyl groups over the cyclopentyl. Finally, we include a third set of three iridoids, which are derived from glycosylated iridoids (D60–D62), that have shown inhibitory activity against Taq DNA polymerase [48].

The molecular descriptors of all the 86 designed iridoids were calculated and are presented in Table S3. We applied the QSAR model for the designed iridoids with these values and predicted the biological activity ( $IC_{50\text{pred}}$ ) for all the compounds. The results for the best candidates are presented in Table 9. Finally, the best results are: 0.053, 0.002, 0.006, 0.011, 0.146, 0.103, 0.011, 0.029, and 0.021  $\mu\text{M}$  for D9, D10, D35, D36, D55, D56, D58, D60, D61, and D62, respectively.

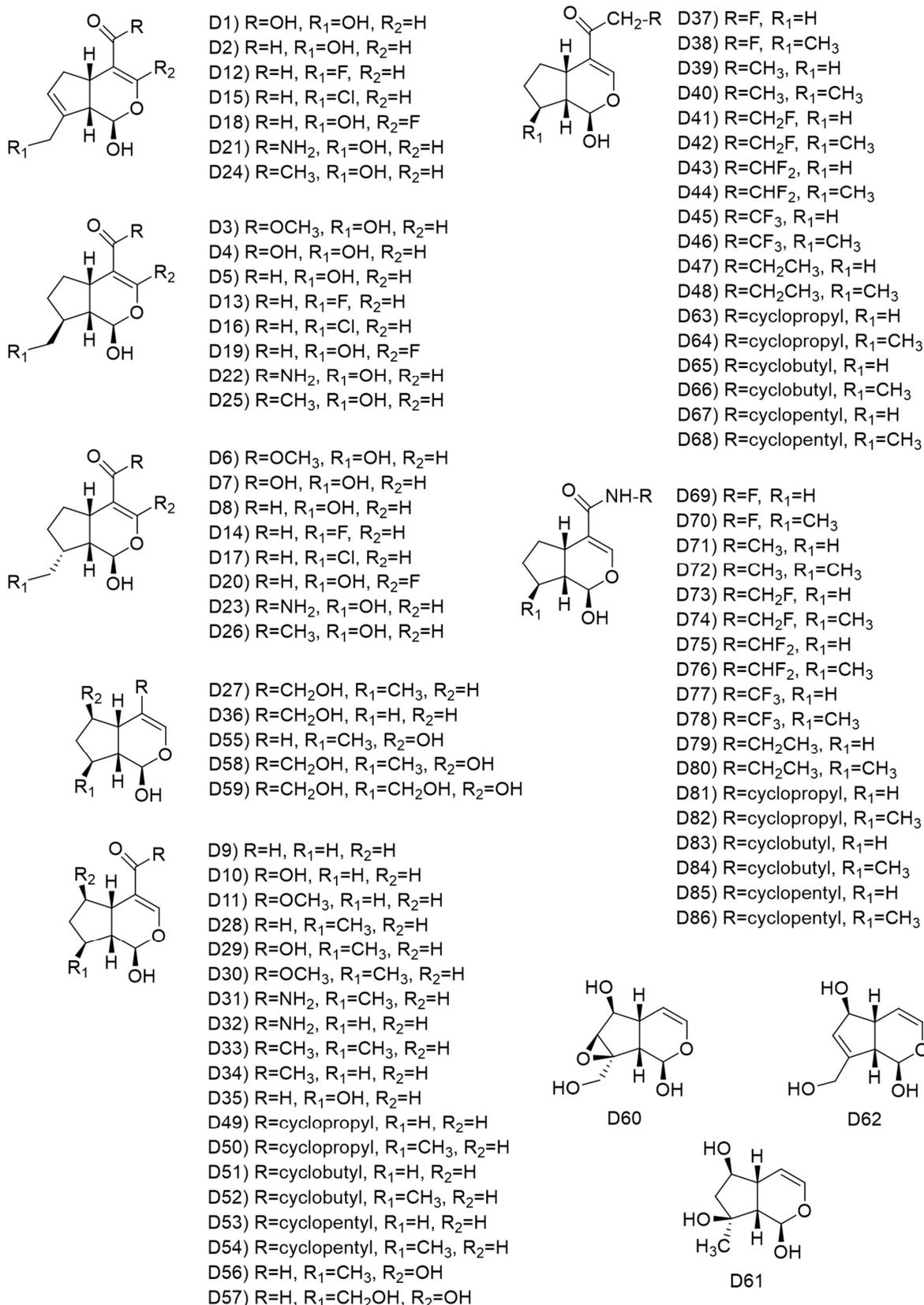


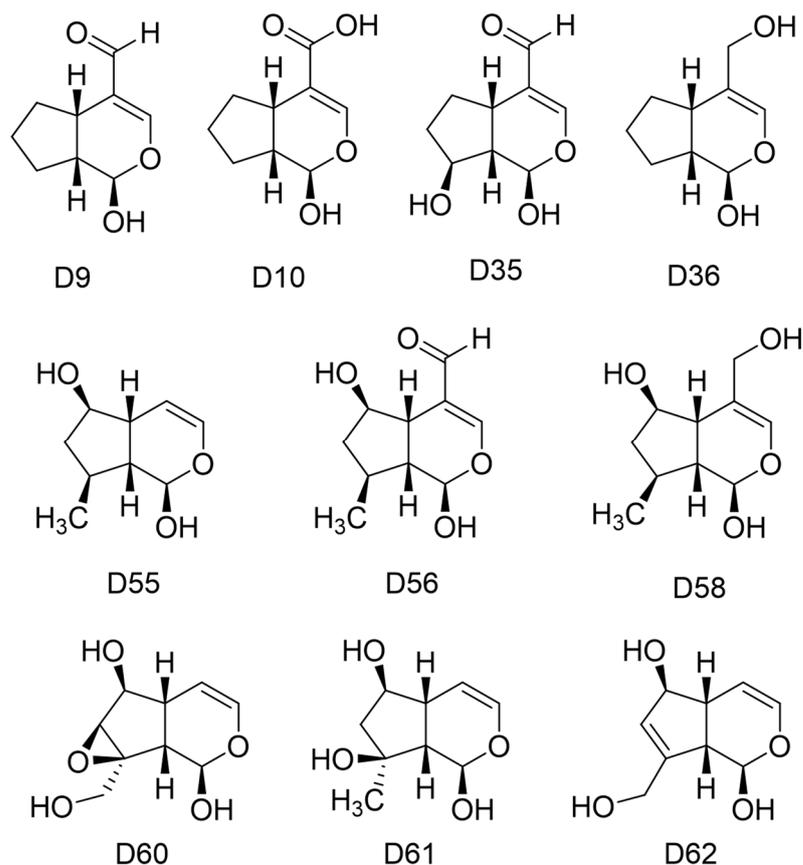
Figure 14. Chemical structures of designed simple iridoids based on Genipin.

**Table 9.** Molecular descriptors of the best designed iridoids.

Ligand	GAP <sub>HOMO-LUMO</sub> (kcal)	Dipole Moment (debye)	Area (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	Ovality	LogP	Polarizability	HBD Count	HBA Count
D9	−123.61	4.80	187.58	170.55	42.052	1.26	0.42	53.94	1	3
D10 <sup>1</sup>	−599.13	12.32	190.51	175.42	54.222	1.26	−	54.14	1	4
D35	−123.99	3.36	197.34	178.62	60.872	1.29	−0.67	54.59	2	4
D36	−138.78	0.69	196.25	176.32	47.478	1.29	0.55	54.25	2	3
D55	−139.52	1.70	196.35	176.4	47.351	1.29	0.61	54.25	2	3
D56	−118.90	4.81	213.74	196.37	57.202	1.31	−0.41	56.08	2	4
D58	−140.01	1.99	219.39	201.1	61.709	1.32	−0.28	56.25	3	4
D60	−144.58	2.30	201.54	184.95	73.770	1.28	−1.50	54.89	3	5
D61	−145.63	3.19	207.72	190.41	80.817	1.30	−1.25	55.33	4	5
D62	−135.25	0.86	196.11	178.97	61.665	1.28	−0.79	54.50	3	4

<sup>1</sup> These iridoids were analyzed in their anion form.

After applying the QSAR model of Equation (2), a set of ten iridoids had a higher predicted biological activity than the experimental activity of Euphrasin (Figure 15),  $IC_{50pred}$  lower than 0.2  $\mu$ M. Most of these designed iridoids had an aldehyde or a hydroxymethyl in C4, but four of them lacked a substituent in this position. Only one of them had an acid in this position D10. All of them conserved the hydroxyl in C1, and others featured a methyl or a hydroxyl in C8, or both, and a hydroxyl in C6. Only two iridoids, D60 and D62, presented an hydroxymethyl in C8, as with Genipin, but D60 had an epoxy group between C7 and C8. D62 was the only iridoid with a double bond in C7–C8, as with Genipin.

**Figure 15.** Chemical structures of the best designed iridoids based on Genipin.

In Table 9, the descriptors of these ten designed ligands are presented. The ligands with an aldehyde in C4 (D9, D35, and D56) had similar GAP<sub>HOMO-LUMO</sub> to Genipin; those having an acid or an hydroxymethyl, or no substituent in C4, had a less negative GAP<sub>HOMO-LUMO</sub>. D9, D10, and D56 had the highest values of dipole moment, but D36 and D62 had lower values of the dipole moment than that of Genipin (see Table 3). D9 and D10 were smaller in

area and volume than the most cytotoxic iridoids. D60, D61, and D62 were more polar than Genipin, and the rest of the iridoids were less polar compounds compared to Genipin, with PSA values in the range 42–61 Å<sup>2</sup>. All the proposed iridoids had a higher affinity for water, except D36 and D55, which present a higher affinity for a lipidic phase, as with Artselaenin A and Artselaenin B. Almost all compounds were *less* polarizable molecules than Genipin and the other simple iridoids presented in Table 3. These iridoids had a variable number of hydrogen bond donors and acceptors, ranging from 1 to 4, and 3 to 5, respectively.

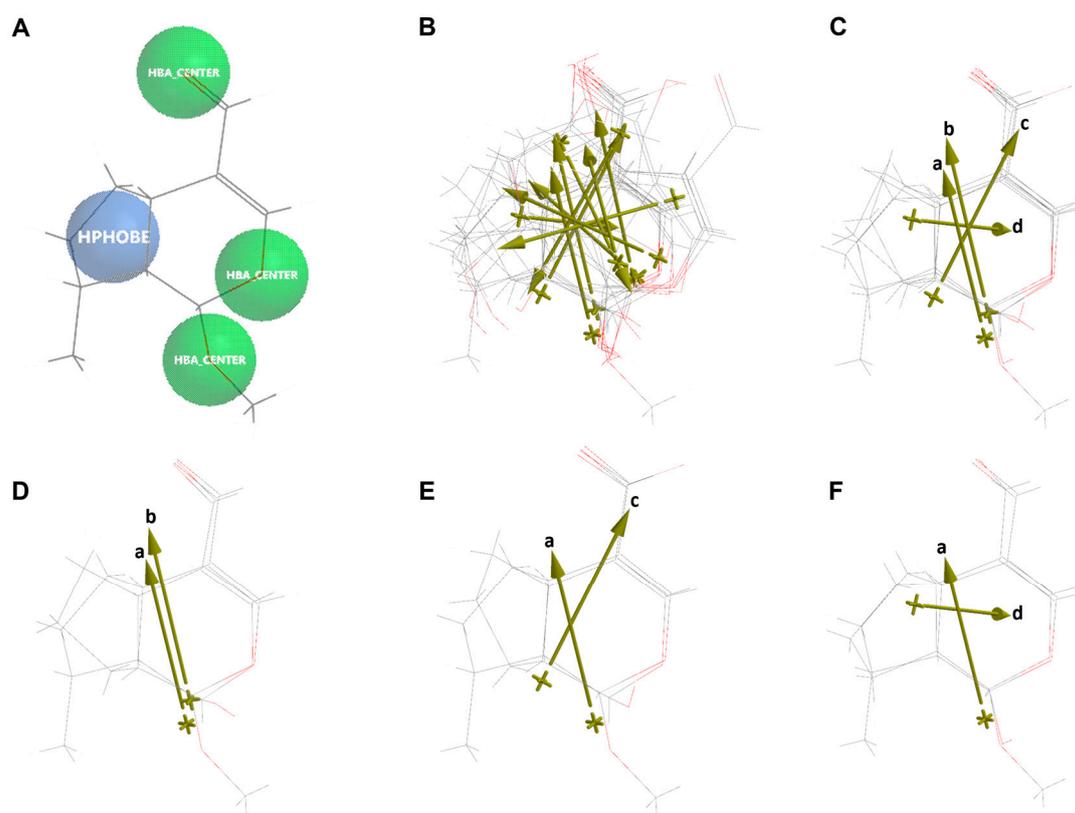
The 3D structures of the *best* designed iridoids based on the structure of Genipin, with their respective dipole vectors, are displayed in Figure S7. Curiously, only D9, D10, D36, and D56 present a dipole vector with a similar direction to the most active simple iridoids (Euphrasin, Campsinol, Artselaenin A, and Artselaenin B); this could be attributed to the aldehyde in C4, that was common to these four designed iridoids. The rest of the iridoids presented a dipole vector with a different orientation. This was influenced by the presence of other substituents in C4, or the lack of anyone.

It is noteworthy that the change of the ester for the carboxylic acid at C4 increased the potency of the iridoid compared to Genipin, but the change of the carboxylic acid by an aldehyde decreased the potency of the iridoid compared to the IC<sub>50</sub><sub>exp</sub> of Genipin. The elimination of the double bond in C7–C8 also increased the potency of the iridoids. In addition to the lack of the double bond in C7–C8 of Genipin, the absence of any substituent in the cyclopentane ring increased the biological activity, and the incorporation of a hydroxyl in C8, or an extra hydroxyl in C6 (D60–D62) increased the potency of the compound. In some cases, the reactivity order of the compound related to the substitutions in C4 is as follows: any > hydroxymethyl > aldehyde (D55, D56, and D58).

Next, the alignment of the three best designed iridoids (D9, D10, D35, D36, D55, D56, D58, D60, D61, and D62) and the most structurally similar active iridoid (Artselaenin A) is shown in Figure 16. All four CFDs were selected since they are in common with the designed iridoids and Artselaenin A. The highest alignment scores were those between the designed iridoids D9, D10, and D36 with Artselaenin A, and their values were 0.78, 0.77, and 0.99, respectively. The best alignment score was obtained with D36, comparing the structure of the iridoid skeleton, but its dipole vector was not parallel to that of Artselaenin A (Figure 16F). The alignment with D9 had a lowest score of 0.78, but the orientation of the dipole vector was parallel to that of Artselaenin A (Figure 16D). These iridoids have not been evaluated against cervical cancer cells to our knowledge.

Finally, we analyzed the MEP graphics of the best candidates of the designed iridoids to evaluate the principal differences and similarities to explain their reactivity. The MEP isosurface of –10 kcal/mol shows the electrostatic profile of the designed iridoids (Figure S8). The increased calculated activity of the designed iridoids could be attributed to the higher electron density over the carboxylic acid or aldehyde at C4, the hydroxyl at C1, and the sp<sup>3</sup> oxygen in the pyran. Also, this higher electron density is observed on the oxygen of the hydroxymethyl in C4, and on the hydroxyls in C6, and C8. This electron density pattern is observed in Artselaenin A, which was the most similar to D9, D35, and D56 (Figure S8A,C,F). D61 and D62 also present a higher electron density over the hydroxymethyl at C8 (Figure S8I,J).

In Figure S9, regions most susceptible to an electrophilic attack (yellow to red color) and those to a nucleophilic attack (blue color) are displayed. In all iridoids the regions with more electronic density are located at the oxygen of the carbonyl at C4, and the oxygen of the hydroxyl at C1, C6, C8, and C10, correlating with the previous MEP distributions. The regions with less electron density were located principally over the hydrogen of the aldehyde at C4, and the other hydrogens of the hydroxyls at C1 and C10, which correlated to the other surface graphics, and were like the regions of the MEP map of Artselaenin A, principally D9, D35, and D56 (this last with an extra electron distribution on the sp<sup>2</sup> oxygen). Iridoids such as D60 and D61 presented a greater electron distribution due to the hydroxyls present on their structures, and in the case of D60, due to the presence of the epoxy group.



**Figure 16.** Alignment of Artselaenin A with the best designed iridoids. (A) Common similarity centers by CFDs of Artselaenin A (purple circles represent the CFDs selected for the alignment). (B) Alignment of Artselaenin A with D9, D10, D35, D36, D55, D56, D58, D60, D61, and D62. (C) Alignment of Artselaenin A with D9, D10, D36. (D) Alignment of Artselaenin A with D9. (E) Alignment of Artselaenin A with D10. (F) Alignment of Artselaenin A with D36. Dipole vector represented by gold arrows for each iridoid aligned is shown (a: Artselaenin A, b: D9, c: D10, d: D36).

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. *In Vitro* Cytotoxic Activity of Geniposide and Genipin

*In vitro* cytotoxicity activity of Geniposide and Genipin was measured using the sulforhodamine B (SRB) (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) protein staining assay [49–51], using three different cervical cancer cell lines CaSki, CaLo, and INBL; and the immortalized keratinocytes HaCaT, as a non-tumorigenic cell line. The CaLo and INBL cell lines [28] were donated by Profesor María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl from Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Briefly, cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and seeded in a 96-well microtiter plate at a cellular density of 5000 cells/mL, and placed in an incubator (5% CO<sub>2</sub> and 37 °C) for 5 h. Afterward, different concentrations of pure iridoids (0.04128, 0.2064, 1.032, 5.16, 25.8, and 129 μM), of podophyllotoxin positive control (0.00303, 0.00606, 0.01213, 0.02425, 0.04850, and 0.09700 μM), and of cisplatin positive control (0.10400, 0.20781, 0.41563, 0.83125, 1.6625, and 3.325 μM) were added in triplicate and incubated for 72 h. The assays were conducted in three independent experiments.

Afterward, cells were fixed with cold trichloroacetic acid (30% in water) and stained with SRB (0.4% in a 1% of acetic acid solution). Cells were washed with a cold 1% acetic acid solution. Finally, the bound colorant was solubilized with Tris base to obtain the optical density (OD<sub>sample</sub>). The bound colorant was proportional to either total protein or cells amount. DMSO (final concentration of 0.5%) was used as vehicle and blank (OD<sub>blank</sub>) in Genipin experiments, and only deionized water was employed as vehicle and blank in Geniposide experiments. The total protein concentration in a single plate with cells at the

assay's beginning was considered zero (OD<sub>zero</sub>). Microtiter plates were incubated for 72 h, after which the total protein concentration was determined with Equation (3). Using an ELISA-Reader spectrophotometer, this assay measures the respective absorbance at 490 nm (Molecular Devices, SPECTRA max plus 384). Results were expressed as the concentration that inhibits 50% of control growth after the treatment period (IC<sub>50</sub>), using the statistical program GraphPad Prism, version 8.00 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA).

$$\%Survival = \frac{OD_{sample} - OD_{zero}}{OD_{blank} - OD_{zero}} \times 100 \quad (3)$$

Cytotoxic activity assays with Geniposide and Genipin against the HeLa cell line were performed by the MTS method [52]. For this assay, 5000 cells were seeded in a 96-well cell culture plate and treated for 48 h using 882, 441, 220.50, 110.25, 55.125, 27.5625, and 13.78125  $\mu$ M of Genipin or Geniposide, and 50, 25, 12.5, 6, and 3 nM of paclitaxel as positive control. DMSO (final concentration of 0.5%) was used as a vehicle and blank. We used CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) to determine the number of viable cells, following the manufacturer's instruction. Cell viability was estimated by measuring the absorbance at 450 nm using an automated ELISA reader (Promega, Madison, WI, USA). Data were analyzed in the Prism 5.0 statistical program (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA), and the IC<sub>50</sub> values were determined by regression analysis.

### 3.2. Searching of Cytotoxic Reports of Iridoids in Cervical Cancer

The information about the cytotoxicity of iridoids in cervical cancer cells in vitro was collected by searching on databases and websites such as PubMed, SciFinder, Google Scholar, Elsevier, ScienceDirect, and Web of Science. The following words or phrases were used in diverse combinations for searching: "cytotoxic iridoids in cervical cancer", "iridoids against cervical cancer", "antiproliferative iridoids in cervical cancer", "cervical cancer", "in vitro", "cytotoxic iridoids", "cell death". More than 30 scientific works of literature were consulted from 2004 to the date, gathering forty-four iridoids with reported cytotoxic activity in a cervical cancer cell line.

Eleven of the forty-four iridoids were selected to analyze their similarity on their structure, molecular descriptors, and the reported cytotoxic activities to understand the absence of Geniposide activity and the low Genipin activity. The iridoids were selected based on the two following criteria: (1) they were assessed in the same cell line, and (2) they were evaluated at the same time of treatment.

### 3.3. Conformation Analysis, Geometry Optimization, and Energy Calculation

A conformational analysis of all the simple and glycosides iridoids in their neutral and anionic form using the MMFF94 molecular mechanism model was performed [53]. The minimum energy conformer was submitted to a geometry optimization without symmetry constraints, employing the PM6 semiempirical method [54]. A harmonic frequency analysis was performed to ensure that the structure corresponds to a minimum on the potential energy surface. Furthermore, to acquire a more precise energy value and electronic density characteristics, a geometry reoptimization, at a density functional theory level, with the B3LYP hybrid functional [55] and the 6-31G\* basis set [56], was performed. These systems were evaluated in water within the SM8 model [57].

Additionally, a single-point calculation using the B3LYP functional and 6-311 + G\*\* basis set [58] in vacuum (in water for 10-O-(E)-*p*-coumaroylgeniposidic acid) was performed.

### 3.4. Molecular Descriptors

The following global chemical reactivity descriptors: Energy of the Highest Occupied Molecular Orbital (E<sub>HOMO</sub>), Energy of the Lowest Unoccupied Molecular Orbital (E<sub>LUMO</sub>), dipole moment ( $\rho$ ), polarizability, polar surface area (PSA), Hydrogen Bond Donor (HBD), and Hydrogen Bond Acceptor (HBA) counts, and some related to their size and form: area,

volume, ovality, and their solubility: LogP (1-octanol/water calculation) were obtained from the quantum calculations performed with SPARTAN'20 program [59].

### 3.5. Molecular Representation of Electron Density Properties

The molecular electrostatic potential (MEP) mapped onto an iso-density surface ( $0.002 e^-/\text{\AA}^3$ ) for each compound was obtained. The MEP map provides a perception of the molecular size and the location of electron-rich and -deficient zones on a compound. In addition, to evaluate the electronic effect caused by the substituents in the iridoid skeleton, a molecular electrostatic potential surface with a value of  $-10$  kcal/mol was obtained. All the molecular graphics were performed in the SPARTAN'20 program.

### 3.6. Molecular Similarity Analysis of Iridoids

Molecular similarity analysis was performed by comparing the skeleton base of the iridoids and detecting the substituents that are changed or added between them to the central iridoid of the comparison (Genipin or Geniposide). A molecular similarity analysis of three groups was performed: (1) Genipin with other simple iridoids, (2) Genipin with Geniposide, and (3) designed iridoids with one of the most cytotoxic iridoids.

### 3.7. QSAR Construction and Validation

#### Molecular Descriptors

The following global chemical reactivity descriptors were considered to construct the QSAR model: Energy of the Highest Occupied Molecular Orbital ( $E_{HOMO}$ ), Energy of the Lowest Unoccupied Molecular Orbital ( $E_{LUMO}$ ), chemical hardness ( $\eta$ ) expressed by equation 4, electronegativity ( $\chi$ ) expressed by Equation (5), dipole moment ( $\rho$ ), polarizability,  $\Delta$ polarizability, polar surface area (PSA),  $\Delta$ PSA, Hydrogen Bond Donnor (HBD), and Hydrogen Bond Acceptor (HBA) counts, and some related to their size and form: area,  $\Delta$ area, volume,  $\Delta$ volume, ovality,  $\Delta$ ovality, and their solubility: LogP (1-octanol/water calculation),  $\Delta$ LogP, and  $\text{LogP}^2$ . All the  $\Delta$  are the differences in the values between the descriptor of the iridoid in case and the descriptor of Genipin. All the calculations were performed in the SPARTAN'20 program. LogS (aqueous solubility calculation) was an extra descriptor and was obtained from Virtual Computational Chemistry Laboratory [60]. The energy corresponding to  $E_{HOMO}$  represents the ionization potential of the molecule and  $E_{LUMO}$  the corresponding electron affinity value, according to the Koopmans approximation.

$$\eta = \frac{E_{HOMO} - E_{LUMO}}{2} \quad (4)$$

$$\chi = \frac{E_{HOMO} + E_{LUMO}}{2} \quad (5)$$

### 3.8. Mathematical Model Generation

To construct our mathematical model, the multilinear regression by minimum quadratic differences was employed, using Excel Microsoft Office 365. All the molecular descriptors and the biological activity ( $IC_{50}$ ) of the iridoids were used as the independent variables (X) and the dependent variable (Y), respectively.

### 3.9. Statistical Validation

For the validation of our QSAR model, we employed the coefficient of determination ( $R^2$ ) (Equation (6)), cross-validated  $R^2$  ( $Q^2$ ), standard deviation (s), and Fisher test (F) [61]. The last two parameters gave information about how the correlation between the experimental and calculated activities is affected by the number of compounds in the

study (Equation (7)), and what the probability is for the mathematical model to casually occur (Equation (8)).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (6)$$

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2} \quad (7)$$

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / df_M}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / df_E} \quad (8)$$

where  $\hat{y}_i$ ,  $\bar{y}$ , and  $y_i$  refer to the calculated, average, and experimental values of activities, respectively. Also,  $df_M$  and  $df_E$  (Equation (9)) refer to the degrees of freedom of the model and error, respectively.

$$df_E = n - p - 1 \quad (9)$$

In the mathematical model,  $R^2$  must possess high values ( $R^2 \geq 80$ ), while  $s$  and  $F$  should have the smallest and largest possible values, respectively, to ensure that the QSAR model is reliable.

Also, to undertake a more sophisticated validation, we used redundancy ( $R^P$ ) and overfitting ( $R^N$ ) rules [62]. From the Pearson correlation matrix, we corroborated that the molecular descriptors are not linearly correlated (Table S1).

The goal of the redundancy rule is to detect models with an excess of good molecular descriptors ( $R^P$ ) and establish that, if  $R^P < t^P$ , the model is rejected. Depending on the data,  $t^P$  values range from 0.01 to 0.1.  $R^P$  is defined by Equation (10).

$$R^P = \prod_{j=1}^{P^+} \left( 1 - M_j \left( \frac{p}{p-1} \right) \right); M_j > 0 \text{ and } 0 \leq R^P \leq 1 \quad (10)$$

On the other hand, the purpose of the overfitting rule is to detect models with an excess of bad molecular descriptors. This rule stipulates that, if  $R^N < t^N(\epsilon)$ , the model is rejected. The  $t^N(\epsilon)$  values are calculated by the Equation (11).

$$t^N(\epsilon) = \frac{p \cdot \epsilon - R}{p \cdot R} \quad (11)$$

where values range from 0.01 to 0.1 and  $p$  is the number of variables in the model.  $R^N$  is defined by Equation (12).

$$R^N = \sum_{j=1}^{P^-} M_j; M_j < 0 \text{ and } -1 \leq R^N \leq 0 \quad (12)$$

where  $M_j$  is defined by Equation (13).

$$M_j = \frac{R_{jY}}{R} - \frac{1}{P}; -\frac{1}{P} \leq M_j \leq \frac{p-1}{p} \quad (13)$$

$R_{jY}$  is the absolute value of the regression coefficient between the  $j$ th descriptors and the response  $Y$ .

Moreover, we evaluated the predictive ability of our model by the Leave-One-Out ( $Q_{LOO}^2$ ) method, in which one compound is removed from the data set and the activity ( $Y_{exp}$ ) is correlated using the rest of the data set. The Equation (14) was employed to calculate  $Q_{LOO}^2$ .

$$Q_{LOO}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (14)$$

where  $\hat{y}_{i/i}$  is the predicted value of the activity ( $Y_{\text{pred}}$ ).

Applicability domain evaluation was carried out by means of William plot construction, which depends on the leverage values and the standardized error in the calculation. The leverage values ( $h$ ) are obtained from the leverage matrix  $H$ , which contains information about the descriptors on which the model is built. The leverage matrix  $H$  is defined as Equation (15).

$$H = X \cdot (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \quad (15)$$

where  $X$  is the selected descriptor matrix;  $X^T$  is the transpose matrix of  $X$ ; and  $(X^T \cdot X)^{-1}$  is the inverse of matrix  $(X^T \cdot X)$ . The leverage values are the diagonal elements of the  $H$  matrix. The warning leverage ( $h^*$ ) is calculated as  $h = 3p/n$ , where  $n$  is the number of molecules and  $p$  is the number of descriptors in the model plus one. If one of the compounds has a leverage value higher than the  $h^*$ , it will be considered an outlier, this is, out of the applicability domain of the model.

#### 4. Conclusions

In this study, Geniposide and its aglycone Genipin were tested against different cervical cancer cell lines (CaLo, CaSki, and INBL) from different FIGO stagings and with the most high-risk HPV types. Geniposide did not exert cytotoxic activity, and Genipin was more active against CaLo (IIB, HPV18) and CaSki (metastatic, HPV16) than against INBL (IVB, HPV18).

Derived from the structure–activity relationship and the molecular similarity analysis, we found that the dipole moment is relevant to the cytotoxic activity against the HeLa cell line. Moreover, we observed that the presence of different functional groups, such as an aldehyde or a carboxylic acid, the hydroxyls in C1 and C8, and the lack of the double bond in C7–C8 influenced the biological activity of the iridoids.

Derived from the QSAR study, we obtained a model with a good prediction of the biological activity against HeLa, that reveals the dipole moment as a principal descriptor that impacts on the activity of the iridoids. The designed iridoids incorporated the most relevant structural characteristics of simple iridoids based on the Genipin structure. Therefore, we propose ten of the designed iridoids (D9, D10, D35, D36, D55, D56, D58, D60, D61, and D62), since their predicted activity was lower (0.002–0.146  $\mu\text{M}$ ) than the activity of the most cytotoxic iridoid reported in the literature (0.2  $\mu\text{M}$ ), according to our QSAR model.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph16121647/s1>, Figure S1: Structure of iridoid skeleton. Principal substituents in  $R_2$  and  $R_6$  are specified.; Figure S2: The 2D structures of iridoids with reported cytotoxic activity against the HeLa cell line.; Figure S3: The 3D structures of iridoid glycosides evaluated against the HeLa cell line, including the vector dipole (gold arrow). (A) Geniposidic acid, (B) 10-*O*-(*E*)-*p*-coumaroylgeniposidic acid, (C) Catalpol, (D) Geniposide, (D) Lamiide, (F) Pulchelloside I, (G) 5-deoxypulchelloside I, (H) Spinomannoside. Figure S4: Molecular electrostatic potential iso-surface of  $-10$  kcal/mol of iridoid glycosides. (A) Pulchelloside I, (B) Catalpol, (C) Lamiide, (D) Spinomannoside, (E) 5-deoxypulchelloside I, (F) Geniposidic acid, (G) 10-*O*-(*E*)-*p*-coumaroylgeniposidic acid, (H) Geniposide. Figure S5: Molecular electrostatic potential map of iridoid glycosides. (A) Pulchelloside I, (B) Catalpol, (C) Lamiide, (D) Spinomannoside, (E) 5-deoxypulchelloside I, (F) Geniposidic acid, (G) 10-*O*-(*E*)-*p*-coumaroylgeniposidic acid, (H) Geniposide. Figure S6: Alignment of Genipin with Geniposide. (A) Common similarity centers by CFDs of Genipin (purple circles represent the CFDs selected for the alignment). (B) Dipole vector represented by gold arrows of both iridoids aligned is shown (a: Genipin, b: Geniposide). Figure S7: The 3D structures of the best designed iridoids based on Genipin. Gold arrows represent dipole vector in each iridoid. (A) D9, (B) D10, (C) D35, (D) D36, (E) D55, (F) D56, (G) D58, (H) D60, (I) D61, (J) D62. Figure S8: Molecular electrostatic potential iso-surface of  $-10$  kcal/mol of the best designed iridoids. (A) D9, (B) D10, (C) D35, (D) D36, (E) D55, (F) D56, (G) D58, (H) D60, (I) D61, (J) D62. Figure S9: Molecular electrostatic potential map of the best designed iridoids. (A) D9, (B) D10, (C) D35, (D) D36, (E) D55, (F) D56, (G) D58, (H) D60, (I) D61, (J) D62. Figure S10: Independent correlations between the biological activity and the descriptors of the QSAR model. (A)  $-\text{Log IC}_{50}$  vs Dipole moment,

(B)  $-\text{Log IC}_{50}$  vs  $\Delta\text{PSA}$ , (C)  $-\text{Log IC}_{50}$  vs  $\text{LogS}$ , (D)  $-\text{Log IC}_{50}$  vs  $\Delta\text{Polarizability}^2$ . Table S1: Pearson correlation matrix. Table S2: The pKa values of the acid iridoids. Table S3: Molecular descriptors of designed iridoids.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.L.-L., R.S.R.-H. and V.R.-L.; methodology, D.L.-L. and J.N.S.-C.; software, R.S.R.-H. and M.A.L.-P.; validation, D.L.-L., R.S.R.-H. and V.R.-L.; formal analysis, D.L.-L.; investigation, D.L.-L.; resources, V.R.-L.; data curation, D.L.-L.; writing—original draft preparation, D.L.-L.; writing—review and editing, R.S.R.-H., V.R.-L., C.M.-P., J.N.S.-C., O.A.P.-M. and M.A.L.-P.; visualization, C.M.-P. and O.A.P.-M.; supervision, R.S.R.-H. and V.R.-L.; project administration, R.S.R.-H. and V.R.-L.; funding acquisition, V.R.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Research was funded by CONAHCyT, grant number 667926.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors are thankful for the financial support from CONAHCyT (Projects No. 319550, No. 320243 and Grant 667926). We also thank María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl for her donation of the CaLo and INBL cell lines.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- World Health Organization (WHO). Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 5 July 2023).
- GLOBOCAN-Global Cancer Observatory. Available online: <https://gco.iarc.fr/> (accessed on 10 July 2023).
- Okunade, K.S. Human papillomavirus and cervical cancer. *J. Obstet. Gynaecol.* **2020**, *40*, 602–608. [\[CrossRef\]](#)
- Anand, U.; Dey, A.; Chandel, A.K.S.; Sanyal, R.; Mishra, A.; Pandey, D.K.; De Falco, V.; Upadhyay, A.; Kandimalla, R.; Chaudhary, A.; et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis.* **2022**, *10*, 1367–1401. [\[CrossRef\]](#)
- Çakır, C.; Kılıç, F.; Dur, R.; Yüksel, D.; Ünsal, M.; Korkmaz, V.; Kılıç, Ç.; Kimyon Cömert, G.; Boran, N.; Türkmen, O.; et al. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced stage (IB2-IIA2-IIB) cervical carcinoma: Experience of a tertiary center and comprehensive review of the literature. *Turk. J. Obstet. Gynecol.* **2021**, *18*, 190–202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Xiong, Y.; Liang, L.Z.; Cao, L.P.; Min, Z.; Liu, J.H. Clinical effects of irinotecan hydrochloride in combination with cisplatin as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol.* **2011**, *123*, 99–104. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, H.; Zhang, Y. Application of vincristine and cisplatin combined with intensity-modulated radiation therapy in the treatment of patients with advanced cervical cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2021**, *13*, 13894–13901. [\[PubMed\]](#)
- Bajaj, A.; Gopalakrishnan, M.; Harkenrider, M.M.; Lurain, J.R.; Small, W., Jr. Advanced small cell carcinoma of the cervix—Successful treatment with concurrent etoposide and cisplatin chemotherapy and extended field radiation: A case report and discussion. *Gynecol. Oncol. Rep.* **2017**, *23*, 4–6. [\[CrossRef\]](#)
- Park, S.H.; Kim, M.; Lee, S.; Jung, W.; Kim, B. Therapeutic Potential of Natural Products in Treatment of Cervical Cancer: A Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 154. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Huang, M.; Lu, J.J.; Ding, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2021**, *11*, 5–13. [\[CrossRef\]](#)
- Naeem, A.; Hu, P.; Yang, M.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhu, W.; Zheng, Q. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules* **2022**, *27*, 8367. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, C.; Gong, X.; Bo, A.; Zhang, L.; Zhang, M.; Zang, E.; Zhang, C.; Li, M. Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities, and Pharmacokinetics. *Molecules* **2020**, *25*, 287. [\[CrossRef\]](#)
- Hussain, H.; Green, I.R.; Saleem, M.; Raza, M.L.; Nazir, M. Therapeutic Potential of Iridoid Derivatives: Patent Review. *Inventions* **2019**, *4*, 29. [\[CrossRef\]](#)
- Bianco, A. Recent developments in iridoids chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *86*, 2335–2338. [\[CrossRef\]](#)
- Ornano, L.; Feroci, M.; Guarcini, L.; Venditti, A.; Bianco, A. Anti-HIV agents from nature: Natural compounds from *Hypericum hircinum* and carbocyclic nucleosides from iridoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2018**, *56*, 173–228. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, C.W.; Choi, K.C. Potential roles of iridoid glycosides and their underlying mechanisms against diverse cancer growth and metastasis: Do they have an inhibitory effect on cancer progression? *Nutrients* **2021**, *13*, 2974. [\[CrossRef\]](#)
- Ndongwe, T.; Witika, B.A.; Mncwangi, N.P.; Poka, M.S.; Skosana, P.P.; Demana, P.H.; Summers, B.; Siwe-Noundou, X. Iridoid Derivatives as Anticancer Agents: An Updated Review from 1970–2022. *Cancers* **2023**, *15*, 770. [\[CrossRef\]](#)

18. Chen, Z.; Xu, H.; Wang, X.; Liu, Z. Lactobacillus raises in vitro anticancer effect of Geniposide in HSC-3 human oral squamous cell carcinoma cells. *Exp. Ther. Med.* **2017**, *14*, 4586–4594. [[CrossRef](#)]
19. Bai, G.; Chen, B.; Xiao, X.; Li, Y.; Liu, X.; Zhao, D.; Zhang, L.; Zhao, D. Geniposide inhibits cell proliferation and migration in human squamous carcinoma cells via AMPK and JNK signaling pathways. *Exp. Ther. Med.* **2022**, *24*, 706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Habtemariam, S.; Lentini, G. Plant-derived anticancer agents: Lessons from the pharmacology of Geniposide and its aglycone, Genipin. *Biomedicines* **2018**, *6*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Feng, Q.; Cao, H.L.; Xu, W.; Li, X.R.; Ren, Y.Q.; Du, L.F. Apoptosis induced by Genipin in human leukemia K562 cells: Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest. *Acta Pharmacol. Sin.* **2011**, *31*, 519–527. [[CrossRef](#)]
22. Kim, E.S.; Jeong, C.S.; Moon, A. Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *27*, 567–572. [[CrossRef](#)]
23. Ko, H.; Kim, J.M.; Kim, S.J.; Shim, S.H.; Ha, C.H.; Chang, H.I. Induction of apoptosis by Genipin inhibits cell proliferation in AGS human gastric cancer cells via Egr1/p21 signaling pathway. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4191–4196. [[CrossRef](#)]
24. Li, Z.; Zhang, T.B.; Jia, D.H.; Sun, W.Q.; Wang, C.L.; Gu, A.Z.; Yang, X.M. Genipin inhibits the growth of human bladder cancer cells via inactivation of PI3K/Akt signaling. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 2619–2624. [[CrossRef](#)]
25. Shanmugam, M.K.; Shen, H.; Tang, F.R.; Arfuso, F.; Rajesh, M.; Wang, L.; Kumar, A.P.; Bian, J.; Goh, B.C.; Bishayee, A.; et al. Potential role of Genipin in cancer therapy. *Pharmacol. Res.* **2018**, *133*, 195–200. [[CrossRef](#)]
26. Maggiora, G.; Vogt, M.; Stumpge, D.; Bajorath, J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3186–3204. [[CrossRef](#)]
27. Daina, A.; Röhrig, U.F.; Zoete, V. Computer-aided drug design for cancer therapy. In *Systems Medicine: Integrative, Qualitative and Computation Approaches*, 1st ed.; Wolkenhauer, O., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2021; pp. 386–401. [[CrossRef](#)]
28. Zuñiga Martinez, M.D.L.; López Mendoza, C.M.; Tenorio Salazar, J.; García Carrancá, A.M.; Cerbón Cervantes, M.A.; Alcántara-Quintana, L.E. Establishment, authenticity, and characterization of cervical cancer cell lines. *Mol. Cell. Oncol.* **2022**, *9*, 2078628. [[CrossRef](#)]
29. Neri-Numa, I.A.; Pessôa, M.G.; Arruda, H.S.; Pereira, G.A.; Paulino, B.N.; Angolini, C.F.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Pastore, G.M. Genipap (*Genipa americana* L.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids. *Food Res. Int.* **2020**, *134*, 109252. [[CrossRef](#)]
30. Hwang, H.; Kim, C.; Kim, S.M.; Kim, W.S.; Choi, S.H.; Chang, I.M.; Ahn, K.S. The hydrolyzed products of iridoid glycoside with  $\beta$ -glucosidase treatment exert anti-proliferative effects through suppression of STAT3 activation and STAT3-regulated gene products in several human cancer cells. *Pharm. Biol.* **2012**, *50*, 8–17. [[CrossRef](#)]
31. Marcotullio, M.C.; Loizzo, M.R.; Messina, F.; Temperini, A.; Tundis, R.; Menichini, F.; Curini, M. Bioassay-guided fractionation of *Euphrasia pectinata* Ten. and isolation of iridoids with antiproliferative activity. *Phytochem. Lett.* **2015**, *12*, 252–256. [[CrossRef](#)]
32. Feng, S.X.; Yi, B.; Zhang, M.; Xu, J.; Lin, H.; Xu, W.T. Iridoid glycosides from *Callicarpa nudiflora* Hook. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 181–189. [[CrossRef](#)]
33. Wang, C.; Xin, P.; Wang, Y.; Zhou, X.; Wei, D.; Deng, C.; Sun, S. Iridoids and sfingolipids from *Hedyotis diffusa*. *Fitoterapia* **2018**, *124*, 152–159. [[CrossRef](#)]
34. Cao, H.; Feng, Q.; Xu, W.; Li, X.; Kang, Z.; Ren, Y.; Du, L. Genipin induced apoptosis associated with activation of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p53 protein in HeLa cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 1343–1348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Li, N.; Di, L.; Gao, W.C.; Wang, K.J.; Zu, L.B. Cytotoxic iridoids from the roots of *Patrinia scabra*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *72*, 1723–1728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Krohn, K.; Gehle, D.; Dey, S.K.; Nahar, N.; Mosihuzzaman, M.; Sutana, N.; Sohrab, M.H.; Stephens, P.J.; Pan, J.J.; Sasse, F. Prismatomerin, a new iridoid from *Prismatomeris tetrandra*. Structure elucidation, determination of absolute configuration, and cytotoxicity. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1339–1343. [[CrossRef](#)]
37. Kırmızıbekmez, H.; Kúsz, N.; Bérdi, P.; Zupkó, I.; Hohmann, J. New iridoids from the roots of *Valeriana dioscoridis* Sm. *Fitoterapia* **2018**, *130*, 73–78. [[CrossRef](#)]
38. Sheng, L.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Li, N. Chemical constituents of *Patrinia heterophylla* Bunge and selective cytotoxicity against six human tumor cells. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *236*, 129–135. [[CrossRef](#)]
39. Saidi, I.; Baccari, W.; Marchal, A.; Waffo-Tégou, W.; Harrath, A.H.; Mansour, L.; Jannet, H.B. Iridoid glycosides from the Tunisian *Citharexylum spinosum* L.: Isolation, structure elucidation, biological evaluation, molecular docking and SAR analysis. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *151*, 112440. [[CrossRef](#)]
40. Saidi, I.; Nimbarte, V.D.; Schwalbe, H.; Waffo-Tégou, P.; Harrath, A.H.; Mansour, L.; Alwasel, S.; Jannet, H.B. Anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of extracts and phytochemicals from the Tunisian *Citharexylum spinosum* L.: Molecular docking and SAR analysis. *Bioorganic Chem.* **2020**, *102*, 104093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hu, Z.; Wang, H.; Fu, Y.; Ma, K.; Ma, X.; Wang, J. Gentiopicroside inhibits cell growth and migration on cervical cancer via the reciprocal MAPK/Akt signaling pathways. *Nutr. Cancer* **2021**, *73*, 1459–1470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Qu, Z.; Ma, L.; Zhang, Q.; Yang, R.; Hou, G.; Wang, Y.; Zhao, F. Characterization, crystal structure and cytotoxic activity of a rare iridoid glycoside from *Lonicera saccata*. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2020**, *C76*, 269–275. [[CrossRef](#)]
43. Fukuyama, Y.; Minoshima, Y.; Kishimoto, Y.; Chen, I.S.; Takahashi, H.; Esumi, T. Iridoid glycosides and *p*-coumaroyl iridoids from *Viburnum luzonicum* and their cytotoxicity. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1833–1838. [[CrossRef](#)]

44. Discovery Studio 2021. Available online: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> (accessed on 5 August 2023).
45. Yang, Y.; Yang, Y.; Hou, J.; Ding, Y.; Zhang, T.; Zhang, Y.; Wang, J.; Shi, C.; Fu, W.; Cai, Z. The hydroxyl at position C1 of Genipin is the active inhibitory group that affects mitochondrial uncoupling protein 2 in Panc-1 cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147026. [[CrossRef](#)]
46. Brown, S.; Clastre, M.; Courdavault, V.; O'Connor, S.E. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 3205–3210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Nagatoshi, M.; Terasaka, K.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 32866–32874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Pungitore, C.R.; García, C.; Sotero Martín, V.; Tonn, C.E. Inhibition of Taq DNA polymerase by iridoid aglycone derivatives. *Cell. Mol. Biol.* **2012**, *58*, 1786–1790. [[CrossRef](#)]
49. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. [[CrossRef](#)]
50. Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116. [[CrossRef](#)]
51. Peña-Morán, O.A.; Villarreal, M.L.; Álvarez-Berber, L.; Meneses-Acosta, A.; Rodríguez-López, V. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. *Molecules* **2016**, *21*, 1013. [[CrossRef](#)]
52. Sanchez-Carranza, J.N.; González-Maya, L.; Razo-Hernández, R.S.; Salas-Vidal, E.; Nolasco-Quintana, N.Y.; Clemente-Soto, A.F.; García-Arizmendi, L.; Sánchez-Ramos, M.; Marquina, S.; Alvarez, L. Achillin Increases Chemosensitivity to Paclitaxel, Overcoming Resistance and Enhancing Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Resistant to Paclitaxel (Hep3B/PTX). *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 512. [[CrossRef](#)]
53. Halgren, T.A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, form, scope, parameterization and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519. [[CrossRef](#)]
54. Stewart, J.P.J. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209–220. [[CrossRef](#)]
55. Stephens, P.J.; Devlin, F.; Chabalowski, C.F.; Frisch, M.J. Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields: A comparison of local, nonlocal, and hybrid density functionals. *J. Phys. Chem.* **1994**, *45*, 11623–11627. [[CrossRef](#)]
56. Hay, P.J.; Wadt, W.R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284–298. [[CrossRef](#)]
57. Chambers, C.C.; Hawkins, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Model for aqueous solvation based on class IV atomic charges and first solvation shell effects. *J. Chem. Phys.* **1996**, *100*, 16385–16398. [[CrossRef](#)]
58. Petersson, G.A.; Tensfeldt, T.G.; Montgomery, J.A. A complete basis set model chemistry. III. The complete basis set-quadratic configuration interaction family of methods. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6091–6101. [[CrossRef](#)]
59. Wavefunction, Inc. Spartan'20. Available online: <https://www.wavefun.com> (accessed on 30 July 2023).
60. Virtual Computational Chemistry Laboratory. Available online: <https://vcclab.org/lab/alogps/> (accessed on 25 August 2023).
61. Razo-Hernández, R.S.; Pineda-Urbina, K.; Velasco-Medel, M.A.; Villanueva-García, M.; Sumaya-Martínez, M.T.; Martínez-Martínez, F.J.; Gómez-Sandoval, Z. QSAR study of the DPPH· radical scavenging activity of coumarin derivatives and xanthine oxidase inhibition by molecular docking. *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, *12*, 1067–1080. [[CrossRef](#)]
62. Marquina, S.; Maldonado-Santiago, M.; Sánchez-Carranza, J.N.; Antúnez-Mojica, M.; González-Maya, L.; Razo-Hernández, R.S.; Alvarez, L. Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway. *Bioorganic Med. Chem.* **2019**, *27*, 43–54. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** "DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Omar Aristeo Peña Morán

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma del miembro del jurado

Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

OMAR ARISTEO PEÑA MORÁN | Fecha:2024-05-23 08:10:32 | FIRMANTE

laKsNiNQEvR/IqXcT8u4NewcalfFebmHOaI DEJACNnhTMXmZ1DJyLb7sVICRNGT08aSayb+FMWFCacaA4CaksS6N0p8uDkhSPTbr0mtlcZ0U9QE2ESzGKXTcdFpzeyGIKfXN0KS4KDyCqeYF6EcJ88jTs8dkb0UvjjJM5kzBuEX9qXMw/8FL2kTzuRr6NPIDAprTR8gg64BPVDFatqMGYKxJuSEQFIV8HoE34JgJaGldTTt/VZCVpYK0MpnRm0c7rLwt1o7SoQTVIt3TtHuW3nia41eP+WhhKypXl6m6gL8MPwbn+3CelaLnKN84raJ627urnHLUIDLofzMoc9VYQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**BN10LP8FT**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/enqfmTy04grNnjQD9TspSRC3FHfDhrfA>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** "DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2024-05-23 07:23:27 | FIRMANTE**

SKy3Jw3K01HGHw7VbDaVjl7y6CdTuuuYx7QAPO1ZBCjlWlyH/2g/FdtUw52KdOOAm1efTSzAL3PcooaDODb7/BGZoKsxPcpgCyH6oWPIOG8x2oZOa5p6Pnl/ysXiuQ3HDqGaD  
Lytllok8hdV/OAJT1yqIUWO0OtcXwVMsTIJONNoYNSfot0CMQxunboohmqt7RIZr1yPjisVf3DK+qypR5hXFaRUATKlvmeKd7rsSngGYmXvICRWJi2N1pizn1s4oyBy13XmKAa1isj  
mMuy5DIICxV9A0kiZ36VvauRPIHVuMaJ1OI6t+7UPGRo4H7B8/WlbdQZgboLiS2FdqoGz+ig==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[x1M0839Xo](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/KnvZdUsilq9iAz8bRE5up9IT7Q5X88B0>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** "DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2024-05-23 08:48:52 | FIRMANTE

NZLjhTkPIG5TOzMK4qQ2Vfvdxa+QLLSRw6c2fXMjw20tZvM7SohtuDb40jYA+ClhEqeNiKuVQlmg27FmKRDS5t+k/Tc8XExmcT43BPY0ex6HYjNco0LywJkPWqGkcJwA7hHludk  
JNe4On4CM1SDEds9dEVyjZjVwazDFw7Yd1TAhK4cm9n49Low2kolw0mYsc4+tExoXoRj234U0t7CaMVznB5q/jZIOdKx+BjG97d6fZpjT2cGc6rK9PqHRT011YcCL4cFoX0e2yXk  
g2wYD3rhAYO+K7pXEs1jnwfb36cdY2OBAET/d3FVdAcxKpFcDUSA4U9N2pvdsM3Jqf+ANQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[v5KyfmaD7](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9Mbjp9toLfrEmtAXiL4JRIWaZ7Sxab2q>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** "DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2024-05-23 12:14:41 | FIRMANTE**

N5dchduRZGvUJZhrh524vq7s8SIET1AAsKJCRyik8ZLak6UCNiv4Se2h6fxZ7eXEuvW3eKvVv85nUjOPV3PIQZ6TszOoU4PPnoxOahoFnq4oCCHYuWoXGuQUOjsgmPk7hypz39/Jjehdd6vsTXr4dKfuR4NrK91yM8ofOR2RixNSj6L/eEmanVvlz5vqnhFXZ7tjqP0IHwEvRwSmJ5JQnRZUorsv8Bn5vliAF32XfB+uW9vZ9rIUZ8WV0lnpm4Oml72os7kA3/esgJCGYQTnO0mVdzoFQXrW7hCClebmVVnaZrp/XopWn2sihu3XE4lji4ZAnRzU2gb511N6st4eXA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SMZ7zmpGT](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lo5XxGBXMrkaTTQWzvyxT1IQeYUTAPK2>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** “DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2024-05-23 23:05:22 | FIRMANTE**

gZkbl0f4hIDL9L0QnqNtkydyXiovgRBzF5o69vviwFJwA9919FyuqFSxk/KCdE1yRR6LyleN2zs22ZGKmAIN4BRWxTjDAGY4zdGyNihrlR8UCIjK8kTmeEQ31uOObe8yT/fgPDCC/XINFDGsEUDPZVyYZSy0laeHkDgmmzhMR44Hjt9//tmTON5X3EUmCi0SC83tRQRVZak6UheMI8yMWLXzACmN28RZf6s5Y6XaWyxUVWJlpP6fJ2vfVSNKctLkaipnnEOvtibio6u/dXhGOgN+MsmwfdQM54gTtlKaXZfhDsw6uBNZVh3nL8xc6HCYOAU5UjwLT0GB3g6MtMGzw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[KcvxfPZtA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xRGgeLhrjtvYkblg80Rpk6qzIXNKQQKV>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** “DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Maricruz Anaya Ruiz

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARICRUZ ANAYA RUIZ | Fecha:2024-05-27 14:00:26 | FIRMANTE**

LzUYCGx8HzWtsydlSULGls/Pq+hMxsfNMw2iCsgoORkiXfQWIL5+fbkmFxuFvt3XE5geHufrs4AiVrBBPPekwy+9Os5BluNpjASlzb8UVY4OGbOZh0ByAicCd+iP8UZTA9jmcTRijnca  
luFT5wv/Hpf+xpHM7kpT8877VTue1kQ5Akd4xuPCgjrX5CQa+k8S50283M+P9srRYVEo9q3bwGBvY/hlwX+JEBM3l36Vjy8Lh2ym6pvuXK2jSbJGZLwFyXYUcNvSFctBBYiyjOT8b  
UjyC1IN6k4xUGc1vobDR3FHPIS3JzKwYgoC+gU33FvJBVhA3HJYM5cCura7PS8xFg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[yigGpPeOF](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/X1LfUEJpN9TpkXZyy6bXzLvzpVfqE8rW>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana López López

**Título de la tesis:** "DISEÑO DE IRIDOIDES BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE GENIPINA Y GENIPÓSIDO: ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANÁLISIS DE SIMILITUD MOLECULAR Y QSAR"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Verónica Rodríguez López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2024-05-24 07:46:13 | FIRMANTE

EKWaQVmk+uU4kncv8unP1DE3v+1jyNHbNdafEwxMH4wBzL0pDvPiBp9fLYbpXRACBgKMMUH76IrEs2WzUfU9o3/0NfLqAdA70VBlcP1v9XCQ+ge9IQJB1+07Eqv3hWwimWoMp8JvVwEEjUetxhuUm+lbQuYJmgn1ZKqZwqwl++MFt3lqBCRo24Oh18Z18X3gw0siRp8qUoMfwRD2LF5ew9qb8ePPoNw7rgz+K1BSLMRCol9Y8/Rc52PCyf+SA+FADZ5WR+FPFxFW73T/K1nmIMQH8iZBzflaYrBCYq+zdBKznDjoKb1RK5g9arCn91KdiGzFL1ue1F/IIPU1BgA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



w39AXpLTq

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a2qEplrBqVJUygJ1wqygTaoSF0tsUaWM>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029