

**EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Passiflora edulis* SOBRE
ENZIMAS DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL HUMANO**

TRABAJO DE GRADO

Para optar al título de MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presentado por:

JOHAN ALEXANDER VILLADA RAMOS

Facultad: CIENCIAS DE LA SALUD

Programa: Maestría en Ciencias Biomédicas

ARMENIA, QUINDÍO

2021

**EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Passiflora edulis* SOBRE
ENZIMAS DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL HUMANO**

TRABAJO DE GRADO

Para optar al título de MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR: JOHANNY AGUILLÓN OSMA PhD.

CO-DIRECTOR: NELSY LOANGO CHAMORRO PhD.

**TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA PRESENTADO COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ARMENIA, QUINDÍO

2021

AGRADECIMIENTOS

En la ejecución de este trabajo de grado para obtener el título de magister en Ciencias Biomédicas, quiero destacar algunas personas que fueron indispensables para el desarrollo del estudio, contribuyendo de manera directa e indirecta.

A mis tutores Johanny Aguillón y Nelsy Loango, por el apoyo y paciencia incondicional, y todo el conocimiento que me han brindado durante mi vida académica.

A los integrantes del grupo de investigación GECAVYME, por su cooperación para la mejoría de este proyecto.

A mi pareja, Emily, quien estuvo en el trayecto final pero que su apoyo y motivación fue importante para finalizar con satisfacción este proceso.

A mis padres, que siempre han estado a mi lado apoyándome e impulsándome a superarme cada día más para lograr cada meta propuesta.

A los docentes, compañeros y programa de la maestría en ciencias biomédicas por su contribución en mi aprendizaje y ejecución de este trabajo.

Al programa Colombia Científica por brindarme el soporte económico para la realización de este trabajo de grado.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE ANEXOS	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES	XI
RESUMEN	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
La enfermedad del cáncer	1
Alteraciones del metabolismo de los lípidos en el cáncer	2
El cáncer colorrectal	8
Papel de los compuestos bioactivos naturales en el cáncer.....	9
<i>Passiflora edulis</i> y hallazgos en el cáncer.....	10
Acoplamiento molecular: un enfoque poderoso para el descubrimiento de fármacos basado en estructuras	12
2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos.....	15
3. METODOLOGÍA	16
OBTENCIÓN DE HOJAS Y EXTRACTO VEGETAL	16
Localización.....	16
Material vegetal	17
Preparación del extracto etanólico de hojas de <i>Passiflora edulis</i>	17
Análisis fitoquímico del extracto etanólico de hojas de <i>Passiflora edulis</i>	17
VIABILIDAD SOBRE CÉLULAS ADHERENTES	19
Líneas celulares	19
Condiciones de cultivo y mantenimiento SW480	20
Ensayos biológicos	22
Evaluación del efecto del extracto etanólico de <i>Passiflora edulis</i> sobre la viabilidad celular mediante el método de Sulforodamina B.....	22
EVALUACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Passiflora edulis</i> EN ERITROCITOS HUMANOS	24

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Passiflora edulis</i> SOBRE LÍPIDOS TOTALES (COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS)	25
EVALUACIÓN <i>in silico</i> DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>Passiflora edulis</i> COMO INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL-COA REDUCTASA (HMGCR) Y LA ACETIL-COENZIMA A CARBOXILASA (ACC)	28
Acoplamiento molecular	28
Preparación del receptor.....	29
Determinación de ligandos	29
Preparación del ligando y optimización energética.....	30
Identificación del sitio de unión y generación de la cuadrícula del receptor	30
Validación de estructuras del complejo proteína objetivo -ligando	31
Acoplamiento molecular receptor- ligando no endógeno.....	32
Análisis y visualización	32
Prueba de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME)	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS	33
Diseño estadístico.....	33
4. RESULTADOS	35
ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Passiflora edulis</i> ..	35
EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Passiflora edulis</i> EVALUADO MEDIANTE SULFORODAMINA B	35
EFECTO HEMOLÍTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Passiflora edulis</i> EN ERITROCITOS HUMANOS.....	38
EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE <i>Passiflora edulis</i> SOBRE LÍPIDOS TOTALES (COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS)	39
EVALUACIÓN <i>in silico</i> DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>Passiflora edulis</i> COMO INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL-COA REDUCTASA (HMGCR) Y LA ACETIL-COENZIMA A CARBOXILASA (ACC)	46
5. DISCUSIÓN	76
6. CONCLUSIONES	99
7. RECOMENDACIONES	101
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
9. ANEXOS	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Las células cancerosas obtienen ácidos grasos de la lipogénesis de <i>novo</i> y la captación exógena.	4
Figura 2. Modelo que muestra cómo la limitación de AG en la célula puede limitar la proliferación de células cancerígenas.	5
Figura 3. Descripción general del metabolismo de los lípidos en células normales y cancerosas.	7
Figura 4. Mapa con coordenadas geográficas globales y georreferencia del corregimiento Tierra Blanca (Roldanillo, Valle del Cauca, Colombia).	16
Figura 5. Células de adenocarcinoma de colon humano SW480 con objetivo de 40X (400X de magnificación).	19
Figura 6. Fibroblastos de prepucio humano normal de recién nacido combinado de dos individuos con objetivo de 40X (400X de Magnificación).	20
Figura 7. Efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre la viabilidad en células SW480 (A) y HFF (B) a 24 y 48 horas.	37
Figura 8. Porcentaje de hemólisis de los diferentes tratamientos del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre los eritrocitos humanos.	39
Figura 9. Efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre el contenido total de colesterol y triglicéridos en SW480.	45
Figura 10. Valor de la energía libre de unión (-kcal/mol) de las enzimas HMGCR, ACC1 y ACC2 con varios candidatos a compuestos inhibidores.	53
Figura 11. Salida de AV, que muestra los ligandos controles en interacción con el sitio activo de la HMGCR.	56
Figura 12. (a) Diagrama 2D y 3D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor HMGCR y los ligandos.	57
Figura 13. Salida de AV, que muestra el inhibidor endógeno B89/tepraloxidim en interacción con el sitio activo de la ACC1.	65

Figura 14. Diagrama 2D y 3D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor ACC1 y los ligandos.	65
Figura 15. Salida de AV, que muestra el sitio de unión del inhibidor endógeno 6U3/ND-30 en interacción con el sitio activo de la ACC2.	71
Figura 16. Diagrama 2D y 3D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor ACC2 y los ligandos.	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido total de los compuestos: fenoles, polisacáridos, taninos, flavonoides.	35
Tabla 2. IC ₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre las líneas celulares SW480 y HFF.	38
Tabla 3. Índice de selectividad del extracto etanólico en SW480 respecto a células no tumoral HFF.	38
Tabla 4. IC ₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre el contenido total de triglicéridos y colesterol extracelular en SW480 a 24 y 48 horas.	41
Tabla 5. IC ₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre el contenido total de triglicéridos y colesterol extracelular en SW480 a 24 y 48 horas.	44
Tabla 6. Diagrama en 2D de los ligandos controles HMG-CoA, B89 y 6U3.	46
Tabla 7. Coordenadas del mapa tridimensional de la caja de los receptores y ligandos controles cristalizados.	48
Tabla 8. Superposición del ligando en base al proceso de re acoplamiento de HMGCR, 6U3 y B89 con cristalografía.	49
Tabla 9. Regla de cinco de Lipinski (Ro5) de los ligandos vegetales.	50
Tabla 10. Análisis de acoplamiento molecular de varios ligandos vegetales y endógenos sobre las enzimas HMGCR, ACC1 y ACC2.	52
Tabla 11. Resultado de la interacción entre los dos ligandos controles y once no endógenos con la proteína HMGCR.	55
Tabla 12. Posición de acoplamiento de los ligandos no endógenos en la enzima HMGCR.	58

Tabla 13. Resultado de la interacción entre un inhibidor endógeno y ocho ligandos no endógenos seleccionados por su energía libre de unión en complejo con la proteína ACC1.	64
Tabla 14. Posición de acoplamiento de los ligandos no endógenos que tuvieron una energía libre de unión superior al inhibidor endógeno B89/tepraloxidim en la enzima ACC1	66
Tabla 15. Resultado de la interacción entre un inhibidor endógeno y dos ligandos no endógenos con la proteína ACC2.	70
Tabla 16. Posición de acoplamiento de los ligandos no endógenos en la enzima ACC2.	72
Tabla 17. Lista de propiedades farmacocinéticas de los siete compuestos seleccionados.	73
Tabla 18. Lista de propiedades de toxicidad.	75
Tabla 19. Lista de compuestos bioactivos y algunos reportes experimentales relacionados con los lípidos y cáncer.	86

LISTA DE ANEXOS

Tabla A1. Efecto del EE de hojas de <i>Passiflora edulis</i> sobre SW480 y HFF a 24 y 48 horas.	124
Tabla A2. Porcentaje de hemolisis de los tratamientos del extracto etanólico sobre los eritrocitos.	124
Tabla A3. Contenido de colesterol y triglicéridos intracelulares durante 24 y 48 horas.	125
Tabla A4. IC ₅₀ estimada mediante regresión lineal de triglicéridos y colesterol extracelular en SW480 a 24 y 48 horas.	125

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

- ABCA1:** transportador de casete de unión a ATP A1
- ABCG1:** transportador de casete de unión a ATP G1
- ACC:** acetil-CoA carboxilasas
- ACLY:** ATP-citrato liasa
- ACSS2:** acetil-CoA sintetasa 2
- ADME:** absorción, distribución, metabolismo y excreción
- ADMET:** absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad
- AG:** ácidos grasos
- ATCC:** American Type Culture Collection
- AV:** Autodock Vina
- CADD:** Diseño de fármacos asistido por ordenador
- CC:** Cáncer colorrectal
- CST:** células sin tratamiento
- DL50:** dosis letal media prevista
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's médium
- EE:** extracto etanólico
- EGFR-TKI:** Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors
- EPA:** proantocianidinas extraíbles de la dieta
- ES:** extracto seco
- FASN:** ácido graso sintasa
- GL:** gotas de lípidos
- HDL:** lipoproteínas de alta densidad
- HFF:** Fibroblastos de prepucio humano
- HMG-CoA:** 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A
- HMGCR:** 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A reductasa
- IC₅₀:** concentración letal media

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MMFF94: campo de fuerza molecular de Merck

MVA: Vía del mevalonato

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

QSARs: Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad

Ro5: regla de cinco de Lipinski

SCD: esteroil-CoA desaturasa

SDS: dodecilsulfato sódico

SI: Índice de Selectividad

TAZ-Survivina: coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ

TG: triacilgliceroles

TTF-1: factor de transcripción que aumenta la actividad del ABCA1

YAP: proteína asociada a Yes

ΔG : energía libre de Gibbs

RESUMEN

El cáncer para poder prosperar en condiciones de suministro deficiente de sangre e hipoxia, debe adaptar su metabolismo, incluido el de los lípidos. Por consiguiente, la desregulación del metabolismo de lípidos en el cáncer implica múltiples aspectos, incluido un aumento de la captación de lípidos, síntesis de ácidos grasos endógenos de *novo*, oxidación de ácidos grasos y acumulación de colesterol, lo que promueve el crecimiento y la progresión tumoral. El uso de compuestos bioactivos obtenidos de plantas es de gran interés porque, por ejemplo, los flavonoides, triterpenos, entre otros, han mostrado efectos significativos sobre la regulación del metabolismo lipídico. El objetivo del trabajo es evaluar el efecto del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis* sobre las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC) e hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoAR) en células de adenocarcinoma colorrectal de humano.

Se obtuvo el extracto etanólico de hojas de *P. edulis*; se realizó la caracterización de sus componentes bioactivos, se evaluó el efecto del extracto sobre la viabilidad celular y en los lípidos intracelulares y extracelulares en células SW480 a concentraciones de 50 µg/ml hasta 3000 µg/ml; finalmente se realizó acoplamiento molecular *in silico* de posibles compuestos bioactivos inhibidores sobre las enzimas estudiadas.

Como resultados, se evidenció que el extracto tiene un mayor contenido fenólico y de polisacáridos. A concentraciones de hasta 500 µg/mL no afecta la viabilidad de las células SW480, HFF y eritrocitos humanos. El extracto a nivel intracelular afectó en mayor proporción tanto a 24 como a 48 horas el contenido total de triglicéridos. Adicionalmente, a nivel extracelular estimuló la expulsión principalmente del colesterol a las 48 horas. *In silico*, se evidenció que siete compuestos entre flavonoides, triterpenos y alcaloides presentaron acoplamientos moleculares óptimos sobre la HMGCR y ACC con posibles efectos inhibitorios. En conclusión, el extracto de *P. edulis* presenta compuestos bioactivos con actividad regulatoria negativa sobre lípidos.

Palabras clave: Maracuyá, HMGCR, ACC, acoplamiento molecular, ensayos *in silico*, triglicéridos, colesterol.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial grave y es la principal causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo y el número de casos aumenta continuamente (1). Esta enfermedad ocupa el segundo lugar en casos de muerte después de los trastornos cardiovasculares en los países desarrollados y en las Américas (2,3). El fenómeno del cáncer se describe por la proliferación incontrolada y la desdiferenciación de una célula normal. La proliferación incontrolada, es una característica común de todos los cánceres que requiere ácidos grasos para la síntesis de membranas y moléculas de señalización, y aunque los cánceres son muy diversos en cuanto a su tipo y etiología, las células cancerosas con frecuencia comparten el atributo de un metabolismo alterado. Por ejemplo, las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos (AG) en las células cancerosas que incluye su biosíntesis, degradación y captación ha recibido poca atención, pero cada vez son más reconocidas. Los AG son necesarios para el almacenamiento de energía, la proliferación de membranas, la generación de moléculas de señalización; los AG pueden esterificarse con glicerol o esqueletos de esterol, generando triacilgliceroles (TG) o ésteres de esterol, respectivamente, y luego almacenarse en gotas lipídicas (4). Por otro lado, se considera que la regulación positiva de la biosíntesis y captación del colesterol, como también, la regulación negativa o el deterioro del flujo de salida de colesterol de las células son consistentes con la carcinogénesis, así mismo, varios estudios revelan que la síntesis del colesterol aumenta en comparación con las células no cancerígenas (5,6). Estas modificaciones metabólicas no son solo transiciones abruptas, sino que pueden llevar varios años debido a la exposición de diferentes factores externos (p. Ej., Radiaciones, tabaquismo, contaminación y organismos infecciosos) e internos (p. Ej., Mutaciones genéticas, afecciones inmunes y hormonas) que pueden causar cáncer. Existen varios tipos de formas de

cáncer en humanos; siendo el cáncer de pulmón, mama y colorrectal las formas más comunes (7).

Alteraciones del metabolismo de los lípidos en el cáncer

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo y progresión del cáncer suelen ir acompañados de cambios marcados en el microambiente del tumor. El rápido crecimiento y expansión del tejido tumoral a menudo conduce a un suministro de sangre deficiente y aberrante, lo que resulta en hipoxia y un suministro limitado de nutrientes. Para prosperar en estas condiciones cambiantes y desafiantes, las células cancerosas adaptan su metabolismo, incluido el de los lípidos. Por consiguiente, la desregulación del metabolismo de los lípidos en el cáncer implica múltiples aspectos, incluido un aumento de la captación de lípidos, síntesis de ácidos grasos endógenos de *novo*, oxidación de ácidos grasos y acumulación de colesterol (importante para la síntesis de membrana y moléculas de señalización), lo que promueve el crecimiento y la progresión tumoral. Particularmente, la elevada síntesis de *novo* de ácidos grasos (AG) es una de las características clave de esta adaptación metabólica que se observa en muchos tipos de cáncer, y generalmente, se cree que es necesario para proporcionar con un suministro constante de AG para la biogénesis de la membrana, la producción de energía y la modificación de proteínas a células cancerosas que proliferan rápidamente (8).

En las células de mamíferos, los AG pueden obtenerse mediante la absorción exógena directa del microambiente circundante o sintetizarse de *novo* mediante el uso de nutrientes, como glucosa o glutamina. Está ampliamente aceptado que un sello metabólico de las células cancerosas es la remodelación lipídica como se dijo anteriormente, donde abarca en general alteraciones en el transporte de AG, lipogénesis de *novo*, almacenamiento como gotas de lípidos (GL) y β -oxidación para generar ATP (9). Respecto a la

lipogénesis de *novo*, es el proceso mediante el cual los átomos de carbono derivados de los carbohidratos como la glucosa y los aminoácidos, incluida la glutamina, se convierten en diversidad de AG. En el tejido normal, la lipogénesis de *novo* se limita a los hepatocitos y adipocitos; sin embargo, las células cancerosas también pueden reactivar esta vía anabólica incluso en presencia de fuentes de lípidos exógenos (10).

El sustrato principal para la síntesis de AG es la acetil-CoA citoplasmática proveniente del citrato o del acetato. Los carbonos de la glucosa o la glutamina contribuyen a la producción de citrato, ya sea por la oxidación del piruvato en el ciclo del TCA o por la carboxilación reductora, respectivamente. Además, en condiciones de estrés metabólico como hipoxia o depleción de lípidos, las células cancerosas regulan al alza la acetil-CoA sintetasa 2 (ACSS2) para generar acetil-CoA a partir de acetato. Otra alternativa, donde el citrato se convierte en acetil-CoA por la ATP-citrato liasa (ACLY), que es el sustrato de las enzimas acetil-CoA carboxilasas (ACC). La carboxilación irreversible de acetil-CoA en malonil-CoA que realiza la ACC es el paso limitante de la lipogénesis de *novo* y por tanto un candidato a blanco terapéutico en este trabajo de investigación. Finalmente, ocurre una condensación de siete moléculas de malonil-CoA y una molécula de acetil-CoA catalizada por ácido graso sintasa (FASN) generando palmitato, un AG saturado de 16 carbonos. La posterior desaturación del palmitato por la esteroil-CoA desaturasa (SCD) produce AG monoinsaturados con un doble enlace en la posición $\Delta 9$, mientras que el alargamiento de AG por elongasas, como ELOVL6, agrega grupos de dos carbonos al palmitato para formar el AG llamado estearato saturado (9) (Figura 1)

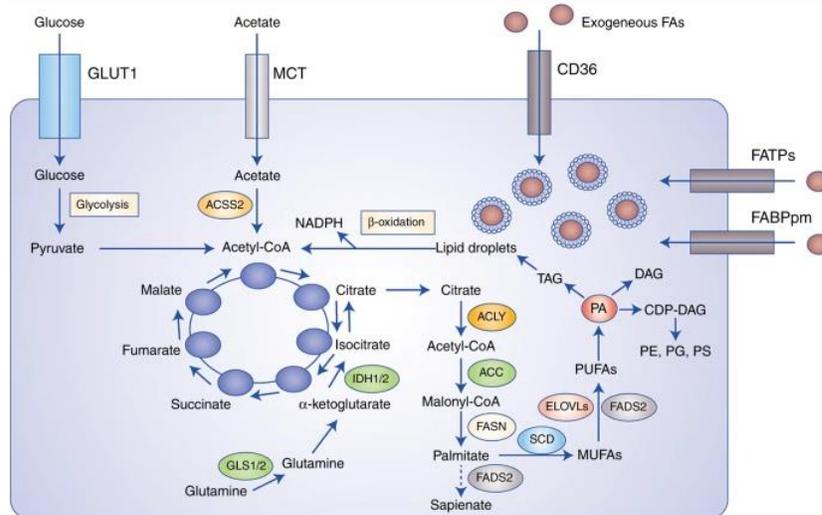


Figura 1. Las células cancerosas obtienen ácidos grasos de la lipogénesis de *novo* y la captación exógena. Tomado de: Koundouros & Poulgiannis, 2020.

Una de las principales ventajas para que las células cancerosas mantengan una mayor lipogénesis de *novo* de los ácidos grasos es su flexibilidad para desviarlos a diferentes vías biosintéticas, y así generar un grupo celular diverso de especies de lípidos con funciones distintas. De hecho, se ha demostrado que la regulación al alza de la síntesis de lípidos, seguida de las vías de elongación y desaturación aguas abajo, es suficiente para producir todos los AG a partir de nutrientes, como glucosa, glutamina y acetato, que son necesarios para la diferenciación de adipocitos (9).

Dado que los AG son esenciales para la proliferación de células cancerosas, limitar su disponibilidad podría proporcionar una estrategia terapéutica. Desde la perspectiva del metabolismo de lípidos, limitar la disponibilidad de AG podría lograrse de varias maneras: 1) bloqueo de la síntesis de AG, 2) aumento de la degradación de AG por oxidación, 3) desviación de los AG al almacenamiento en gotas lipídicas, o 4) disminución de la liberación de AG del almacenamiento (Figura 2). La limitación de AG a través de estos mecanismos podría lograrse de forma aislada o de manera combinatoria (11).

Se ha descrito una variedad de inhibidores de ACC estructuralmente diversos en la literatura científica y de patentes. También, se han revisado las características estructurales, bioquímicas y farmacológicas de estos inhibidores (12).

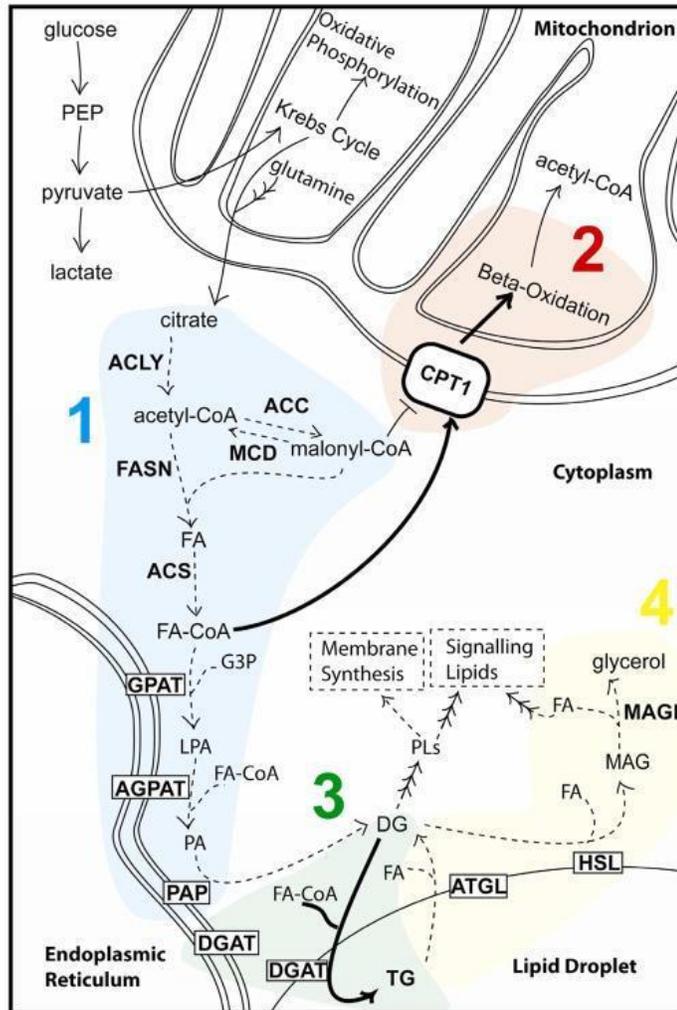


Figura 2. Modelo que muestra cómo la limitación de AG en la célula puede limitar la proliferación de células cancerígenas. Esto puede hacerse 1) bloqueando la síntesis de AG, 2) aumentando la tasa de degradación de AG, 3) aumentando el almacenamiento de AG en TG neutro, y / o 4) disminuyendo la liberación de AG del almacenamiento. Tomado de: Currie et al, 2013.

Por otra parte, el colesterol es vital para la supervivencia y el crecimiento de las células de los mamíferos. Más que un componente de la membrana, el colesterol es un precursor de los ácidos biliares y las hormonas esteroideas,

que pueden iniciar o promover los cánceres de colon, mama y próstata. La homeostasis del colesterol implica la interacción entre la síntesis de *novo*, la captación de colesterol de la dieta (lipoproteínas de baja densidad - LDL o lipoproteínas de alta densidad - HDL) y la eliminación del exceso de colesterol de los tejidos periféricos (13) (Figura 3). En el cáncer, el metabolismo reprogramado del colesterol puede proporcionar una plataforma de transducción de señales y activar la señalización oncogénica (como la vía Hedgehog, mTORC1) como segundo mensajero o componente de las balsas lipídicas, contribuyendo así a la progresión e invasión del cáncer (14). Esto quiere decir que las células cancerosas requieren altos niveles de colesterol para la biogénesis de la membrana y otras necesidades funcionales, por ejemplo, el oncometabolito derivado del colesterol 6-oxo-colestán-3 β , 5 α -diol, que está enriquecido en pacientes con cáncer de mama, se une a los receptores de glucocorticoides y posteriormente promueve el crecimiento tumoral (15).

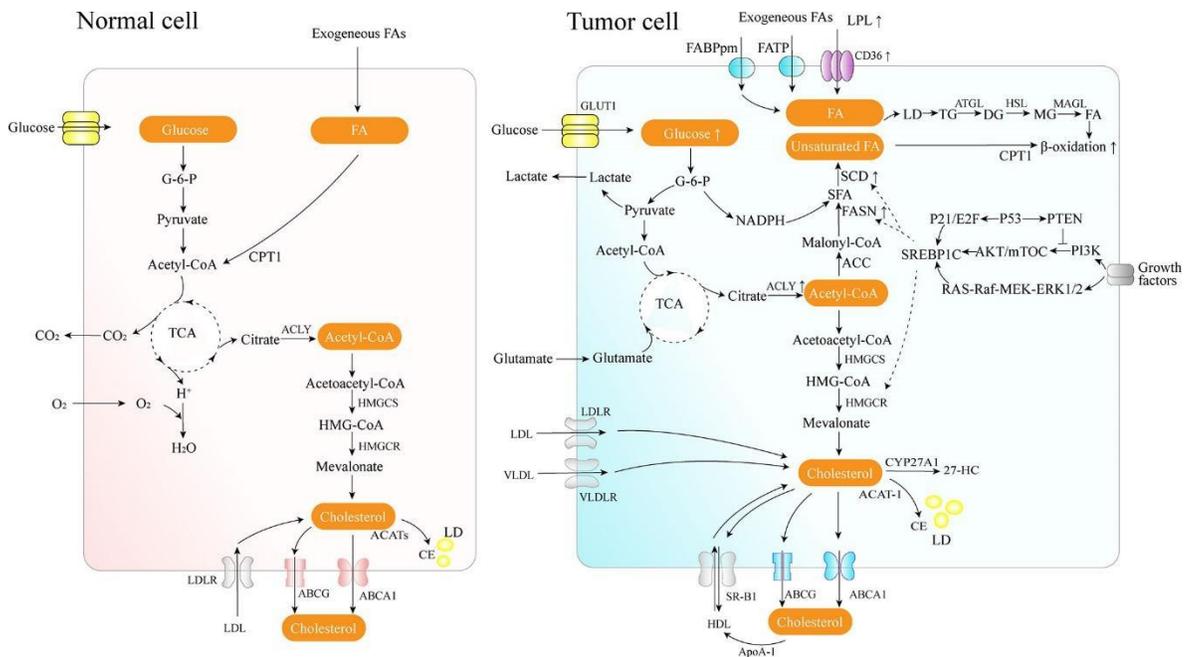


Figura 3. Descripción general del metabolismo de los lípidos en células normales y cancerosas. Las células cancerosas adquieren AG derivado de la dieta a través de

LPL, CD36, FATP y FABPpm. La homeostasis del colesterol implica la interacción entre la síntesis *de novo* (vía del mevalonato), captación de colesterol de la dieta y eliminación del exceso de colesterol de los tejidos periféricos. Tomado de: Wang et al, 2020.

El colesterol se sintetiza a través de la vía del mevalonato (MVA) y está regulado por su enzima limitante de velocidad, 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A reductasa (HMGCR), que cataliza la reducción de 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-CoA) a mevalonato. En pacientes con glioblastoma, se ha encontrado que las células madre cancerosas sobre expresan los genes de la vía del mevalonato, y el oncogén MYC (genes reguladores y protooncogenes que codifican factores de transcripción) puede alterar el metabolismo del MVA.

Clendening et al,(16) realizaron un metanálisis que incluyó a 865 pacientes con cáncer de mama primario, encontraron que niveles altos de ARNm de genes de HMGCR y de la vía del mevalonato adicionales se correlacionaron con un pronóstico deficiente del paciente y una supervivencia reducida en cancer mamá. También, se encontró que el mevalonato constituye un mecanismo de escape hacia la supervivencia y crecimiento en modelos HER2+ de cáncer de mama resistentes a terapias anti-HER2, en parte a través de la activación de YAP (proteína asociada a Yes) / TAZ-Survivina (coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ) en sentido descendente, particularmente a través de farnesil pirofosfato/geranilgeranil pirofosfato.

Ahora, debido a las funciones vitales y variadas del metabolismo del colesterol en la progresión del cáncer, se ha demostrado que impedir el metabolismo activo del colesterol, por ejemplo, mediante la inhibición de la vía del MVA, es una estrategia antitumoral factible (15). Por consiguiente, se puede dirigir la búsqueda al blanco enzimático HMGCR ya que es una enzima limitante de velocidad de la ruta del mevalonato. Por ejemplo, hasta la fecha, las estatinas inhibidoras de la HMGCR han sido los fármacos dirigidos al metabolismo del

colesterol más ampliamente utilizados en estudios clínicos para pacientes con cáncer, desencadenando una respuesta robusta de retroalimentación homeostática que asegura que las células regulen y restauren la vía MVA⁵. Se ha demostrado también, que las estatinas benefician a los pacientes con cáncer de pulmón que reciben terapia con los inhibidores de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-TKI) con mejores tasas de respuesta, supervivencia prolongada sin progresión y supervivencia general al reducir el colesterol celular, inducir la pérdida de expresión de Cav1 y desencadenar la apoptosis para suprimir el crecimiento de células de NSCLC. Además de la inhibición del colesterol, las estatinas inhiben los procesos independientes del colesterol, incluida la proliferación celular y la señalización intracelular. Sin embargo, las estatinas no se asociaron con un riesgo reducido de cáncer de páncreas en los ensayos clínicos(17). Una posible razón es que también se requiere HMGCR para la prenilación de proteínas aguas abajo, un proceso crítico para la activación de proteínas. Por lo tanto, las estatinas no solo inhibe la síntesis de colesterol, sino también otras vías que pueden producir toxicidad para las células normales (15). Esta toxicidad inespecífica es una posible razón del resultado limitado contra el cáncer de las estatinas en los ensayos clínicos de tratamientos contra el cáncer.

El cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CC) es una de las formas más peligrosas de cáncer, con potencial para propagarse a distintas partes del cuerpo, incluidos el hígado, los pulmones, los ovarios y otros órganos gastrointestinales. Cada año se producen en la región de las Américas más de 240.000 nuevos casos y aproximadamente 112.000 muertes debidas a esta enfermedad. A pesar de los avances en la tecnología para el diagnóstico y tratamiento (16), su incidencia continúa en aumento y si no se toman acciones al respecto, se

prevé que, para el año 2030, la incidencia de cáncer colorrectal aumente en un 60 % (3). Este cáncer es el tercer tipo con mayor número de casos reportados para hombres y el sexto para mujeres en Colombia, con un total de 15,744 casos para ambos sexos (periodo 2017), un total de 1,802 personas fallecieron con este diagnóstico y se evidenció un aumento en el número de casos con respecto a los dos años anteriores, además, su frecuencia aumenta regularmente con la edad, con un promedio de diagnóstico de 72 años (17).

Papel de los compuestos bioactivos naturales en el cáncer

Hasta ahora, el 5-fluorouracilo (5-FU) es la primera opción para el tratamiento del CC ya que actúa como inhibidor de la síntesis de ADN (18). Sin embargo, si bien los medicamentos sintéticos contra el cáncer prolongan la supervivencia, exhiben una toxicidad relativamente alta no solo para las células tumorales, sino también para las células normales en la parte del cuerpo donde se ha desarrollado el cáncer. Con base a lo anterior, actualmente la búsqueda de nuevos candidatos a fármacos contra el cáncer se está llevando a cabo entre las plantas terrestres, así como en ambientes marinos, por consiguiente, en los últimos años ha aumentado la investigación respecto a la búsqueda y caracterización de compuestos bioactivos direccionada al tratamiento del CC (19). Estos compuestos tienen una amplia historia y aplicaciones significativas en la medicina moderna, por ejemplo, se utilizan en industrias medicinales y comerciales para cosméticos, productos alimenticios y aditivos (20).

En el caso de las plantas, se han utilizado en la medicina tradicional durante siglos demostrando que son fuentes abundantes de compuestos bioactivos que poseen una alta actividad biológica (21). Existen múltiples formas para obtener estos compuestos bioactivos de forma rápida y fácil, un enfoque es el método de percolación, un segundo, es utilizar herramientas biotecnológicas como la síntesis química para producir compuestos químicos anticancerígenos

derivados de plantas. En lo experimental, actualmente existe un número amplio de investigaciones que han demostrado las propiedades antitumorales perteneciente a varios grupos de compuestos, como alcaloides, diterpenos, diterpenoquinona, compuestos a base de purina, sesquiterpeno lactónico, péptidos, depsipéptidos cíclicos, proteínas, poliéteres macrocíclicos, polifenoles, etc (22). La ventaja de trabajar con compuestos derivados de plantas y no sintéticos, es que, en ocasiones, el costo de extracción de estas moléculas vegetales es mucho más bajo que el costo de su síntesis química, además de obtener mayor cantidad del compuesto (23).

***Passiflora edulis* y hallazgos en el cáncer**

El género de plantas conocido como *Passiflora* comprende cerca de 500 especies y es el más grande en la familia Passifloraceae. Especies de este grupo han sido empleadas por la medicina tradicional en diferentes poblaciones y constituye una enorme riqueza no solo en términos de diversidad y de recurso genéticos, si no a nivel económico respecto al uso nutricional de algunas de sus especies (24).

La información etnofarmacológica revela que el género *Passiflora* ha sido utilizado en medicina tradicional en diversas partes del mundo. En Brasil, por ejemplo, diferentes partes de la planta de especies de este género se emplean para el tratamiento de dismenorrea, epilepsia, quemaduras, hemorroides, y como diurético y analgésico (25,26). En la India se ha empleado para disminuir la dependencia a opiáceos por sus propiedades ansiolíticas (27,28). En Europa se ha empleado para el tratamiento de constipaciones e infecciones leves (29). En América, es el grupo más comúnmente utilizado en la fitoterapia occidental contemporánea. A este género, se le han atribuido propiedades anti-inflamatorias (30) y se ha empleado como tratamiento para enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la hipertrigliceridemia y la

hipercolesterolemia, problemas de la piel, enfermedades respiratorias como la bronquitis, asma, entre otras (31).

Passiflora edulis, una especie del género *Passiflora*, es una planta originaria de la Amazonía brasileña, conocida con el nombre común de maracuyá, parchita, o fruto de la pasión, este grupo taxonómico presenta un interés particular para la búsqueda de compuestos con actividad biológica (32). Las hojas y el fruto de la maracuyá ha sido ampliamente utilizado en medicina tradicional, y especialmente en cáncer colorrectal se ha logrado demostrar que tiene capacidad para inhibir las metaloproteinasas 2 y 9, dos metaloproteasas implicadas en la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis (33). También, se ha logrado demostrar una disminución en la viabilidad y una mayor actividad de las caspasas 3 y 7 en líneas celulares de cáncer de colon SW480 y Caco2, como también un potencial proapoptótico y citotóxico en las que fueron inducidas por los fitoquímicos presentes en el extracto etanólico de *P. edulis* (34,35). También Aguillón et al, (36) sugieren que las hojas de *P. edulis*, son una fuente potencial de compuestos fitoquímicos con propiedades antioxidante y antiproliferativas en líneas celulares de cáncer colorrectal SW620 y SW480, en otras especies del género *Passiflora* también se ha reportado que el extracto etanólico de hojas de especies como *P. foetida* y *P. incarnata* presentan efecto citotóxico *in vivo* y anti-tumoral *in vitro* (37).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la pectina y las fibras de *P. edulis* pueden reducir los niveles de colesterol y glucosa en sangre (38). En términos generales, con el desarrollo de la economía y la conciencia de la gente sobre la protección, la cáscara se ha utilizado ampliamente en la producción industrial de pectina. Es una materia prima alimentaria funcional ampliamente utilizada con alto valor para reducir los niveles de colesterol, reducir la hiperlipidemia y la hipertensión, mejorar la tolerancia a la glucosa y la respuesta a la insulina, útil para la salud gastrointestinal y la prevención de algunos cánceres (38). Así mismo, He et al, (31) mencionan que la

administración oral de pectina de la cáscara de la fruta de *P. edulis* entre 0,5 a 25 mg/kg durante 5 días redujo eficazmente los niveles de triglicéridos en ratas diabéticas, y la fibra insoluble derivada de la semilla de *P. edulis* redujo los triglicéridos séricos y el colesterol total, el colesterol hepático aumentó los niveles de colesterol, lípidos totales y ácidos biliares en las heces de hámsters sirios dorados (39).

Por estas razones, junto con la presencia de varios fitoquímicos como polifenoles, esteroides y glucósidos cardíacos en el extracto (40), es que *P. edulis*, puede considerarse una especie promisorio para la búsqueda de compuestos fitoterapéuticos o fitopreventivos para el tratamiento de la hiperlipidemia mostrada en las células del CC.

Acoplamiento molecular: un enfoque para el descubrimiento de fármacos basado en estructuras

Como se evidenció en los ítems anteriores, uno de los intereses de esta investigación son los blancos terapéuticos enzimáticos HMGCR y ACC las cuales son enzimas limitantes de dos rutas de síntesis de *novo* de lípidos, que son la del colesterol y triglicéridos, respectivamente. Como se ha evidenciado en los antecedentes anteriores, *P. edulis* tiene actividad reductora sobre el contenido total de colesterol y triglicéridos, sin embargo, estos estudios son generales y no mencionan cuales serían los posibles compuestos bioactivos que estarían modulando la actividad de ambas enzimas, importancia para este trabajo de investigación. De ahí el interés, de investigar y explorar los compuestos bioactivos con posibles actividades inhibitoras sobre la HMGCR y ACC que podrían utilizarse para diseñar un nuevo fármaco hipolipidémico o hipolipemiente con efectos secundarios mínimos o nulos.

El diseño de fármacos *in-silico* consiste en enfoques teóricos y computacionales que se pueden utilizar para identificar nuevos aciertos o pistas contra macromoléculas biológicas activas seleccionadas. En la

actualidad, el diseño de fármacos asistido por ordenador o “Computer-Aided Drug Design” (CADD), como el modelado de farmacóforos, el cribado virtual, el acoplamiento molecular y la simulación dinámica se utilizan ampliamente para descubrir, desarrollar y analizar fármacos y moléculas biológicamente activas similares (41). En el enfoque CADD, los métodos de acoplamiento molecular predicen interacciones de proteína y ligando con sus afinidades de unión y la orientación de esa unión en los complejos proteína-ligando. La capacidad de unión de un ligando con una proteína específica está asociada con su estructura molecular, orientación y conformación. Hay dos pasos en los métodos de acoplamiento: puntuación basada en energía y muestreo geométrico para determinar la afinidad de unión del ligando/proteína. Según la función de puntuación de los procedimientos de acoplamiento, se encuentra la mejor disposición de unión del ligando a la proteína diana, esa disposición depende de las afinidades de unión predichas. Existe una relación directa entre las puntuaciones de alta energía y la afinidad de unión proteína-ligando (42).

Los métodos computacionales ofrecen ventajas llamativas ya que la actividad biológica de un compuesto se puede evaluar, siempre que el compuesto se una a la macromolécula diana y desencadene una respuesta específica (experimental). El cálculo de la capacidad de unión de un compuesto requería mucho tiempo y era costoso en el desarrollo de fármacos convencionales debido a que requería un experimento *in vitro* e *in vivo* a gran escala (43), en ese caso, el enfoque de acoplamiento molecular *in silico* lo hace más fácil y en poco tiempo. Propiedades farmacocinéticas y farmacológicas como absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) incluso la toxicidad de un compuesto puede predecirse mediante el uso de un proceso de diseño de fármacos asistido por computadora. Por lo tanto, parte de esta investigación se centró principalmente en el proceso de diseño de fármacos asistido por computadora, como el modelado de un mapa tridimensional del sitio activo

basado en la estructura, la detección virtual, ADMET y el acoplamiento molecular para identificar los posibles antagonista o inhibidores naturales contra las enzimas HMGCR y ACC para tratar el cáncer, desde el punto de vista de la lipidómica (43).

Basado en todo lo anterior, se crea la necesidad e interés de investigar a nivel celular y bioinformático el efecto del extracto de *P. edulis* sobre las enzimas que cumplen un importante papel en el metabolismo de lípidos en las células de cáncer colorrectal. Este estudio nos permitió contribuir para la bioprospección de nuestra biodiversidad de plantas terrestres orientada a la farmacología antineoplásica.

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis* sobre las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC) e hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoAR) en células de adenocarcinoma colorrectal de humano.

Objetivos específicos

- Caracterizar los compuestos fitoquímicos del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis*.
- Evaluar el efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de *Passiflora edulis* en células de adenocarcinoma colorrectal de humano (SW480) y Fibroblastos de prepucio humano (HFF).
- Evaluar el efecto sobre los niveles lipídicos (colesterol y triglicéridos) tanto intracelular como extracelular en células de adenocarcinoma colorrectal de humano SW480.
- Identificar *in silico* compuestos bioactivos de *Passiflora edulis* similares a fármacos potenciales que pueden inhibir las enzimas diana HMGCR, ACC1 y ACC2 involucradas en el metabolismo lipídico.

3. METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE HOJAS Y EXTRACTO VEGETAL

Localización

Las hojas de *P. edulis*, se recolectaron en el corregimiento Tierra Blanca (Roldanillo, Valle del Cauca, Colombia), ubicada en las coordenadas geográficas globales 4° 24' 0" N, 75.8489° a 939 msnm (Figura 4). Las muestras se transportaron al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío, donde se procedió a realizar el lavado del material y la obtención del extracto.

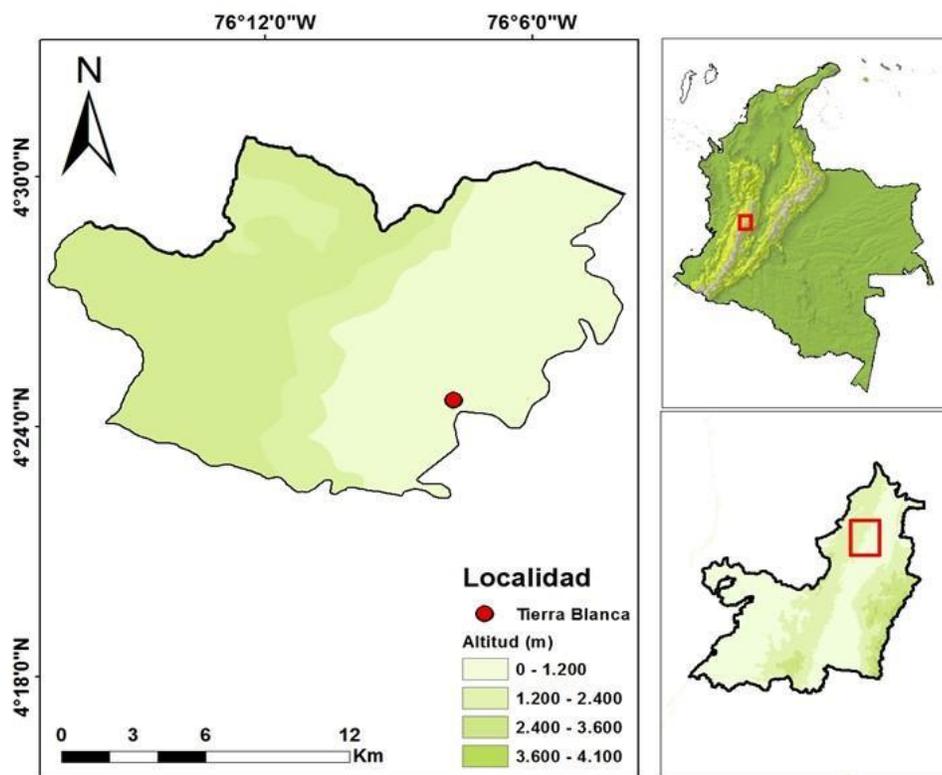


Figura 4. Mapa con coordenadas geográficas globales y georreferencia del corregimiento Tierra Blanca (Roldanillo, Valle del Cauca, Colombia).

Material vegetal

Las hojas de *P. edulis*, se recolectaron entre las 6:00 am y 8:00 am verificando que el vegetal estuviera completamente sano. Es decir, que por observación visual directa no se evidenciaran lesiones sobre los tejidos causada por plagas, enfermedades o el ambiente. Las muestras vegetales una vez adquiridas, fueron transportadas en bolsas de cierre hermético al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío para su procesamiento.

Preparación del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis*

Las hojas de *P. edulis*, fueron inicialmente lavadas con agua de grifo y luego con agua destilada para eliminar suciedades. El material vegetal se desecó en un horno de aire circulante a una temperatura constante de 40°C. Una vez seco, fue pulverizado utilizando un molino y se lixivió durante 8 días usando 500 ml de etanol al 96% (el lixiviado fue recirculado constantemente). Luego, se procedió a separar la clorofila del extracto etanólico mediante una extracción líquido-líquido con etanol-agua (1:1) (44) y se filtró con tamaño de poro de 11 µm. El etanol fue evaporado a presión reducida (60 mbar) y a temperatura inferior de 30 °C en un rotaevaporador. La suspensión resultante aún líquida, se sometió a liofilización (Telstar LyoQuest). El extracto etanólico (EE) de hojas de *P. edulis* se almacenó protegido de la luz a -20°C hasta su uso.

Análisis fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis*

Contenido total de fenoles. Se determinó empleando el método del reactivo de Folin Ciocalteu (45). Se tomó una alícuota de 50 µL del EE (1 mg/mL) y se adicionó 2,5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu (dilución 1/10 de agua destilada) y 2 mL de carbonato de sodio (NaCO₃) al 7,5% (p/v), se mezcló hasta homogenizar y se incubó a 40°C durante 15 minutos. Como blanco se utilizó una solución de 2mL de Na₂CO₃ en 2 mL de agua destilada, y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Los

resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (ES) (mg EAG/g ES).

Contenido total de polisacáridos. Se determinó empleando el método fenol-ácido sulfúrico (46). Se tomó una alícuota de 100 μL del EE (1 mg/mL) y se le adicionaron 100 μL de fenol al 5% y 500 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 95%, se mezcló hasta homogenizar y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se realizó la lectura a una longitud de onda de 490 nm y se empleó como blanco agua destilada más H_2SO_4 . Los resultados se expresaron como mg equivalentes de glucosa por gramo de extracto seco (mg EG/g ES).

Contenido total de taninos. Se tomó una alícuota de 250 μL del EE (1 mg/mL) y se adicionó 500 μL de solución de albumina de suero bovino en tampón acético 0,2 M con pH 5.0 (se ajustó el pH con NaCl al 0,17 M), se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar por 15 minutos. Luego se centrifugó a 5000 g por 15 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue diluido con 1 mL de solución acuosa que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% y trietanolamina al 4%. Finalmente, se agregó 250 μL de cloruro férrico (FeCl_3) al 0.01 M en ácido clorhídrico (HCL) al 0.01 M y se dejó reposar por 30 minutos. Se realizó la lectura a una longitud de onda de 510 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de solución acuosa (SDS al 1% y trietanolamina al 4%) en 250 μL de la solución de FeCl_3 al 0.01 M en HCL al 0.01 M. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido tánico por gramo de extracto seco (mg EAT/g ES) (47).

Contenido total de flavonoides. Se tomó una alícuota de 150 μL del EE (1 mg/mL) y se agregó 45 μL de nitrato sódico (NaNO_3) al 5%. En el minuto cinco y seis se agregó respectivamente, 90 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10% y 300 μL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. El volumen final de mezcla se aforó con agua destilada hasta completar 1,5 mL. Finalmente, se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se realizó la

lectura a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por gramo de extracto seco (mg EC/g ES) (47).

Contenido total de alcaloides. Se determinó empleando el método de verde bromocresol (48). Se tomó una alícuota de 1 mL del EE (1 mg/mL) y se agregaron 5 mL de tampón fosfato (pH 4,7) y 5 mL de solución de verde bromocresol, seguidamente, se agregó 2 mL de cloroformo y se mezcló, se repitió este último paso 2 veces más, por último, el extracto se recogió en un matraz volumétrico de 10 mL y se realizó la lectura a una longitud de onda de 470nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quinina por gramo de extracto seco (mg EQ/g ES).

VIABILIDAD SOBRE CÉLULAS ADHERENTES

Líneas celulares

Se evaluó una línea celular tumoral de adenocarcinoma de colon humano (SW480) y una línea celular no tumoral de fibroblastos de prepucio humano (HFF). Las células SW480 fueron donadas por la Dra. María Elena Maldonado Grupo de Investigación Impacto de los Componentes Alimentarios en la Salud, Universidad de Antioquia) quien las obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC Manassas, USA). La línea celular SW480 (Figura 5) se originó a partir de una fracción quirúrgica de tumor primario, moderadamente diferenciado (Duke's, tipo B) (49,50).



Figura 5. Células de adenocarcinoma de colon humano SW480 con objetivo de 40X (400X de magnificación).

Además, para verificar la posible toxicidad de los compuestos para las células normales no tumorales, también se analizó su efecto inhibitor del crecimiento en la línea celular de fibroblastos de prepucio humanos HFF (Figura 6). Estas células fueron cedidas por el Grupo de Investigación en Parasitología Molecular, Gepamol, adscrito al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, y se emplearon para determinar el Índice de Selectividad (SI) de los tratamientos evaluados, definido como la relación de citotoxicidad entre células normales no tumorales y células tumorales. Cualquier tratamiento que reporte el valor de SI superior a 3 se considera que tiene alta selectividad (51).

$$(1) \quad SI = \frac{CI50 \text{ en las células HFF}}{CI50 \text{ en las células de cáncer de colon SW480}}$$

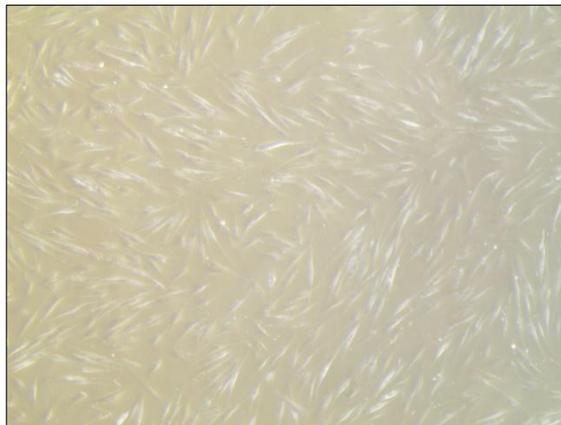


Figura 6. Fibroblastos de prepucio humano normal de recién nacido combinado de dos individuos con objetivo de 40X (400X de Magnificación).

Condiciones de cultivo y mantenimiento SW480

La línea celular SW480 y HFF fueron mantenidas y propagadas en frascos de cultivo Falcon de 25 cm³ en medio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) con 25 mM de glucosa y 2 mM de L-glutamina, suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 UI/ml penicilina, 100 µg/mL

estreptomycin (Gibco) y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco). Esta solución se rotuló y empleó como “Medio de mantenimiento”.

Para la propagación de las líneas celulares, el medio de cultivo fue removido y reemplazado cada 48 horas y cada 4 días (tiempo en el que se observó una confluencia superior al 80%) se realizaron procedimientos de subcultivo. Para cada transferencia se descartó el sobrenadante dejando las células adheridas y se lavó la superficie de adhesión celular con tampón fosfato PBS (1X), se adicionó 1ml de tripsina - EDTA (GIBCO) a una concentración de 0.25% durante 5 minutos para ambas líneas celulares, luego se bloqueó la actividad enzimática con 2 ml de solución STOP (Medio DMEM Suplementado con 50% de SFB, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/mL estreptomycin). La suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico de polipropileno estéril y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y el botón celular se re suspendió con 1ml de medio de mantenimiento. Se estimó la viabilidad y concentración celular en cámara de Neubauer por exclusión de colorante con Azul de tripano 0.4% (Gibco). En cada subcultivo se transfirieron 5×10^4 células por frasco T25 en un volumen final de 5 ml medio de cultivo de mantenimiento (52).

La línea celular HFF-1 fue mantenida bajo condiciones y métodos equivalentes a los descritos anteriormente. Sin embargo, estas fueron expandidas con suero fetal bovino (SFB) al 15%. Además, fueron transferidas 1×10^5 células por frasco T25 para alcanzar la confluencia deseada cada 8 días (de acuerdo con lo establecido en el laboratorio de bioquímica y genética de la Universidad del Quindío). Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% y 5% de CO₂, los diferentes ensayos biológicos se realizaron mientras las células se encontraban en fase exponencial y confluencia menor al 90%.

Ensayos biológicos

Para todos los experimentos el medio de cultivo se modificó. El suero se redujo al 3%, el resto de los componentes como el medio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicilina, estreptomina y aminoácidos no esenciales se mantuvieron en concentraciones iguales a las del medio de mantenimiento. Este medio de cultivo de mantenimiento modificado fue empleado para las SW480 y HFF.

El control empleado en cada ensayo fueron: células sin tratamiento (CST) como control de ensayo o tratamiento, no fue necesario emplear un control positivo debido a que el contraste o comparación de los tratamientos se realizó respecto a las CST, así mismo, no fue necesario emplear un control de solvente debido a que el extracto etanólico empleado estaba liofilizado y se disolvió en el medio de mantenimiento modificado para los ensayos biológicos.

Para la evaluación del efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre la viabilidad celular tanto para SW480 y HFF, como también sobre eritrocitos humanos, las concentraciones de EE utilizadas fueron 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000 y 3000 µg/mL. Por otro lado, para evaluar el efecto del EE de hojas de *P. edulis* sobre lípidos totales las concentraciones fueron 50, 100 y 200 µg/mL.

Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Passiflora edulis* sobre la viabilidad celular mediante el método de Sulforodamina B

El ensayo se realizó de acuerdo a lo establecido por (53), con algunas modificaciones. Para esta prueba se cultivaron 5000 células/pozo de cada una de las líneas celulares en placas de cultivos de 96 pozos en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo de mantenimiento modificado y se incubaron a diferentes tiempos (24 y 48 horas) en presencia de los tratamientos del extracto etanólico de hojas de *P. edulis*. Una vez transcurrido el periodo de exposición del extracto, los cultivos fueron interrumpidos adicionando 100 µl

de ácido tricloroacético frío a una concentración de 15%(v/v) a cada pozo. Inmediatamente, los cultivos se incubaron a 4°C durante 1 hora en oscuridad. Después de este periodo, se removió el ácido y se realizaron 4 lavados rápidos con agua de grifo y se dejó secar a temperatura ambiente, después, se adicionó 100 µl de Sulforodamina B (SRB) (0.4% p/v diluida en ácido acético 1%) por pozo. La solución de colorante se mantuvo en las células adheridas y fijadas por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente los excesos de SRB se removieron lavando la superficie de adhesión con ácido acético (1% v/v en agua destilada). Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante un día.

Para la lectura de absorbancia, la SRB unida a las proteínas se solubilizó adicionando 200 µl de buffer Tris-HCl (10 mM pH10.5) a cada pozo y se agitó de forma orbital durante 15 minutos. La densidad óptica de lectura fue 490 nm por espectrofotometría.

Se realizaron tres ensayos biológicos, y cada ensayo por triplicado para cada tratamiento y controles. Para los resultados se construyeron gráficas de porcentaje de viabilidad para cada tiempo y se reportó la concentración inhibitoria media (IC50) por regresión lineal (concentración de inhibidor necesaria para que un proceso biológico se reduzca a la mitad) (54).

$$(2) \quad \% \text{ de viabilidad} = \left(\frac{AB_t}{AB_c} \right) * 100$$

AB_T= Absorbancia de los tratamientos

AB_C= Absorbancia del control de tratamiento CST (células sin tratamiento)

EVALUACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* EN ERITROCITOS HUMANOS

Para determinar si los compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas de *P. edulis*, causan citotoxicidad en células humanas normales, se evaluó la capacidad de causar disrupción a la membrana celular de eritrocitos humanos por inducción de lisis celular (fenómeno indeseado para fármacos o extractos de plantas medicinales) (55).

Se evaluó de acuerdo con el procedimiento descrito por Nabavi et al, (56). Se obtuvo una muestra de sangre de donante voluntario sano para enfermedades hemolíticas, por punción venosa en tubos con heparina. La sangre se centrifugó a 3800 rpm durante 10 minutos, se eliminó el plasma y los leucocitos. Los eritrocitos (precipitado celular) se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 centrifugando a 2500 rpm durante 10 minutos cada vez. Posteriormente, se adiciono 1 mL de la suspensión de eritrocitos en PBS al 5% (v / v) a cada tratamiento de 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000 y 3000 µg/mL y controles 500 µL (preparados en PBS), se mezcló con cuidado y se incubó a 37°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, se añadieron 4 mL de PBS a 37°C, luego, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. Se utilizaron ácido ascórbico a 500 µg/mL y peróxido de hidrogeno a 100 mM como control negativo y positivo, respectivamente. Además, se reportó la concentración letal media (IC50) para cada tratamiento por regresión línea (concentración de inhibidor necesaria para que un proceso biológico se reduzca a la mitad) (55). Por último, los valores hemolíticos son expresados en porcentaje de hemólisis y se calculó como:

$$(4) \quad \% \text{ Hemolisis} = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

Am: Absorbancia de los tratamientos

Ac: Absorbancia del control

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* SOBRE LÍPIDOS TOTALES (COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS)

Para esta prueba se cultivaron 5000 células SW480/pozo en cajas de Petri plásticas y estériles en un volumen final de 3000 μ l de medio cultivo de mantenimiento modificado (confluencia superior al 80%), y se incubaron a diferentes tiempos (24 y 48 horas) en presencia de los diferentes tratamientos del extracto etanólico de hojas de *P. edulis*. Se cuantificaron los niveles de colesterol y triglicéridos tanto intracelular (lisado celular) como extracelular (medio de cultivo almacenado al momento de finalizar la exposición de los tratamientos) de cada tratamiento y CST.

Lisis celular

Una vez transcurrido el periodo de exposición del extracto, se removió el medio de cultivo y se almacenó (lípidos extracelulares para cuantificación), posteriormente, la monocapa se lavó con PBS 1X y se procedió a lisar las células con 1000 μ L de buffer de lisis (Hepes 20 mM, NaCl 420 mM, 1% de Tritón, 0.5% SDS, pH 7), inmediatamente, las cajas se incubaron a temperatura ambiente en oscilación constante durante 10 minutos. Se almacenó el lisado celular (lípidos intracelulares para cuantificación) debidamente rotulado a -20°C.

Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA)

El ensayo se realizó de acuerdo a lo establecido por Walker (57). Después de la lisis celular, se tomaron 50 μ L del lisado de cada uno de los tratamientos, controles y patrones, se le adicionó 500 μ L del reactivo de trabajo BCA (50: 1, Solución de ácido bicinconínico/ Solución de pentahidrato de sulfato de cobre 4%) e inmediatamente se cubrieron los tubos de ensayo y se incubó a 37°C durante 30 minutos, por último, se mantuvieron a temperatura ambiente

durante 10 minutos antes de la medición. La densidad óptica de lectura fue 562 nm por espectrofotometría. La curva de calibración se realizó con albumina sérica a concentraciones de 50, 100, 200, 400, 800 1000 y 2000 µg/mL.

Este ensayo se realizó para normalizar los volúmenes que se tomaron de los lisados celulares de los diferentes tratamientos para la extracción y cuantificación de lípidos.

Extracción y cuantificación de lípidos totales (colesterol y triglicéridos)

El ensayo de extracción de lípidos se realizó de acuerdo a lo establecido por Blight & Dyer (58), con algunas modificaciones para cultivo celular (de acuerdo a lo establecido en el laboratorio de bioquímica y genética de la Universidad del Quindío).

Antes de realizar el ensayo, se normalizó el volumen de lisado celular frente a la menor concentración proteica evidenciada ya sea en los tratamientos o CST. De cada uno de los tratamientos y las CST se tomó un volumen de 400 µL normalizado y aforado de lisado celular, la cuantificación de esos lípidos extraídos se realizó por el kit comercial liquicolor (Human) de triglicéridos y colesterol, independientes cada una. Esto mismo se realizó para el medio de cultivo (extracelular). Posteriormente, a este volumen ya sea de lisado celular o medio de cultivo se le adicionó 500 µL de cloroformo y 1 mL de metanol, se agito la solución hasta quedar todo mezclado e inmediatamente se puso en agitación orbital constante durante 1 hora, agitando vigorosamente cada 15 minutos. Seguidamente, se adicionó 500 µL de cloroformo y 500 µL de agua, en este punto se formaron dos fases, la clorofórmica en la parte inferior y la acuosa-metanólica en la parte superior. Después, se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos para lograr una mejor separación de las fases, luego, se removió la fase clorofórmica (contiene los lípidos extraídos) que se encuentra en el fondo del tubo de ensayo hacia otro tubo de vidrio, posteriormente, se

dejó evaporar el cloroformo por completo durante toda la noche. Por último, se adicionó al tubo de vidrio 500 µL de reactivo de cuantificación que provee el kit colorimétrico liquicolor de Human para analizar ya sea colesterol o triglicéridos, se incubó durante 10 minutos (siguiendo las indicaciones del Kit) y se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 500nm indicada en el kit para cada lípido analizado, a su vez, también se leyó la absorbancia del estándar (de triglicéridos o de colesterol) que lo provee el kit siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para los resultados se construyeron gráficas de µg de lípido (colesterol/triglicéridos) por µg de proteína para cada tiempo. Para convertir las absorbancias a una unidad de concentración se empleó la siguiente ecuación recomendada por el kit comercial liquicolor (Human):

$$(3) \quad \text{Concentracion de lípido} = 200 \times \frac{AB_t}{AB_e} \left(\frac{mg}{dl} \right)$$

AB_T= Absorbancia de los tratamientos y controles

AB_e= Absorbancia del estándar ya sea de colesterol o triglicérido

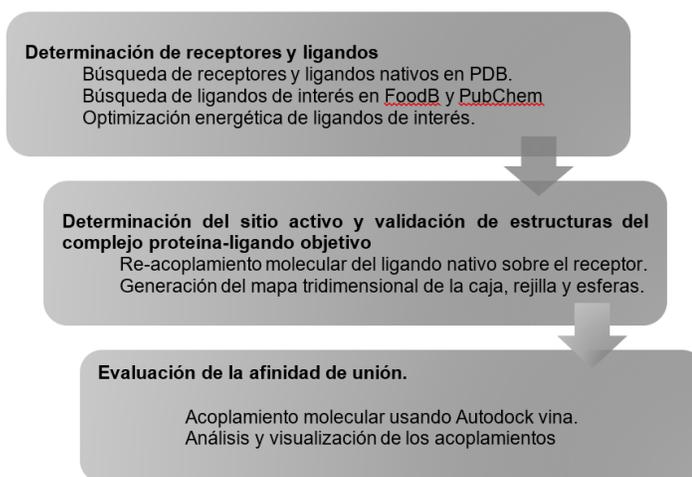
Posteriormente a este cálculo, el valor obtenido se dividió por 40 debido a que en la ecuación (3) se asume que la muestra inicial tenía un volumen de 10 µL, sin embargo, en el experimento se parte de 400 µL, por lo que el valor en mg/dL del lisado o del medio de cultivo es 1/40 del valor obtenido. La cantidad obtenida en mg/dL se convirtió a µg/mL, multiplicando por 10.

Por otro lado, para tener un acercamiento de como los posibles compuestos bioactivos de la *P. edulis* están afectando el contenido total lípidos, se decido realizar un acoplamiento molecular *in silico* contra las dianas HMGCR, ACC1 y ACC2.

EVALUACIÓN *in silico* DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Passiflora edulis* COMO INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL-COA REDUCTASA (HMGCR) Y LA ACETIL-COENZIMA A CARBOXILASA (ACC)

Acoplamiento molecular

El siguiente esquema resume los pasos que se ejecutaron para realizar la evaluación de acoplamiento molecular.



Con el objeto de que esta metodología se pueda desarrollar y reproducir, llevamos a cabo la preparación de receptores y ligandos en el programa UCSF Chimera v.1.12, BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021 y Avogadro, disponibles libre de cargo y en plataformas Linux, Mac y Windows

Determinación de receptores

Se eligieron dos enzimas limitantes involucradas en la síntesis de lípidos como dianas para el descubrimiento de fármacos: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, abreviada oficialmente como HMGCR (también llamada HMG-CoA reductasa con código PDB: 1DQ9) involucrada en la síntesis de colesterol y la Acetil-Coenzima A carboxilasa, abreviada oficialmente como ACC (también llamada Acetil-CoA carboxilasa) involucrada en la síntesis y oxidación de los ácidos grasos, se realizó el acoplamiento molecular con las dos isoformas de la ACC, ACC1 con código PDB: 3K8X y ACC2 con código PDB: 5KKN. Es

importante aclarar, que las tres enzimas cristalizadas contaban con su respectivo ligando control unido y también cristalizado, condición que nos ofrece una ventaja al momento de buscar el acoplamiento del ligando no endógeno sobre cada una de las enzimas.

Preparación del receptor

Las estructuras tridimensionales (3D) de las enzimas estudiadas se recuperaron del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org//pdb>) en formatos pdb. Estas proteínas sirvieron como receptores en el proceso de acoplamiento. Los archivos se abrieron utilizando BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021. Se eliminaron todas las sustancias unidas (ligandos y cofactores cristalizados) y las moléculas de disolvente asociadas al receptor y se almacenaron en formato pdb. Usando Autodock Tools, se agregaron átomos de hidrógeno polares y cargas Kollman a los receptores. Posteriormente, los archivos se guardaron en formato pdbqt.

Determinación de ligandos

La búsqueda y selección de compuestos fue condicionada. Los compuestos de interés y utilizados en el proceso de acoplamiento molecular en este estudio se basaron en experimentos *in vitro* que nosotros (59) y otros investigadores (31) hemos realizado previamente sobre la caracterización de los extractos de hojas, actividad antitumoral y disminución de lípidos totales presentes en *Passiflora edulis*. Estos compuestos fueron Isoorientina Numero (CAS 4261-42-1), Luteolina Numero (CAS 491-70-3), Saponarina Numero (CAS 20310-89-8), Vitexina Numero (CAS 3681-93-4), Quercetina Numero (CAS 117-39-5), Kaempferol Numero (CAS 520-18-3), Ácido cafeico Numero (CAS 331-39-5), Ácido clorogénico Numero (CAS 327-97-9), Ácido gálico Numero (CAS 149-91-7), Quinina Numero (CAS 130-95-0), Pasiflorato de glucosilo Numero (CAS 1392-82-1), Ciclopasiflósido V Numero (CAS 292167-42-1), Ácido ciclopasifloico E Numero (CAS 301540-74-9), Harmane Numero (CAS 486-84-

0), Harmol Numero (CAS 487-03-6) y Moupinamida (Numero CAS 66648-43-9).

Preparación del ligando y optimización energética

Las estructuras de ligando se obtuvieron del sitio PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) y FoodB (<https://foodb.ca/>). La búsqueda se realizó ingresando el nombre del ligando y el numero CAS en la opción de búsqueda. El archivo de cada ligando se descargó en formato pdb y se guardó. En el acoplamiento proteína-ligando, se utiliza un algoritmo de optimización para encontrar la mejor posición de unión de un ligando sobre la proteína diana (receptor), este algoritmo desempeña un papel fundamental en la determinación de la precisión del acoplamiento. Se ejecutó dicho algoritmo a cada uno de los ligandos agregando los átomos de hidrogeno polares y se empleó el campo de fuerza MMFF94 (campo de fuerza molecular de Merck) para optimizar o minimizar la energía del ligando en el vacío empleando el programa Avogadro, de esta forma, se buscan mínimos de baja energía y se considera que los ligandos son completamente flexibles y algunos de los átomos de los receptores (enzimas) son móviles. El resultado final se guardó en formato pdb.

Finalmente, el formato pdb del ligando se abrió usando Autodock Tools donde se le añadieron nuevamente los hidrógenos polares, las cargas de Gasteiger y el archivo se guardó en formato pdbqt. Las propiedades de los compuestos bioactivos (ligandos) se calcularon utilizando la regla de cinco de Lipinski realizado sobre el predictor SWISSADME (<http://www.swissadme.ch/>).

Identificación del sitio de unión y generación de la cuadrícula del receptor

La ubicación de los aminoácidos como sitios activos en la región del receptor donde se acopla el ligando se determinó usando Autodock Tools. Por esta razón, la superficie de acoplamiento molecular fue definida por un mapa tridimensional de la cuadrícula que engloba al sitio activo del receptor. En el

acoplamiento de las tres enzimas (HMGCR, ACC1 y ACC2), el mapa tridimensional solo tenía el tamaño del área que se iba a acoplar (acoplamiento dirigido), se pudo hacer ese tipo de acoplamiento ya que las tres enzimas contaban con el ligando control cristalizado que estaba unido al sitio activo del receptor, y por esta razón, se pudo dirigir a una región específica donde se encontraba el sitio activo y no un acoplamiento ciego, donde el ligando se acoplaría a todas las partes del receptor.

Validación de estructuras del complejo proteína objetivo -ligando

Antes del acoplamiento molecular con los ligandos de interés o no endógenos. Se realizó la validación volviendo a acoplar el ligando control cristalizado en el receptor diana, donde el ligando control se separó por primera vez de la enzima utilizando BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021, este ligando individual se guardó en pdbqt. Con este procedimiento, se pudo validar el sitio activo de los receptores y energía de afinidad del complejo receptor diana-ligando control. En este caso, el receptor HMGCR (ID de PDB: 1DQ9) se acopló con dos ligandos controles, un ligando no inhibidor HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) (60) y un ligando inhibidor 116 cerivastatina (7-[4-(4-fluoro-phenyl)-5-hydroxymethyl-2,6-diisopropyl-pyridin-3-yl]-3,5-dihydroxy-heptanoic acid) (61), el receptor ACC1 (ID de PDB: 3K8X) se acopló al ligando control inhibidor B89/tepraloxidim ((5S) -2 - [(1E) -N - {[(2E) -3-cloroprop-2-en-1-il] oxi} propanimidoil] -3-hidroxi-5- (tetrahydro-2H-piran-4 -il) ciclohex-2-en-1-ona) (62) y el receptor ACC2 (ID de PDB: 3K8X) se acopló al ligando control inhibidor 6U3/ND-630 ((2- [1 - [(2 ~ {R}) - 2- (2-metoxifenil) -2- (oxan-4-iloxi) etil] -5-metil-6- (1,3-oxazol-2-ilo) -2,4-bis (oxidailiden) tieno [2,3-d] pirimidin-3-il] -2-metilpropanamida) (63). Los resultados del acoplamiento molecular mostraron las posiciones del ligando control con la energía de enlace más alta y baja cuando se une al receptor y el valor de RMSD (distancia media cuadrática) del acoplamiento del ligando. Para obtener un valor RMSD diferencial, se superpusieron los resultados del ligando control del

acoplamiento molecular y el mismo ligando sin acoplamiento cristalizado, de esta forma se verificó si el programa Autodock vina llegaba a una misma posición de enlace entre el ligando y el receptor, este proceso se hizo por triplicado. Se dice que el método es válido si el valor de RMSD diferencial obtenido es ≤ 2 Å, de modo que el acoplamiento molecular del ligando de prueba o no endógeno puede llevarse a cabo con la proteína diana en la misma área de la cuadrícula o mapa tridimensional de la caja (64).

Acoplamiento molecular receptor- ligando no endógeno

El acoplamiento se realizó utilizando Autodock Vina (AV). Los ligandos y receptores que se habían guardado en el formato pdbqt se copiaron en la carpeta Vina. El programa Vina se ejecutó a través del símbolo del sistema.

Análisis y visualización

La conformación de acoplamiento de los ligandos se determinó seleccionando la pose con la mayor afinidad (la energía libre de unión de Gibbs más negativa ΔG).

Prueba de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME)

La evaluación de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) es uno de los criterios más importantes antes de convertir una molécula en un fármaco (65). Hasta ahora, muchos candidatos a fármacos no podían satisfacer la demanda de ensayos clínicos, por lo que la predicción por ordenador es importante para la fase inicial. Las propiedades fisicoquímicas, la hidrofobicidad, la lipofilia, el entorno gastrointestinal y la barrera hematoencefálica se ven directamente afectadas por el perfil ADME antes de la excreción del fármaco del cuerpo a través de la orina y las heces (66). Se utilizó el servidor Swiss-ADME (<http://www.swissadme.ch/>) de libre acceso, para evaluar las propiedades ADME, como el perfil de solubilidad, la

absorción GIT y el perfil de biodisponibilidad de los compuestos seleccionados (67).

Toxicidad

El enfoque computacional ha permitido medir la toxicidad mediante métodos *in silico* para acceder al perfil de seguridad de los compuestos deseados. De lo contrario, estos compuestos pueden mostrar el efecto nocivo en humanos y animales. El perfil de toxicidad puede evaluar y determinar la mutagenicidad, la carcinogenicidad, valor LD50, inmunotoxicidad tanto cuantitativa como cualitativamente. Toxicity Estimation Software Tool (TEST) es un software de libre acceso, que se utilizó en este estudio para estimar la toxicidad de nuestros compuestos sin necesidad de otros programas externos (68,69). Las herramientas de estimación de toxicidad TEST se utilizan para moléculas selectivas que se trabajó basado en metodologías de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSARs). Además, se utilizó el servidor ProTox-II (http://tox.charite.de/protox_II) para determinar el efecto tóxico de los compuestos seleccionados (70). En este sitio se pueden obtener diferentes vías toxicológicas, incluidas las vías de señalización de los receptores nucleares y las vías de respuesta al estrés.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS

Diseño estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar de los resultados de tres determinaciones por triplicado para cada ensayo. A través de la regresión lineal se determinó la IC₅₀ (concentración inhibitoria media). Las diferencias estadísticas entre tres o más conjuntos de datos se analizaron mediante los softwares estadísticos GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) y SPSS v.25 para el análisis de varianza de uno y dos factores (ANOVA) y una prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Además, una prueba Duncan de contraste entre cada tratamiento respecto al control negativo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

4. RESULTADOS

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Passiflora edulis*

El rendimiento de extracción del extracto etanólico de hojas de *P. edulis*, fue de 4,64% (extracto obtenido 0,0116kg/ material vegetal empleado 0,25%). El perfil fitoquímico del EE de hojas presentó en su mayoría fenoles totales con $239,3 \pm 41,0$ mg EAG/g ES y en menor proporción alcaloides totales con $8,4 \pm 1,1$ mg EC/g ES (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido total de los compuestos: fenoles, polisacáridos, taninos, flavonoides.

Tipo de compuesto	Contenido total compuesto
CTF* Fenoles	$239,3 \pm 41,0$
CTP* Polisacáridos	$221,9 \pm 16,5$
CTL* Flavonoides	$182,4 \pm 7,9$
CTT* Taninos	$45,1 \pm 3,6$
CTA* Alcaloides	$8,4 \pm 1,1$

Los datos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar de los resultados de tres determinaciones por triplicado para cada compuesto. **CTF:** mg EAG/g ES; **CTP:** mg EG/g ES; **CTT:** mg EAT/g ES; **CTL:** mg EC/g ES; **CTA:** mg EQ/g ES.

EFFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* EVALUADO MEDIANTE SULFORODAMINA B

El efecto antiproliferativo se evaluó en células SW480 y HFF. Para la línea celular SW480, el efecto sobre la viabilidad celular generado por el extracto etanólico presentó un ajuste lineal, es decir, la viabilidad disminuyó proporcionalmente al aumentar la concentración como también al aumentar el tiempo de exposición tanto a 24 ($R^2: 0,97$) como 48 ($R^2: 0,97$) horas ($p \leq 0,05$), así mismo, dicha disminución en el porcentaje de viabilidad resultó significativo

para tratamientos superiores a 2000 $\mu\text{g/mL}$ (72,6 %) siendo el tratamiento de 3000 $\mu\text{g/mL}$ (70,4 %) el que exhibió más toxicidad sobre SW480 a 24 horas. Se debe resaltar, que para el resto de tratamientos con concentraciones inferiores a 2000 $\mu\text{g/mL}$ también disminuyeron la viabilidad celular pero no fue significativa respecto al CST. Por otro lado, a las 48 horas la disminución del porcentaje de viabilidad resultó significativo para tratamientos superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (69,2 %) siendo el tratamiento de 3000 $\mu\text{g/mL}$ (52,2 %) el que exhibió más toxicidad sobre las células SW480, los otros tratamientos como 500 y 200 $\mu\text{g/mL}$ presentaron una leve disminución del porcentaje de viabilidad de 96,4 y 98,1%, respectivamente. Por último, los tratamientos de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ estimularon la viabilidad celular en un 1,8 y 1,6% respecto al CT, respectivamente (Figura 7, Tabla A1).

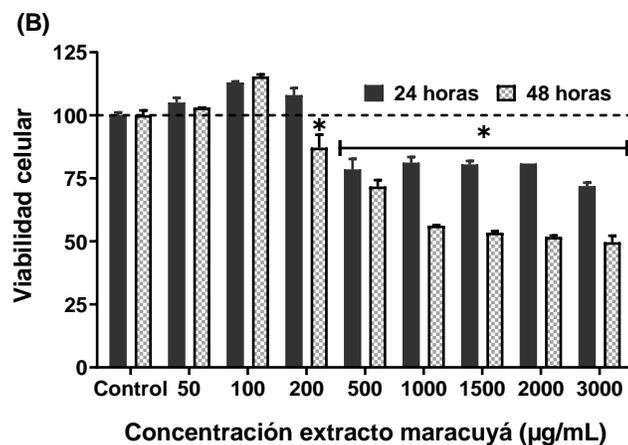
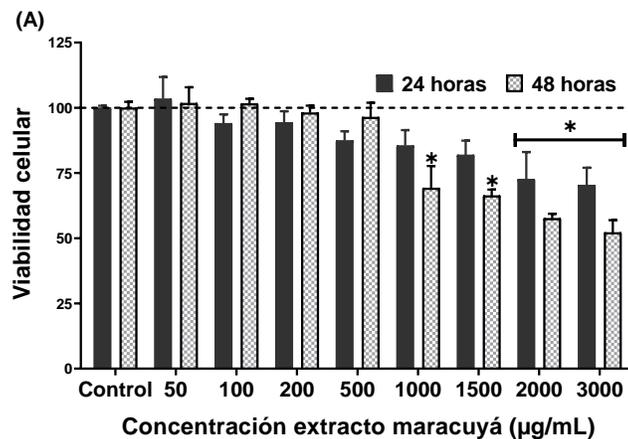


Figura 7. Efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre la viabilidad en células SW480 (A) y HFF (B) a 24 y 48 horas. Diferencias estadísticas significativas entre el control y las condiciones tratadas: * $P \leq 0,05$. Las barras de error representan el error estándar de la media a partir de tres ensayos biológicos y cada uno por triplicado.

Debido que dentro de los tratamientos evaluados no se alcanzó la IC_{50} para ambos periodos de exposición, se realizó una regresión lineal para predecir la IC_{50} tanto a 24 como 48 horas del EE siendo de 4705 y 4269 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Como se observa, se requirió una menor concentración de tratamiento de EE para alcanzar IC_{50} a las 48 horas (Tabla 2).

Por otro lado, el efecto antiproliferativo de los tratamientos del EE sobre la línea celular HFF aumenta o disminuye rápidamente y posteriormente se estabiliza, este comportamiento se evidenció tanto a 24 (R^2 : 0,96) como 48 (R^2 : 0,99) horas ($p \leq 0,05$). La disminución del porcentaje de viabilidad celular fue significativa ($p \leq 0,05$) para tratamientos superiores a 500 $\mu\text{g/mL}$ (78,5 %) siendo el de 3000 $\mu\text{g/mL}$ (71,9%) el que exhibió más toxicidad sobre HFF a 24 horas. Por el contrario, los tratamientos de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ estimularon la viabilidad celular en un 5,0, 12,9 y 7,9 %, respectivamente. Por otro lado, a las 48 horas la disminución del porcentaje de viabilidad resultó significativo para tratamientos superiores a 200 $\mu\text{g/mL}$ (87,1 %) siendo el tratamiento de 3000 $\mu\text{g/mL}$ (49,6 %) el que exhibió más toxicidad sobre las células HFF, los otros tratamientos como 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ estimularon la viabilidad celular en un 3 % y 15,4 %, respectivamente. Por último, la IC_{50} se predijo mediante regresión logarítmica tanto a 24 como 48 horas del EE siendo de 18471 y 3000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Como se observa, se requirió una menor concentración de tratamiento de EE para alcanzar IC_{50} a las 48 horas.

Tabla 2. IC₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre las líneas celulares SW480 y HFF.

Línea celular	Tiempo (horas)	IC ₅₀ (µg/mL)
SW480	24	4705
	48	4269
HFF	24	18471
	48	3000

Este ensayo de viabilidad celular por SFB mostró un efecto diferencial en las dos líneas celulares, entre estas, las células SW480 presentaron mayor sensibilidad al extracto respecto a las células HFF de acuerdo a las IC₅₀ estimadas para cada tiempo (Tabla 2), excepto el período de incubación de 48 horas para HFF. Este efecto se comparó con las IC₅₀ estimadas y se determinó el índice de selectividad (SI) para cada tiempo, obteniendo a 24 y 48 horas un SI de 1,17 y 0,70, respectivamente (Tabla 3), indicando que el EE es más activo contra SW480 que sobre las HFF a 24 horas de incubación.

Tabla 3. Índice de selectividad del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en el modelo de cáncer de colon SW480 respecto a células no tumoral HFF.

Tiempo (horas)	IC ₅₀ (µg/mL) HFF	IC ₅₀ (µg/mL) SW480	SI SW480
24	18471	4705	3,91
48	3000	4269	0,70

EFFECTO HEMOLÍTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* EN ERITROCITOS HUMANOS

Se evidenció que los tratamientos del extracto etanólico presentaron una baja actividad hemolítica sobre los eritrocitos humanos y es significativo respecto al control positivo (peróxido de hidrogeno), siendo el de 200 µg/mL el que más registro hemolisis con un 17,6 %. Así mismo, el porcentaje hemolítico fue inferior al registrado por el control negativo que es ácido ascórbico a 500 µg/mL que mostró una hemolisis del 26,4 %(Figura 8).

Esto quiero decir, que el extracto etanólico de hojas de maracuyá tiene menor actividad hemolítica que el ácido ascórbico a 500 µg/mL que es un protector de la membrana de los eritrocitos humanos, así mismo, dentro de los tratamientos del EE no se alcanzó la IC₅₀ (Tabla A2).

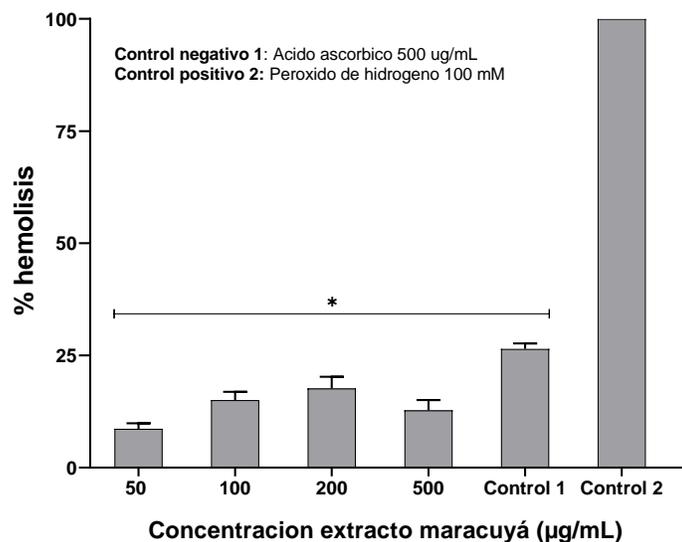


Figura 8. Porcentaje de hemolisis de los diferentes tratamientos del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre los eritrocitos humanos. Diferencias estadísticas significativas entre el control positivo 2 y las condiciones tratadas: * $p \leq 0,05$. Las barras de error representan el error estándar de la media a partir de tres ensayos biológicos y cada uno por triplicado.

EFEECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* SOBRE LÍPIDOS TOTALES (COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS)

Niveles totales de colesterol y triglicéridos intracelular a 24 y 48 horas

El efecto del EE sobre el colesterol y triglicéridos a nivel intracelular se evaluó en células SW480 en dos periodos de incubación de 24 y 48 horas. El efecto sobre los niveles intracelular tanto de triglicéridos como de colesterol total generado por el extracto etanólico presentó un ajuste lineal, es decir, los niveles de triglicéridos ($R^2: 0,95$) y colesterol ($R^2: 0,99$) disminuyeron proporcionalmente al aumentar la concentración a 24 horas. La disminución de colesterol resultó significativa para dos tratamientos, el de 100 µg/mL (75,7

μg colesterol/ μg de proteína) y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (65,6 colesterol/ μg de proteína) respecto al control (89,5 μg colesterol/ μg de proteína). Por otra parte, la disminución de triglicéridos resultó significativa para todos los tratamientos evaluados respecto al control, siendo el tratamiento de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5,8 μg triglicérido/ μg de proteína) el que más disminuyó las concentraciones de triglicérido total respecto al control (8,9 μg triglicérido/ μg de proteína) (Figura 9, Tabla 4). μg

Por otra parte, el efecto del EE sobre los triglicéridos y colesterol a 48 horas de exposición también presentaron un ajuste lineal, donde los niveles de triglicéridos (R^2 : 0,98) y colesterol (R^2 : 0,89) disminuyeron proporcionalmente al aumentar la concentración. La disminución del colesterol no resultó significativa para ninguno de los tratamientos, como se evidenció en la Figura 9 hay una leve reducción, pero no es estadísticamente significativa respecto al control. Así mismo, la IC_{50} para el colesterol se predijo mediante regresión lineal tanto a 24 como 48 horas del EE siendo de 358,3 y 396,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, como se observa, se requirió una menor concentración de tratamiento del EE para alcanzar IC_{50} a las 24 horas (Tabla 4). Por otra parte, la disminución de triglicéridos resultó significativa para dos tratamientos, el de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9,0 μg triglicérido/ μg de proteína) y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8,0 μg triglicérido/ μg de proteína) respecto al control (11,1 μg triglicérido/ μg de proteína) (Tabla 4). Por lo tanto, la IC_{50} para los triglicéridos se predijo mediante regresión lineal tanto a 24 como 48 horas del EE, siendo de 263,5 y 338,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, como se observa también, se requirió una menor concentración de tratamiento del EE para alcanzar IC_{50} a las 24 horas.

Basándose en los resultados anteriores, se pudo establecer para el colesterol intracelular a las 24 y 48 horas que la línea celular SW480 sin estar expuesta al extracto (CST) presentó un 89,5 y 39,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colesterol/ μg de proteína, respectivamente, lo anterior se tomó como el 100% de colesterol para ambos periodos de incubación por separado, y se estableció la diferencia en

porcentaje del contenido y disminución de colesterol específico para los diferentes tratamientos (Tabla A3). A nivel intracelular el tratamiento de 200 µg/mL presentó un 72,5 % de colesterol respecto al 100 % del control, es decir, disminuyó un 27,5 % el nivel de colesterol total, siendo el umbral de sensibilidad máxima a 24 horas, por otro lado, a las 48 horas se evidenció también que el tratamiento de 200 µg/mL presentó un 76,2 % de colesterol respecto al 100 % del control, reduciendo un 23,8 % el contenido total de colesterol. Entonces, se evidenció que el EE tiene un mayor efecto de reducción sobre el colesterol durante las primeras 24 horas de incubación ($p < 0,05$).

En cuanto a los triglicéridos intracelular a las 24 y 48 horas, se estableció que la línea celular SW480 sin estar expuesta al extracto (CST) presentó un 8,9 y 11,1 µg/mL de triglicéridos/µg de proteína, respectivamente, lo anterior se tomó como el 100% de triglicéridos para ambos periodos de incubación, y se estableció la diferencia en porcentaje del contenido y disminución de triglicéridos específico para los diferentes tratamientos (Tabla A3). A nivel intracelular el tratamiento de 200 µg/mL presentó un 65 % de triglicéridos respecto al 100 % del control, es decir, disminuyó un 35 % los niveles de triglicéridos totales, siendo el umbral de sensibilidad máxima a 24 horas, por otro lado, a las 48 horas se evidenció también que el tratamiento de 200 µg/mL presentó un 72 % de triglicéridos respecto al 100 % del control, reduciendo un 28 % el contenido total de triglicéridos. En consecuencia, se evidenció que el EE tiene un mayor efecto de reducción sobre los triglicéridos durante las primeras 24 horas de incubación ($p < 0,05$).

Tabla 4. IC₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre el contenido total de triglicéridos y colesterol intracelular en SW480 a 24 y 48 horas.

Intracelular		
	Tiempo (horas)	IC ₅₀ (µg/mL)
Colesterol	24	358,3

	48	396,8
Triglicéridos	24	263,5
	48	338,6

Niveles totales de colesterol y triglicéridos extracelular a 24 y 48 horas

El efecto del EE sobre el colesterol y triglicéridos a nivel extracelular se evaluó en células SW480 a 24 y 48 horas. El efecto sobre los niveles extracelulares tanto de triglicéridos como de colesterol total generado por el EE fueron muy variables, aumentando y disminuyendo a lo largo de las 24 horas de incubación. La expulsión de colesterol se vio retenida por todos los tratamientos evaluados y presentaron diferencias significativas respecto al control, siendo el tratamiento de 50 µg/mL (27,5 µg colesterol/µg de proteína) y 200 µg/mL (29,2 µg colesterol/µg de proteína) los que más expulsaron colesterol respecto al control (77,6 µg colesterol/µg de proteína). Por otro lado, la expulsión hacia el medio extracelular de triglicéridos se vio retenida en todos los tratamientos y no hay diferencias significativas con el control, las concentraciones que más retuvieron triglicéridos fueron la 50 µg/mL (4,2 µg colesterol/µg de proteína) y 200 µg/mL (4,0 triglicéridos/µg de proteína) respecto al control (5,9 µg triglicéridos/µg de proteína). Por lo tanto, el EE presentó una regulación negativa del flujo de salida tanto de colesterol como de triglicéridos a las 24 horas.

Por otra parte, el efecto del EE sobre los triglicéridos y colesterol a 48 horas de exposición si presentaron un ajuste lineal. A las 48 horas se registró un estímulo a la expulsión tanto de triglicéridos como de colesterol en todos los tratamientos evaluados (Figura 9, Tabla A4). Sin embargo, la expulsión no fue significativa respecto al control. El tratamiento que más expulsó tanto triglicéridos como colesterol fue el de 200 µg/mL. En colesterol se registró una concentración de 13,2 µg/mL en el medio extracelular respecto al control 11,7 µg/mL, así mismo, la IC₅₀ para el colesterol se predijo solo a las 48 horas del EE, siendo de 804,2 µg/mL. En el caso de los triglicéridos, fue 36,2 µg/mL en

el medio extracelular respecto al control 33,6 µg/mL. Donde la IC₅₀ se predijo solo a las 48 horas del EE, siendo de 1341,9 µg/mL (Tabla 5).

El análisis que se realizó a partir de los datos obtenidos, es que la línea celular SW480 sin estar expuesta al extracto (CST) en un periodo de incubación de 24 y 48 horas, registró una expulsión de 77,6 y 11,7 µg/mL de colesterol, respectivamente, lo anterior se tomó como el 100% de colesterol expulsado para ambos periodos de incubación por separado y se estableció la diferencia en porcentaje de contenido en medio y expulsión del colesterol específico para los diferentes tratamientos (Tabla A4). Se evidenció que todos los tratamientos retienen la expulsión de colesterol respecto a las CST a 24 horas, siendo la concentración de 200 µg/mL la que menos retiene la salida en un -63,4 % (el signo (-) representa una regulación negativa del flujo de salida del colesterol), lo ideal es encontrar flujos de salida superiores al 100 % del control, indicando que los tratamientos estimulan dicha salida del colesterol. Por otro lado, a las 48 horas si se evidenció un estímulo al flujo de salida del colesterol para todos los tratamientos evaluados, siendo el tratamiento de 200 µg/mL el que más estímulo la salida del colesterol con un 12,7 %, sin embargo, esa regulación positiva no es significativa respecto al control. Como resultado se evidenció que el EE estimuló de manera positiva el flujo de salida del colesterol solo a 48 horas de incubación ($p < 0,05$).

Con base en los triglicéridos extracelulares a las 24 y 48 horas en la línea celular SW480 sin estar expuesta al extracto (CST), expulsó 5,9 y 33,6 µg/mL de triglicéridos, respectivamente, lo anterior se tomó como el 100% de triglicéridos expulsados para ambos periodos de incubación por separado y se estableció la diferencia en porcentaje de contenido en medio y expulsión de triglicéridos específico para los diferentes tratamientos (Tabla A4). Se evidenció que todos los tratamientos retienen la expulsión de los triglicéridos respecto a las CST a 24 horas, siendo la concentración de 50 µg/mL la que menos retiene la salida en un -12,3 % (el signo (-) representa una regulación

negativa del flujo de salida de los triglicéridos). Por otro lado, a las 48 horas si se evidenció un estímulo al flujo de salida de los triglicéridos para todos los tratamientos evaluados, siendo el tratamiento de 200 µg/mL el que más estímulo la salida del triglicéridos con un 7,9 %, sin embargo, esa regulación positiva no es significativa respecto al control. Entonces, se evidenció que el EE estimuló de manera positiva el flujo de salida de los triglicéridos solo a 48 horas de incubación ($p < 0,05$).

Tabla 5. IC₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre el contenido total de triglicéridos y colesterol extracelular en SW480 a 24 y 48 horas.

Extracelular		
	Tiempo (horas)	IC₅₀ (µg/mL)
Colesterol	24	ND
	48	804,2
Triglicéridos	24	ND
	48	1341,9

ND: No fue posible establecer un IC₅₀, valores fuera de los límites.

Por ende, en general el EE a nivel intracelular afectó en mayor proporción tanto a 24 como a 48 horas el contenido total de triglicéridos, por otra parte, a nivel extracelular estimuló la expulsión principalmente del colesterol a las 48 horas.

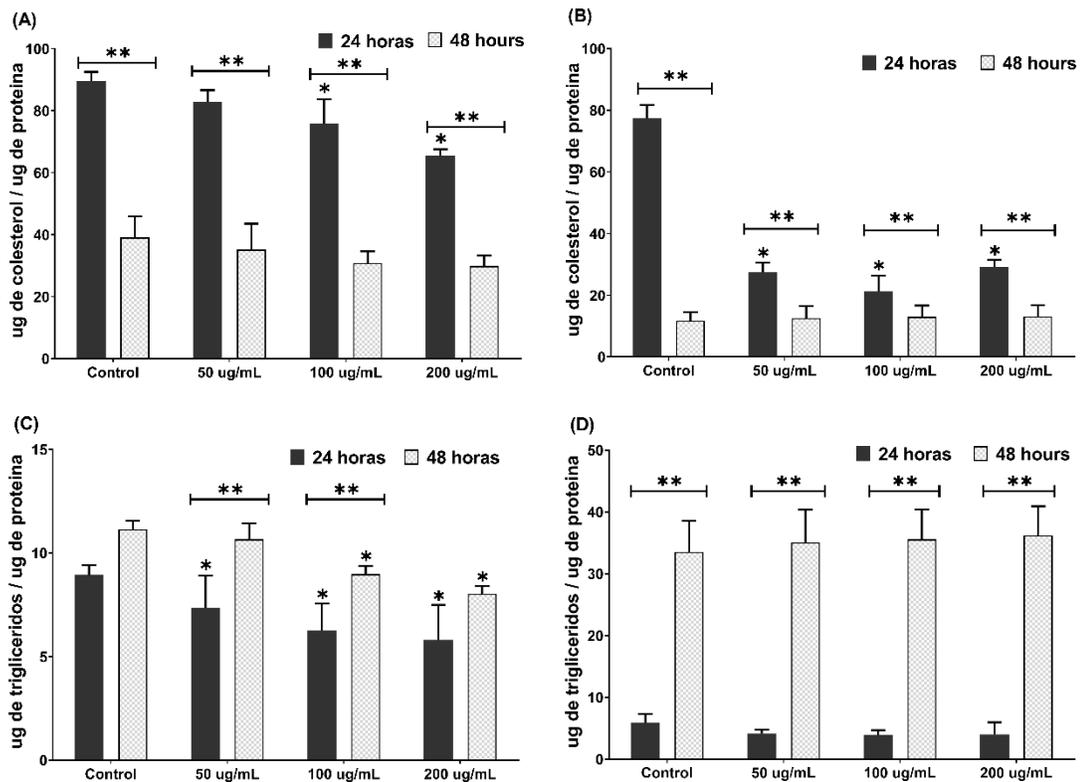


Figura 9. Efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre el contenido total de colesterol y triglicéridos tanto intracelular (A,C) como extracelular (B,D) en SW480 en respuesta a la incubación de 24 y 48 horas. Diferencias estadísticas significativas entre el control y las condiciones tratadas: * $p \leq 0,05$. Las barras de error representan el error estándar de la media a partir de tres ensayos biológicos y cada uno por triplicado.

Como se evidenció anteriormente, el EE tiene un mayor efecto diferencial sobre el contenido intracelular total de triglicéridos y colesterol que sobre la expulsión de estos, por ende, surgió la siguiente hipótesis ¿Cuáles posibles compuestos están ejerciendo ese efecto sobre el contenido intracelular de lípidos totales?, por lo tanto, se buscaron compuestos bioactivos antagonistas contra el sitio activo de las dianas HMGCR, ACC1 y ACC2.

EVALUACIÓN *in silico* DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Passiflora edulis* COMO INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL-COA REDUCTASA (HMGCR) Y LA ACETIL-COENZIMA A CARBOXILASA (ACC)

Coordenadas del mapa tridimensional de la caja

En la tabla 6 se observan los ligandos (controles) en 2D separados del receptor y se nombran algunas características como peso molecular, fórmula química, entre otros. De los cuatro ligandos controles, solo el B89 y el 116 cumplen con la regla de cinco de Lipinski (Ro5) con cero infracciones o violaciones de las variables tales como peso molecular, número de donante de enlace H y aceptador de enlace H.

Por otro lado, en la búsqueda de la superficie de acoplamiento molecular se definieron las coordenadas óptimas para el diseño del mapa tridimensional de la caja que engloba al sitio activo del receptor (acoplamiento dirigido) (Tabla 9).

Tabla 6. Diagrama en 2D de los ligandos controles HMG-CoA, B89 y 6U3.

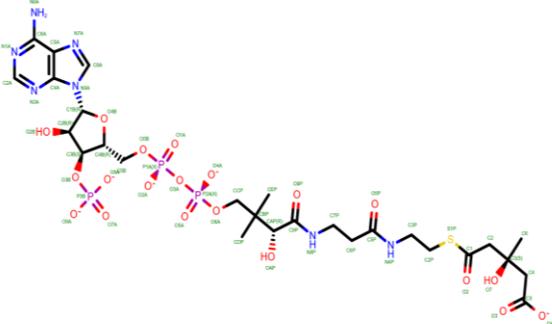
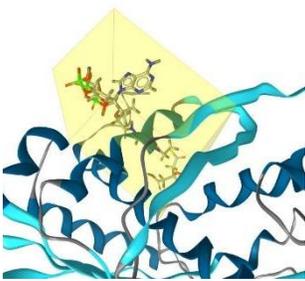
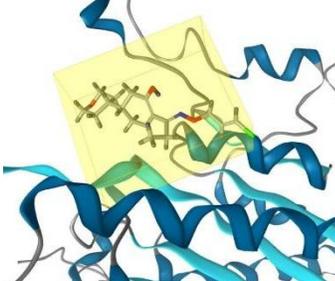
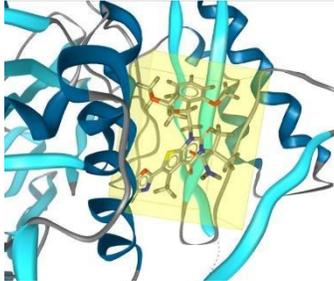
Ligandos controles	Anotaciones
HMG-CoA (número CAS 1553-55-5) 	Fórmula química: C ₂₇ H ₄₄ N ₇ O ₂₀ P ₃ S Peso molecular: 911.66 g/mol Log P (<5): -3.89 Donante de enlace H (<5): 11 Aceptador de enlace H (<10): 23 Infracciones: 3 Cumplir con los criterios de Ro5: No

Tabla 7. Coordenadas del mapa tridimensional de la caja de los receptores y ligandos controles cristalizados.

Visualización en AutoDock Tools			
Mapa tridimensional de la caja			
	HMGCR + HMG-CoA	ACC1 + B89	ACC2 + 6U3
Centro X	-16.922	-0.085	18.252
Centro Y	-34.418	24.918	78.939
Centro Z	20.021	-21.019	13.338
Tamaño X	28	28	28
Tamaño Y	28	28	28
Tamaño Z	24	28	28

Validación de estructuras del complejo proteína objetivo -ligando y re-acoplamiento molecular del ligando control

Para evaluar si se pueden tener en cuenta los valores de acoplamiento, la validación se llevó a cabo volviendo a acoplar los tres receptores HMGCR, ACC1 y ACC2 sin sustratos, con sus respectivos ligandos que se había separado previamente. Los resultados de la validación se presentan en las Tablas 7 y 8.

Como se puede evidenciar en la tabla 8, la posición de los tres ligandos del resultado de cristalografía en comparación con la posición del resultado de acoplamiento molecular por AV, muestra que el RMSD diferencial para los tres

ligandos es $<2 \text{ \AA}$. Validando el acoplamiento molecular de los ligandos de prueba o no endógenos en la misma área de la cuadrícula o mapa tridimensional de la caja.

Tabla 8. Superposición del ligando en base al proceso de re acoplamiento de HMGCR, 6U3 y B89 con cristalografía (verde: resultado de cristalografía; azul: resultado de re acoplamiento).

Receptor			
Ligandos controles	RMSD diferencial (Å)		
	HMGCR	ACC1	ACC2
HMG-CoA	1,582	N/A	N/A
B89	N/A	1,029	N/A
6U3	N/A	N/A	1,418

Nota: N/A: No aplica

Regla de cinco (Ro5)

La regla de cinco de Lipinski (Ro5) de los compuestos o ligandos no endógenos de acoplamiento calculados en el predictor SWISSADME se muestra en la Tabla 9. La mayoría de los compuestos utilizados en este estudio no violan la Ro5. Sin embargo, la isoorientina, luteolina, saponarina, pasiflorato de glucosilo, ciclopasiflósido V y ácido ciclopasifloico E no cumplen con la Ro5 al infringir dos o más variables.

Tabla 9. Regla de cinco de Lipinski (Ro5) de los ligandos vegetales.

Ligandos	Fórmula molecular	Propiedades					Infracciones	Cumplir los criterios de Ro5
		Peso molecular (<500 g/mol)	Log P (<5)	Donante de enlace H (<5)	Aceptor de enlace H (<10)			
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	0,93	3	4	0	Sí	
Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,31	-0,39	6	9	1	Sí	
Isoorientina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,38	-0,24	8	11	2	No	
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23	1,58	4	6	0	Sí	
Luteolina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	580,49	-1,09	9	15	3	No	
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24	1,23	5	7	0	Sí	
Saponarina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,52	-1,65	10	15	3	No	
Vitexina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,38	-0,07	7	10	1	Sí	
Pasiflorato de glucosilo	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₂	696,87	2,16	8	12	3	No	
Ciclopasiflósido V	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₇	861,02	0,38	12	17	3	No	
Ácido ciclopasifloico E	C ₃₁ H ₅₂ O ₈	552,74	2,84	7	8	2	No	
Harmene	C ₁₂ H ₁₀ N ₂	182,22	2,70	1	1	0	Sí	
Harmol	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	198,22	2,16	2	2	0	Sí	
Moupinamida	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313,35	2,39	3	4	0	Sí	
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	170,12	0,21	4	5	0	Sí	
Quinina	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324,42	2,81	1	4	0	Sí	

Acoplamiento molecular

La estimación de la energía libre de unión entre los posibles inhibidores y receptores se realizó mediante un experimento de acoplamiento. La Tabla 12 y la Figura 10 muestran los resultados del análisis de acoplamiento entre los compuestos seleccionados con las enzimas HMGCR, ACC1 y ACC2. Los resultados del acoplamiento mostraron que algunos compuestos vegetales con mejores posiciones de unión con la enzima HMGCR que el propio ligando HMG-CoA que regula la actividad y la catálisis, eran la luteolina, pasiflorato de glucosilo, ciclopasiflósido V, ácido ciclopasifloico E y moupinamida con energías libres de unión más bajas que $-9 \Delta G$. Los demás compuestos tendieron a estar mejor posicionados (energía libre de unión $< -7 \Delta G$) en comparación con el inhibidor endógeno 116 cerivastatina de la HMGCR, excepto los ligandos como el ácido cafeico, el ácido gálico, harmane y harmol. Por otra parte, la vinculación de las mejores posiciones energéticas a la ACC1 que fueron mejores o equivalentes al inhibidor B89/tepraloxidim de dicha enzima fueron la isoorientina, luteolina, saponarina, vitexina, ácido clorogénico, quinina, pasiflorato de glucosilo, ciclopasiflósido V, ácido ciclopasifloico E y moupinamida (energía libre de unión $> -6,3 \Delta G$). Por último, no hubo vinculación de posiciones a la ACC2 que fueran mejores o equivalentes al inhibidor 6U3/ND-630, se evidenciaron posiciones cercanas a la energía libre de unión del inhibidor ($-11,7 \text{ kcal/mol}$) como el pasiflorato de glucosilo y ácido ciclopasifloico E con -11 y $-10,2 \text{ kcal/mol}$, respectivamente (Tabla 10; Figura 10).

Los resultados de la visualización del acoplamiento molecular de los ligandos que se van a mostrar más adelante son únicamente aquellos ligandos no endógenos que mostraron una energía libre de unión por encima del ligando y/o inhibidor endógeno, como se puede observar en la figura 10.

Tabla 10. Análisis de acoplamiento molecular de varios ligandos vegetales y endógenos sobre las enzimas HMGCR, ACC1 y ACC2.

Ligandos	Energía libre de enlace (kcal/mol)		
	HMGCR	ACC1	ACC2
HMG-CoA	- 9,0	N/A	N/A
116	-7,0	N/A	N/A
B89	N/A	- 6,3	N/A
6U3	N/A	N/A	-11,7
Isoorientina	- 8,3	- 6,3	- 9,3
Luteolina	- 9,3	- 8,0	- 8,9
Saponarina	- 8,3	- 7,2	- 9,7
Vitexina	-8,7	- 6,9	- 9,2
Quercetina	- 8,2	-6,2	- 8,5
Kaempferol	- 8,2	- 6,2	- 8,5
Ácido cafeico	-7,1	- 5,5	-6,5
Ácido clorogénico	- 8,3	- 6,4	-9,3
Ácido gálico	- 6,7	- 4,5	- 5,7
Quinina	- 7,3	- 6,9	- 9,6
Pasiflorato de glucosilo	-11,4	- 8,6	- 11
Ciclopasiflósido V	- 9,6	- 9,4	- 9,6
Ácido ciclopasifloico E	- 9,9	-7,9	- 10,2
Harmane	- 6,6	- 5,7	- 7,9
Harmol	- 6,7	- 5,6	- 7,8
Moupinamida	- 9,3	- 6,5	- 8,9

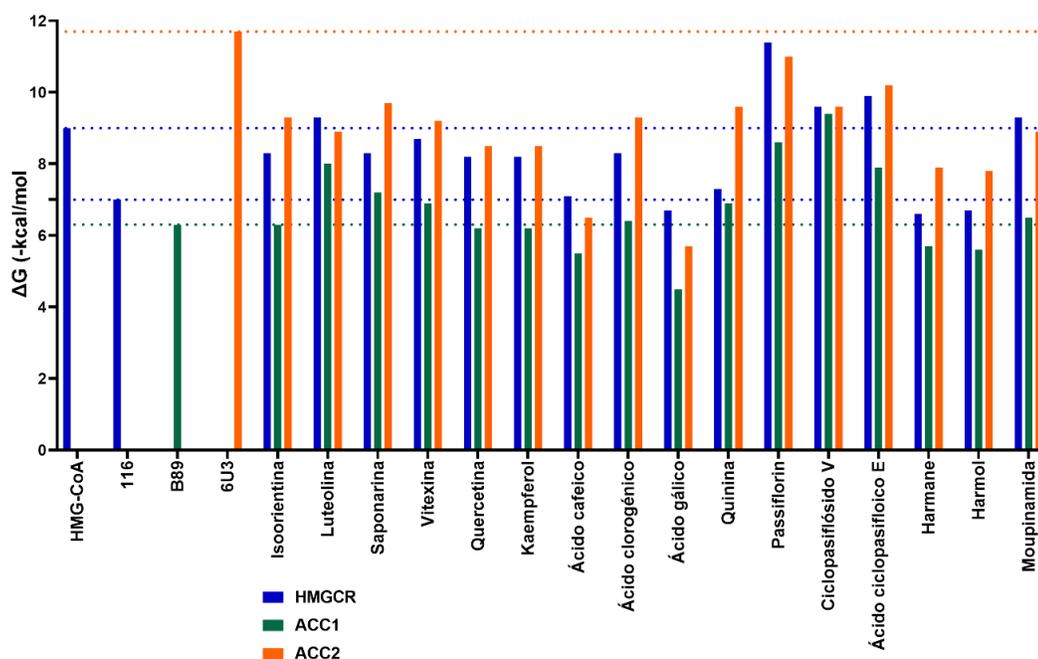


Figura 10. Valor de la energía libre de unión (-kcal/mol) de las enzimas HMGCR, ACC1 y ACC2 con varios candidatos a compuestos inhibidores. Aquellos compuestos que superen la energía libre de unión de los inhibidores endógenos son candidatos. ---: Es el valor máximo de energía libre de unión (-kcal/mol) de los inhibidores endógenos (azul: HMGCR/HMG-CoA y 116; verde: ACC1/B89; naranja: ACC2/6U3).

Visualización de los resultados del acoplamiento molecular

La posición de unión de los ligandos no endógenos a las tres enzimas se evaluó y comparó basándose en ligando y/o inhibidor endógeno. Por efectos de orden y mejor visualización se mostraron los acoplamientos por separado para cada enzima.

Acoplamientos moleculares de ligandos no endógenos con la enzima HMGCR

El acoplamiento molecular del AV mostró que, de todos los compuestos bioactivos con energías libres de unión superiores al ligando HMG-CoA e inhibidor B89 endógenos, son tres ligandos activos con diferentes afinidades por el receptor que se unen específicamente en la misma posición de los

ligandos controles en el sitio activo de la enzima, estos candidatos fueron la luteolina (- 9,3 kcal/mol), moupinamida (- 9,3 kcal/mol) y el ácido clorogénico (- 8,3 kcal/mol). Los demás ligandos se unen a posiciones cercanas o superponen en una parte (no en toda) de la posición de los ligandos controles en el sitio activo de la enzima (Figura 11; Tabla 13; Tabla 14). Es importante mencionar que, si bien hay ligandos no endógenos con energías libres de unión mejores que los tres candidatos mencionados, no cumplen a rigor con la superposición del ligando control en el sitio activo de la HMGCR como se puede visualizar en la Tabla 14.

En la Figura 12 se muestra un diagrama 2D con los tipos de contactos formados entre el receptor HMGCR y el ligando e inhibidor endógenos. La interacción entre el ligando HMG-CoA y su receptor se estabiliza principalmente por siete enlaces de hidrógeno y dos interacciones hidrofóbicas (enlace de hidrógeno carbono), por otra parte, el inhibidor 116/cerivastina se estabiliza por dos interacciones Pi-sigma y una Pi-Pi stacked. Ambos ligandos también se ven estabilizados por otro tipo de interacción no menos importante como las de Van der Waals que son fuerzas de atracción débil (Tabla 13; Figura 12). De los tres candidatos óptimos citados anteriormente, es la luteolina la que genera más interacciones estabilizantes con cinco enlaces de hidrogeno, dos hidrofóbicos, uno de hidrógeno donante de Pi, entre otros, seguido del ácido clorogénico con cinco enlaces de hidrogeno, dos hidrofóbicos y un enlace pi-alquilo, por último, la moupinamida con un enlace de hidrogeno, tres enlaces alquilo y un enlace hidrofóbico (Tabla 13; Tabla 14).

Tabla 11. Resultado de la interacción entre los dos ligandos controles y once no endógenos seleccionados por su energía libre de unión en complejo con la proteína HMGR.

Ligando	Enlaces de hidrógeno convencionales	Enlace de hidrógeno donante de Pi	Enlace alquilo	Enlace de hidrógeno carbono	Enlace pi-alquilo	Pi- sulfuro
HMG-CoA	7 (LYS735, SER565, HIS752, ARG568*2, HIS861, ASN567.			2 (ARG752, LYS722)		
116/ cerivastatina	2 (SER565, SER865)				1 (ARG568)	Pi-Cation 1 (LYS722)
Luteolina	5 (ASN755*2, GLU559, GLY560, CYS561)	1 (ALA751)	Pi-Pi T-shaped 1 (HIS866)	2 (SER865, HIS861)	3 (LEU853, LEU862, 856)	Pi-Cation 3 (HIS752, HIS866, HIS861)
Pasiflorato de glucosilo	4 (ARG571, ASN567, GLY542)		1 (ALA564)			
Ciclopasiflósido V	3 (ARG571*2, GLU719)		2 (ARG568, ARG571)			
Ácido ciclopasifloico E	3 (GLU593, ASP597, ARG281)			1 (TRP681)		
Moupinamida	1 (ASN755)		3 (ALA856, CYS561, ALA454)	2 (HIS752, CYS561, SER865)		1 (CYS561)
Isorientina	7 (SER865, SER565, HIS861, ARG568*2, LYS722, ARG571)			1 (HIS866)	1 (ARG571)	
Saponarina	2 (GLY542, LYS722)		Amida-pi stacked 1 (ASN567)		3 (ARG571*2, ARG568)	
Ácido clorogénico	5 (ASN755, ALA751*2, GLU559, HIS866)			2 (SER865, HIS752)	1 (ALA856)	1 (CYS561)
Quercetina	3 (ASN755, LYS735, ALA751)				2 (LEU862, LEU853)	Pi-cation 1 (HIS866)
Vitexina	3 (ARG571, VAL720, LYS722)	Pi-Sigma 1 (ALA564)				
Kaempferol	3 (ASN755, LYS735, ALA751)				2 (LEU862, LEU853)	Pi-Cation HIS866

El ligando isorientina si bien no se une específicamente en la misma posición de los ligandos controles en el sitio activo de la enzima, si está ocupando más de la mitad del área. Además, como se puede observar en la Tabla 13 y Tabla 14 el acoplamiento se vio estabilizado por 7 enlaces de hidrogeno, uno hidrofóbico y un enlace pi-alquilo, siendo un candidato aceptable.

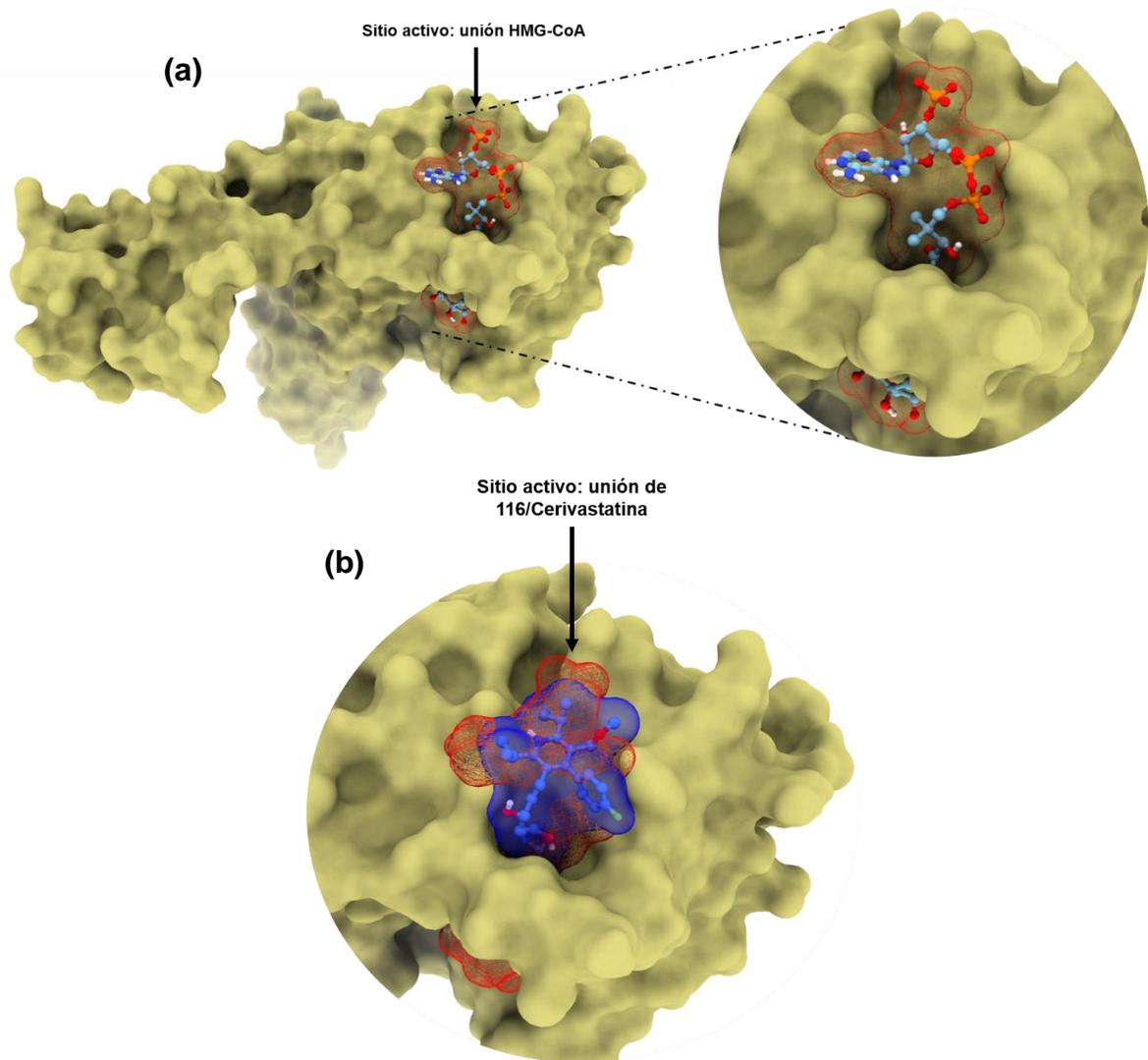


Figura 11. Salida de AV, que muestra los ligandos controles en interacción con el sitio activo de la HMGCR. (a) Sitio activo de la HMGCR en interacción con su ligando control HMG-CoA. (b) Sitio activo de la HMGCR en interacción con el inhibidor endógeno 116/cerivastatina y en malla roja se muestra la posición de unión de HMG CoA para fines comparativos.

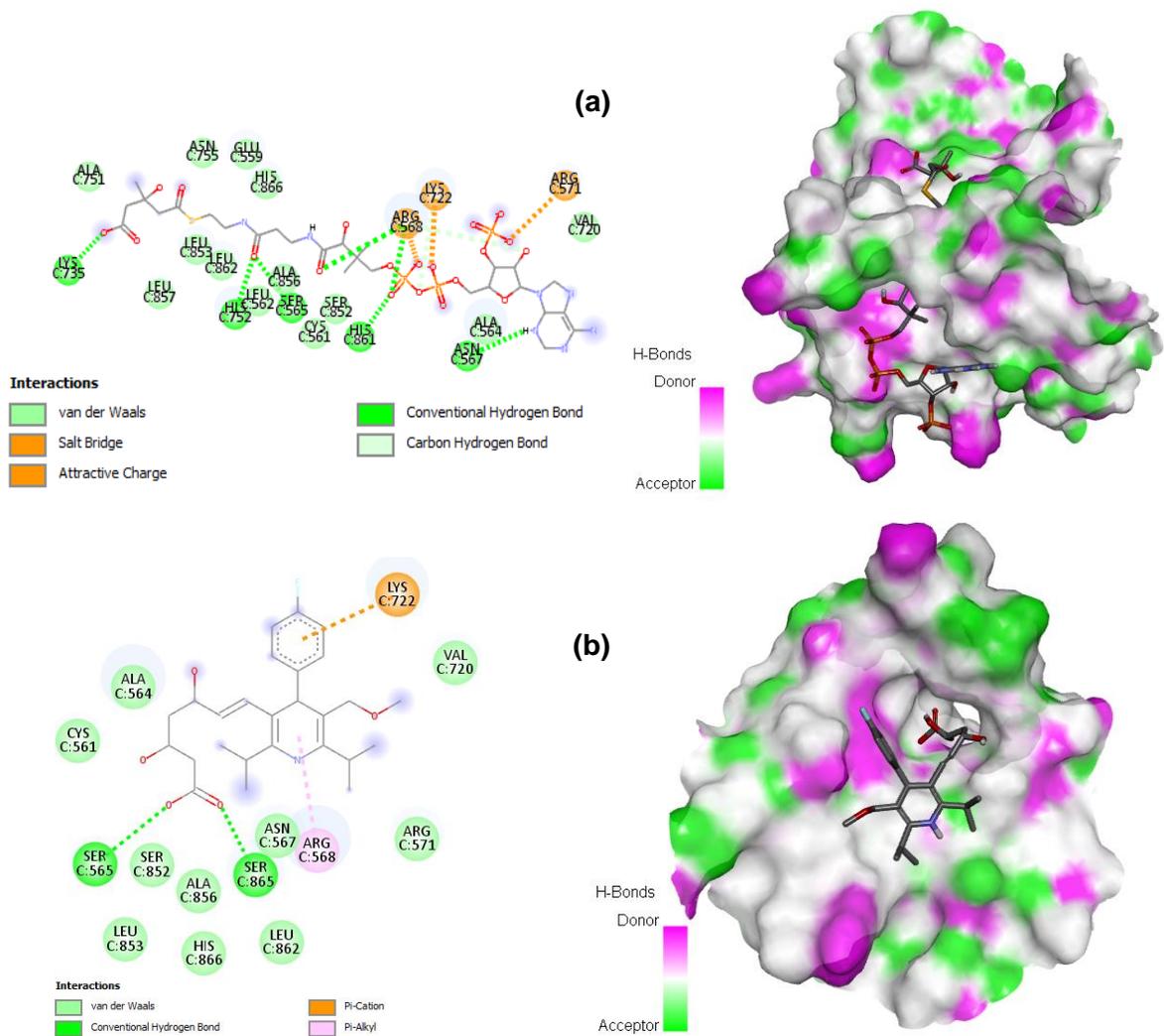
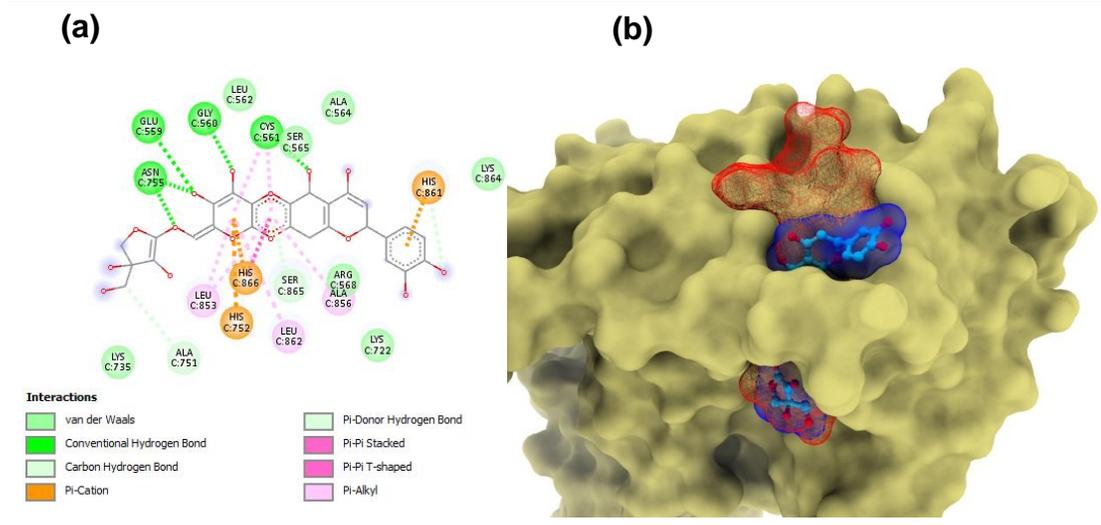


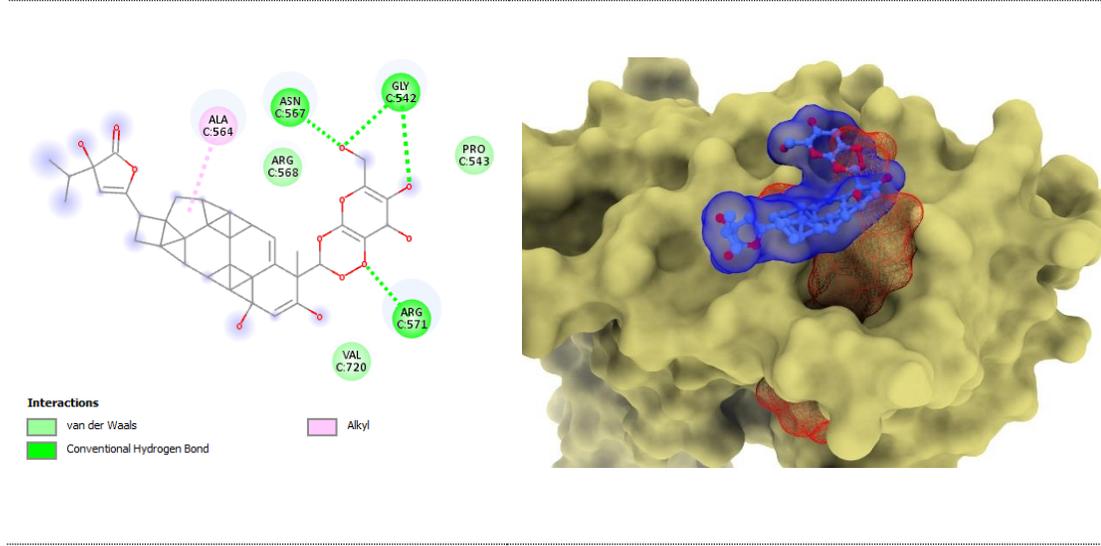
Figura 12. (a) A la izquierda un diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor HMGCR y el ligando control HMG-CoA. A la derecha se muestra salida de AV de la HMG-CoA, superficie de contacto que muestra las zonas más probables de donar y/o aceptar enlaces de hidrogeno. **(b)** A la izquierda un diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor HMGCR y el inhibidor endógeno 116/cerivastatina. A la derecha se muestra salida de AV del 116, superficie de contacto que muestra las zonas más probables de donar y/o aceptar enlaces de hidrogeno en la enzima HMGCR.

Tabla 12. Posición de acoplamiento de los ligandos no endógenos que tuvieron una energía libre de unión superior al ligando control HMG-CoA y al inhibidor endógeno 116/cerivastatina en la enzima HMGCR. **(a)** Diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor y el ligando. **(b)** Salida de AV, que muestra los ligandos no endógenos en interacción con el sitio activo de la HMGCR en 3D. Superficie en malla de color rojo: representa la posición de unión de la HMG-CoA para fines comparativos.

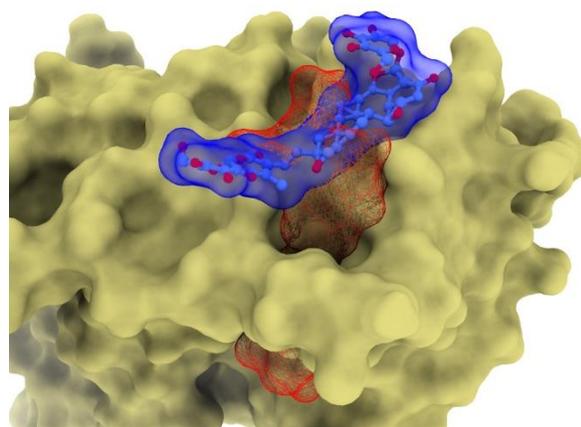
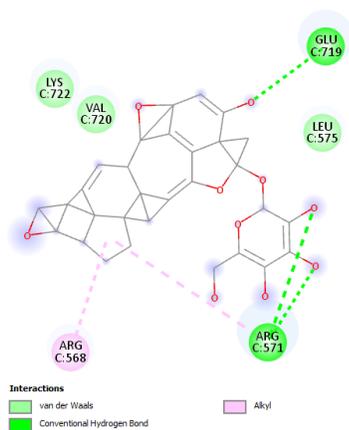
Acoplamiento molecular de luteolina (- 9,3 ΔG)



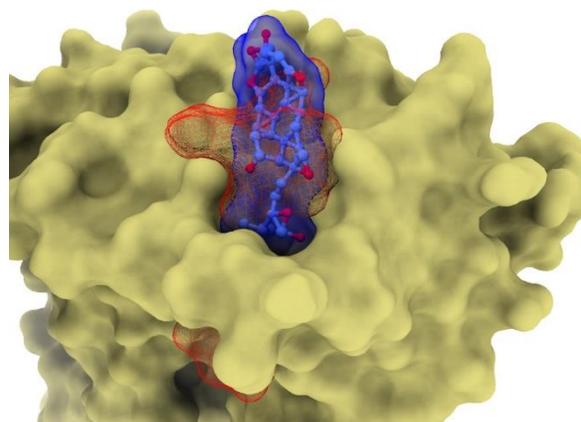
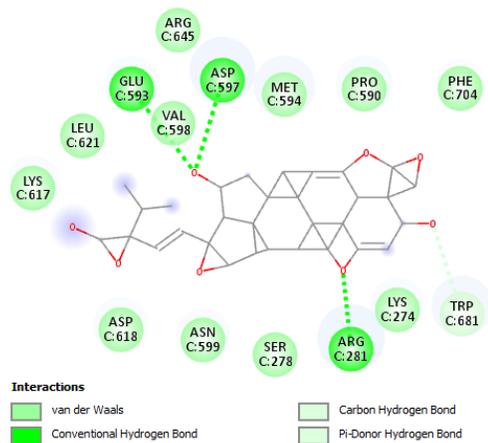
Acoplamiento molecular de Pasiflorato de glucosilo (- 11,4 ΔG)



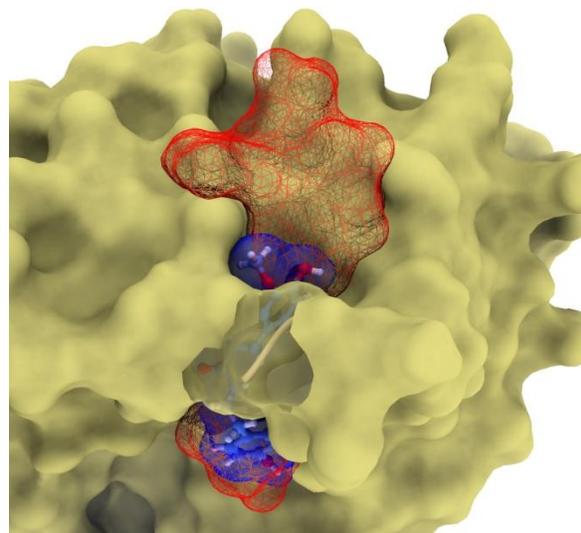
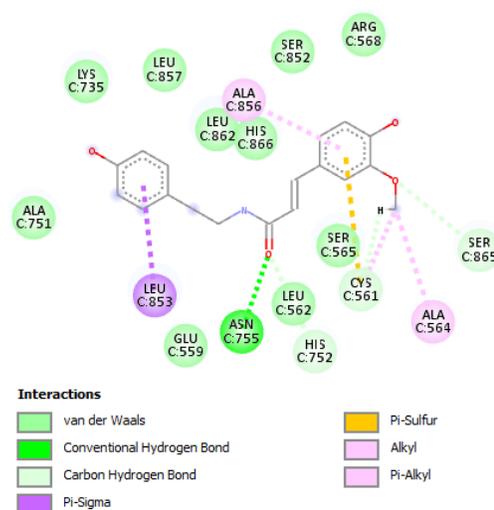
Acoplamiento molecular de ciclopasiflósido V (- 9,6 ΔG)



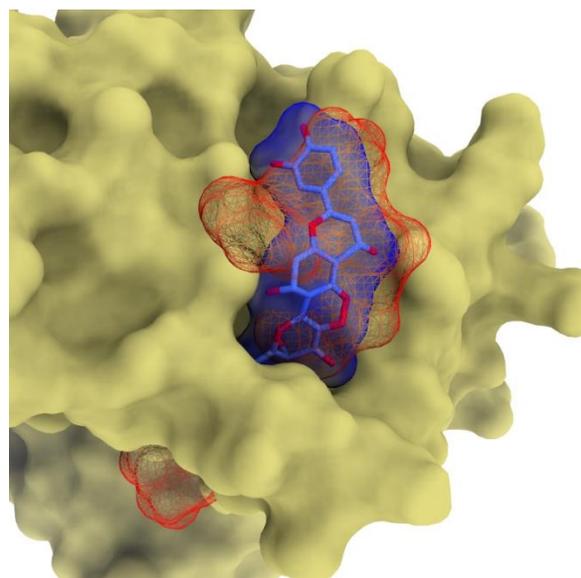
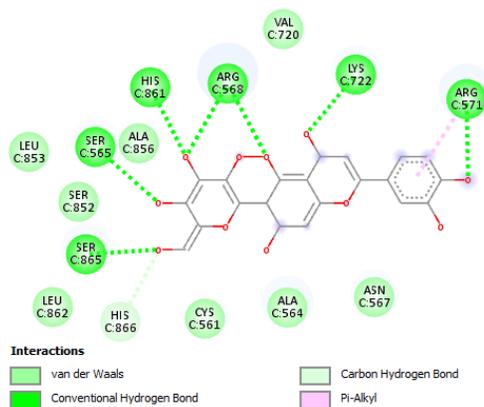
Acoplamiento molecular de ácido ciclopasifloico E (- 9,9 ΔG)



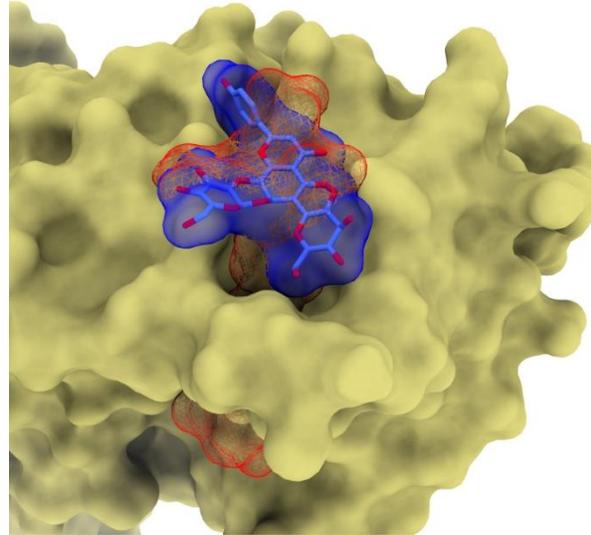
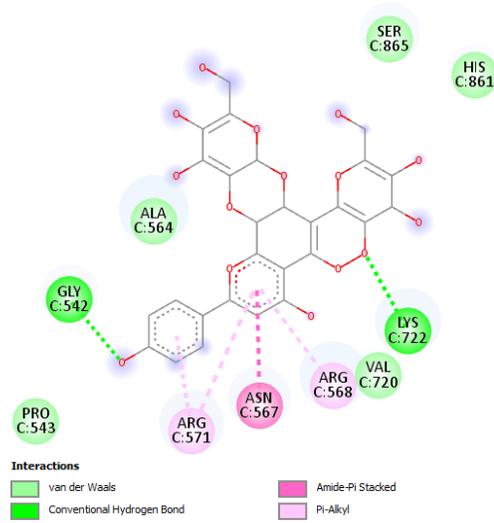
Acoplamiento molecular de moupinamida (- 9,3 ΔG)



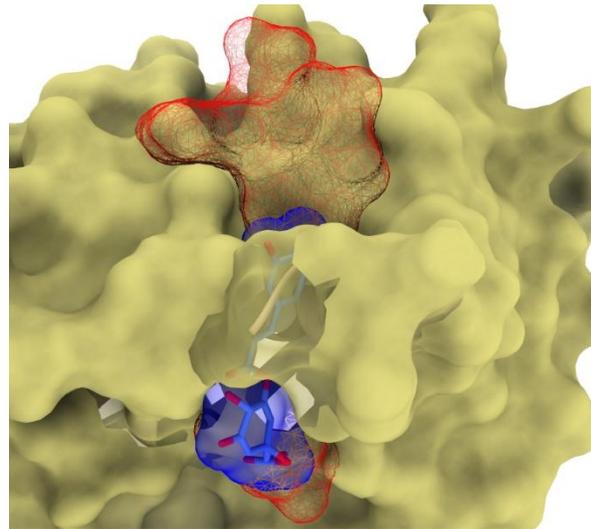
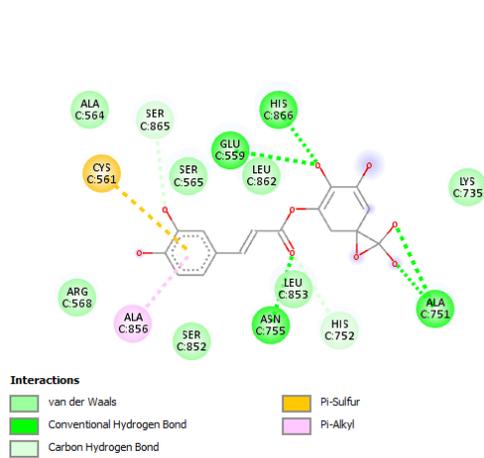
Acoplamiento molecular de isoorientina (- 8,3 ΔG)



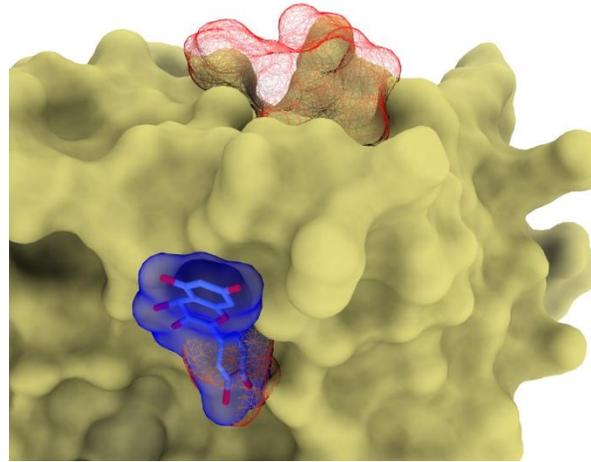
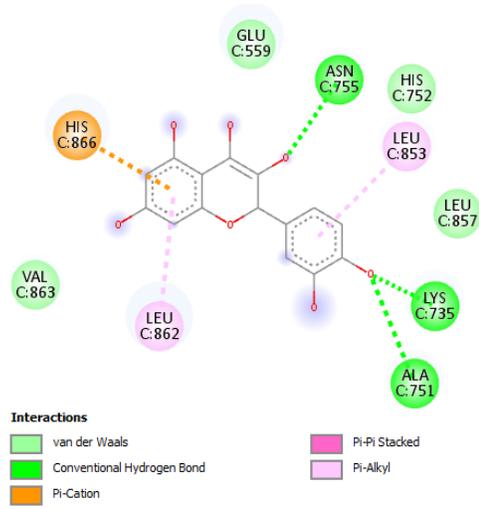
Acoplamiento molecular de saponarina (- 8,3 ΔG)



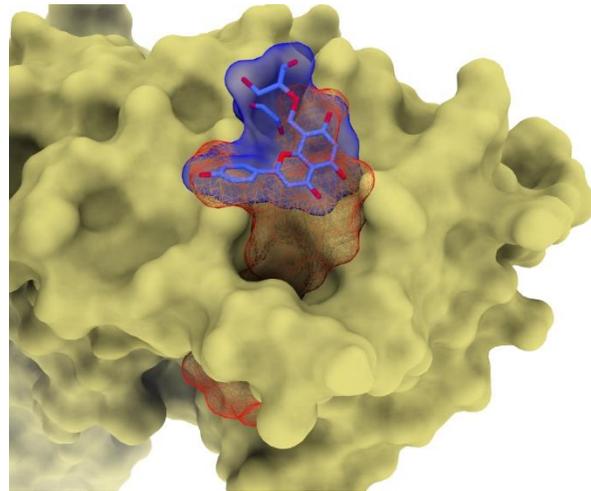
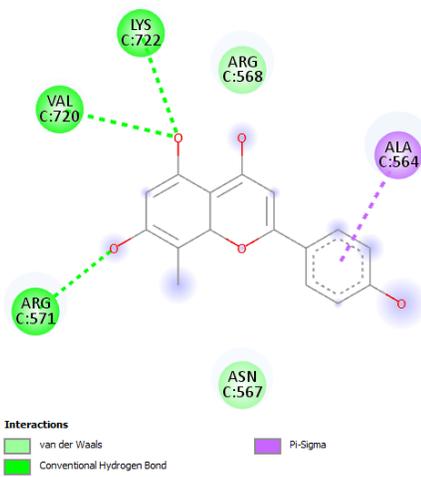
Acoplamiento molecular de ácido clorogénico (- 8,3 ΔG)



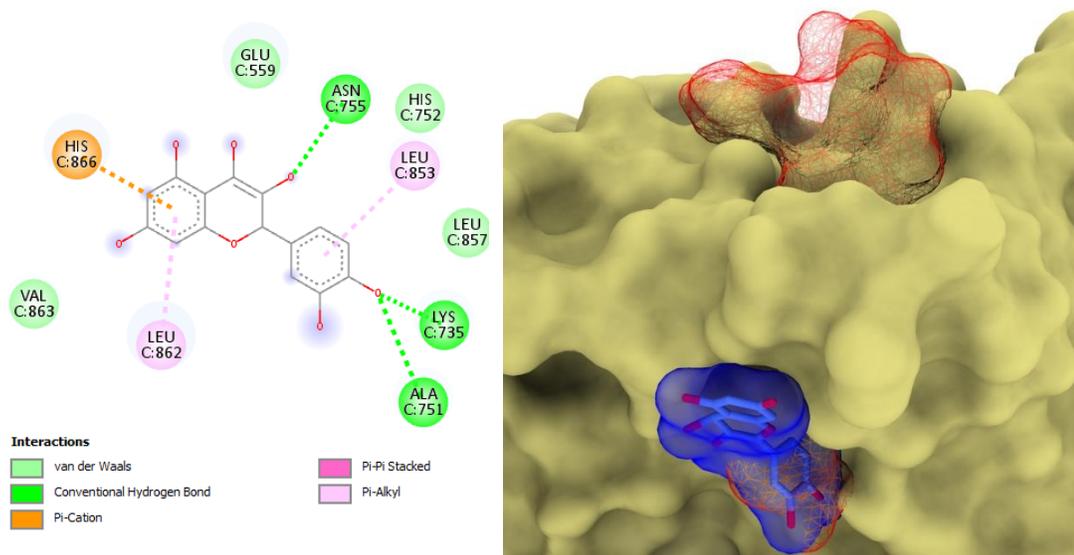
Acoplamiento molecular de quercetina (- 8,2 ΔG)



Acoplamiento molecular de vitexina (- 8,7 ΔG)



Acoplamiento molecular de Kaempferol (- 8,2 Δ G)



Acoplamientos moleculares de ligandos no endógenos con la enzima ACC1

El acoplamiento molecular del AV mostró que, de todos los compuestos bioactivos con energías libres de unión superiores al inhibidor B89/tepraloxidim, son tres ligandos activos con diferentes afinidades por el receptor que se unen específicamente en la misma posición del inhibidor endógeno en el sitio activo de la enzima, estos candidatos fueron el pasiflorato de glucosilo (- 8,6 kcal/mol), luteolina (- 8,0 kcal/mol) y el ácido clorogénico (- 7,9 kcal/mol). Los demás ligandos se unen a posiciones cercanas o superponen en una parte (no en toda) de la posición del inhibidor en el sitio activo de la enzima (Figura 13; Tabla 15; Tabla 16). Es importante mencionar que, si bien hay ligandos no endógenos con energías libres de unión mejores que los tres candidatos mencionados como el ciclopasiflósido V, no cumplen a rigor con la superposición de los ligandos controles en el sitio activo de la ACC1 como se puede visualizar en la Tabla 16.

En la Figura 14 se muestra un diagrama 2D con los tipos de contactos formados entre el receptor ACC1 y el inhibidor B89. La interacción del complejo se estabiliza principalmente por un enlace de hidrógeno, un alquilo y un pi-alquilo, también, se ve estabilizado por las interacciones de Van der Waals (Tabla 15; Figura 14). De los tres candidatos óptimos citados anteriormente, es la luteolina la que genera más interacciones estabilizantes con cinco enlaces de hidrogeno, un hidrofóbico, un pi-alquilo, entre otros, seguido del pasiflorato de glucosilo con tres enlaces de hidrogeno, uno de hidrógeno donante de Pi; por último, el ácido ciclopasifloico E con un enlace de hidrogeno, uno alquilo y un enlace hidrofóbico (Tabla 15; Tabla 16).

Tabla 13. Resultado de la interacción entre un inhibidor endógeno y ocho ligandos no endógenos seleccionados por su energía libre de unión en complejo con la proteína ACC1.

Ligando	Enlaces de hidrógeno convencionales	Enlace de hidrógeno donante de Pi	Enlace alquilo	Enlace de hidrógeno carbono	Enlace pi-alquilo	Pi- sulfuro
B89/tepraloxidim	1 (ALA1627)		1 (TYR1738)		1 (ALA1712)	
Pasiflorato de glucosilo	3 (ASN1744, ALA1627, SER1625)	1 (TRY1738)				
Ciclopasiflósido V	5 (ARG1706*2, LEU1700, ARG1628, LEU1756)			1 (ILE1629)		
Ácido ciclopasifloico E	1 (LEU1756)		1 (VAL1733)	1 (GLY1734)		
Moupinamida	1 (LEU1756)	1 (LEY1777)	4 (ILE1782, LEU1777, LEU1756, ALA1734)	1 (TRY1738)	Pi-Pi stacked 1 (TRY1738)	
Luteolina	5 (SER1708, ILE1735, ALA1627, ARG1731, ASN1774)			1 (GLY1734)	1 (ALA1627)	Pi-Sigma 1 (VAL1733)
Saponarina	6 (ALA1627, ILE1629*2, LYS1592, SER1595, GLY1758)			1 (SER1625)		Pi-Sigma 1 (VAL1733)
Vitexina	3 (GLY1758, ARG1731, ILE1629)				1 (ILE1629)	
Quinina	2 (SER1625, ALA1627)		5 (LYS1592, ILE1629, ARG1628, ILE1593, VAL1733)			

El ligando saponarina si bien no se une específicamente en la misma posición del B89 en el sitio activo de la enzima, si está ocupando más de la mitad del área. Además, como se puede observar en la Tabla 15 y Tabla 16 el acoplamiento se vio estabilizado por 6 enlaces de hidrogeno, uno hidrofóbico y un enlace pi-sigma, siendo un candidato aceptable.

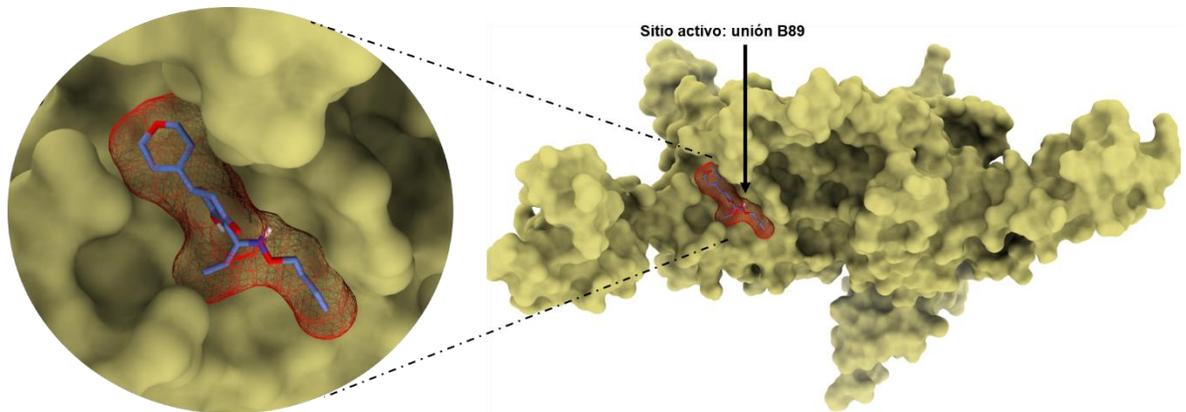


Figura 13. Salida de AV, que muestra el inhibidor endógeno B89/tepraloxidim en interacción con el sitio activo de la ACC1. En malla roja se muestra la superficie de incidencia del inhibidor sobre la ACC1.

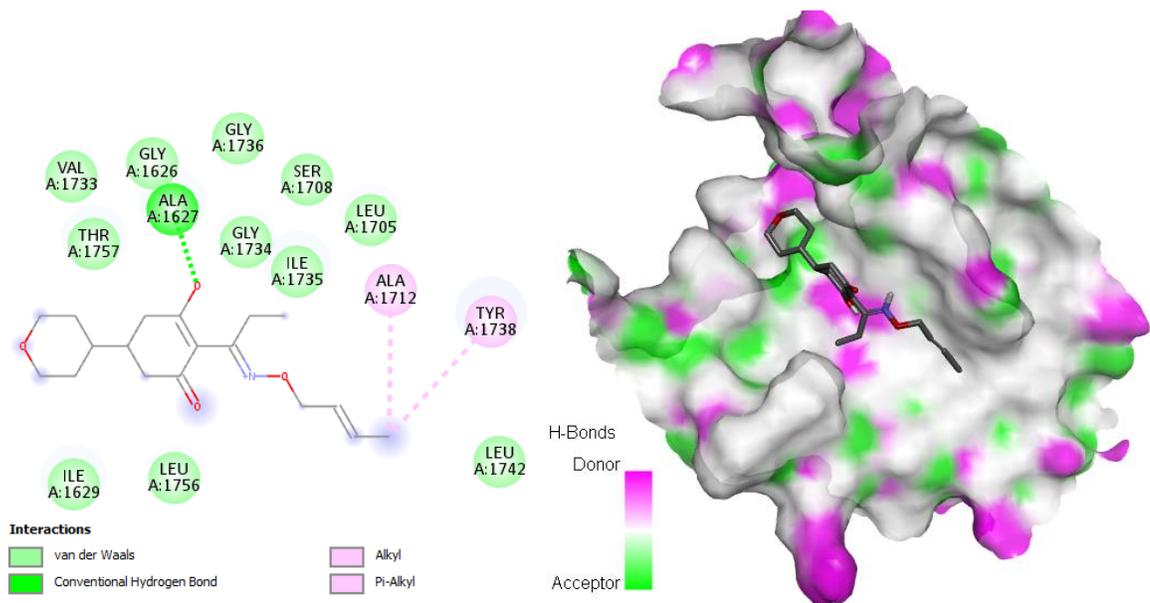
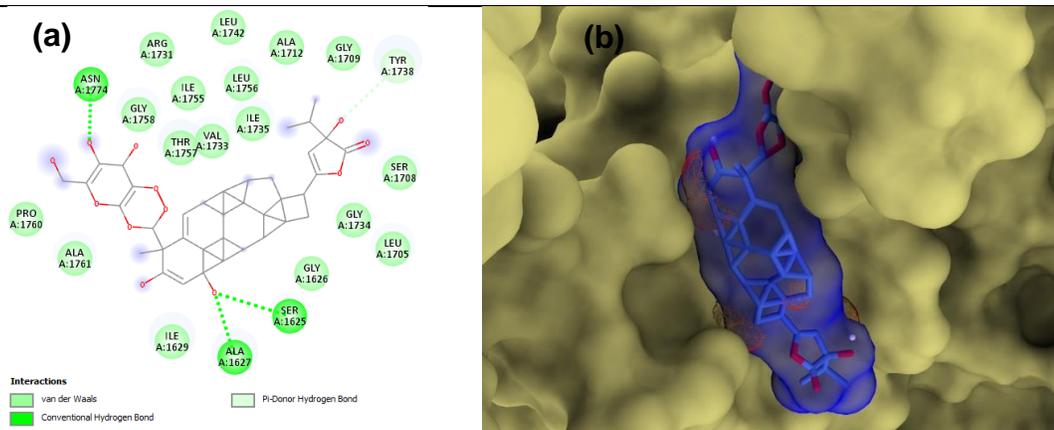


Figura 14. A la izquierda un diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor ACC1 y el inhibidor endógeno B89. A la derecha se

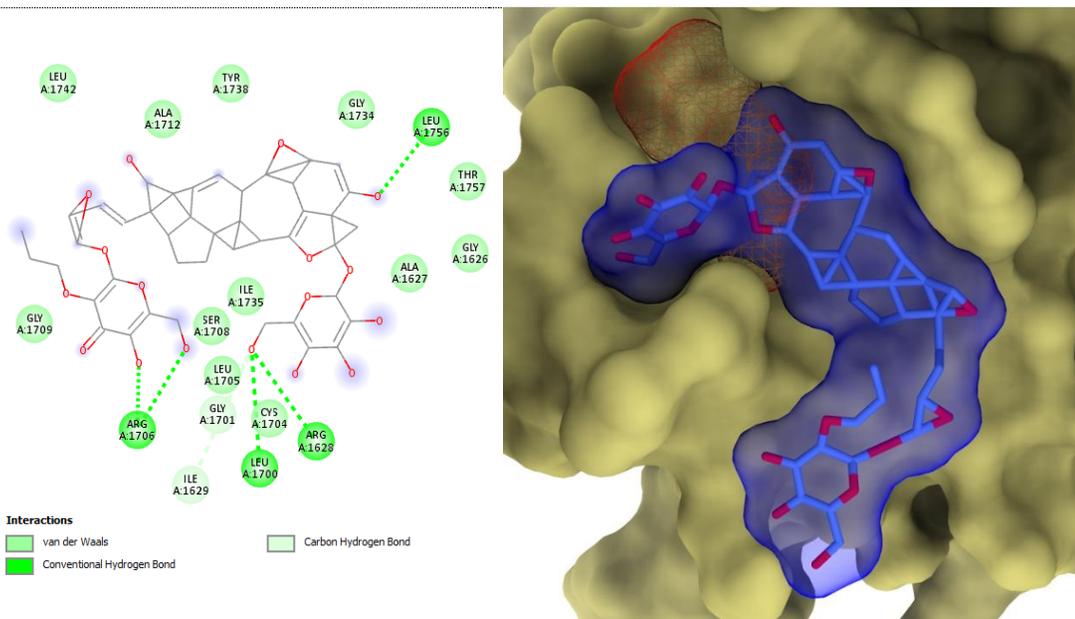
muestra salida de AV del B89, superficie de contacto que muestra las zonas más probables de donar y/o aceptar enlaces de hidrogeno en la enzima ACC1.

Tabla 14. Posición de acoplamiento de los ligandos no endógenos que tuvieron una energía libre de unión superior al inhibidor endógeno B89/tepraloxidim en la enzima ACC1. Columna (a) Diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor y el ligando. Columna (b) Salida de AV, que muestra los ligandos no endógenos en interacción con el sitio activo de la ACC1 en 3D. Superficie en malla de color rojo: representa la posición de unión del B89/tepraloxidim para fines comparativos.

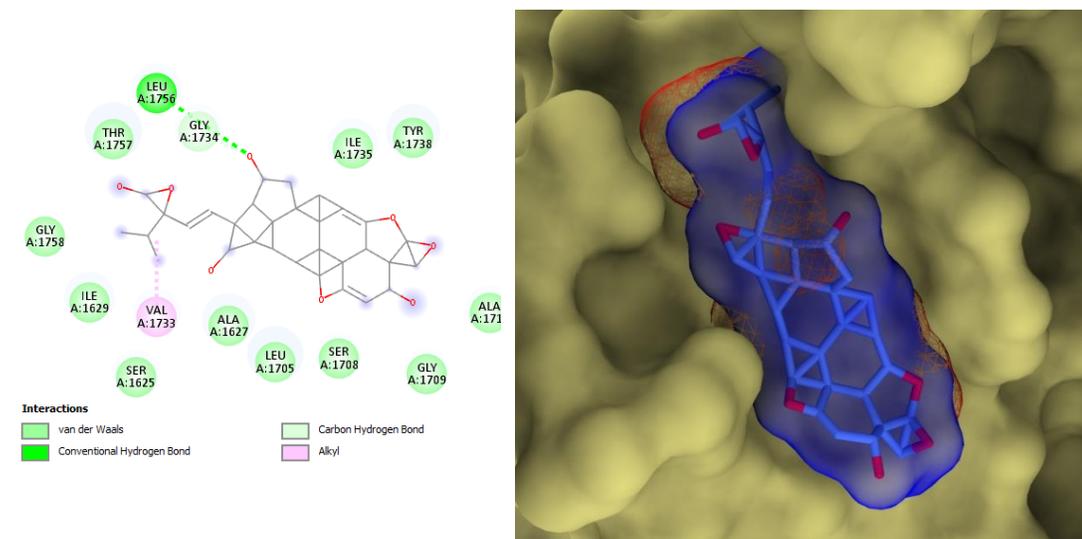
Acoplamiento molecular de pasiflorato de glucosilo (- 8,6 ΔG)



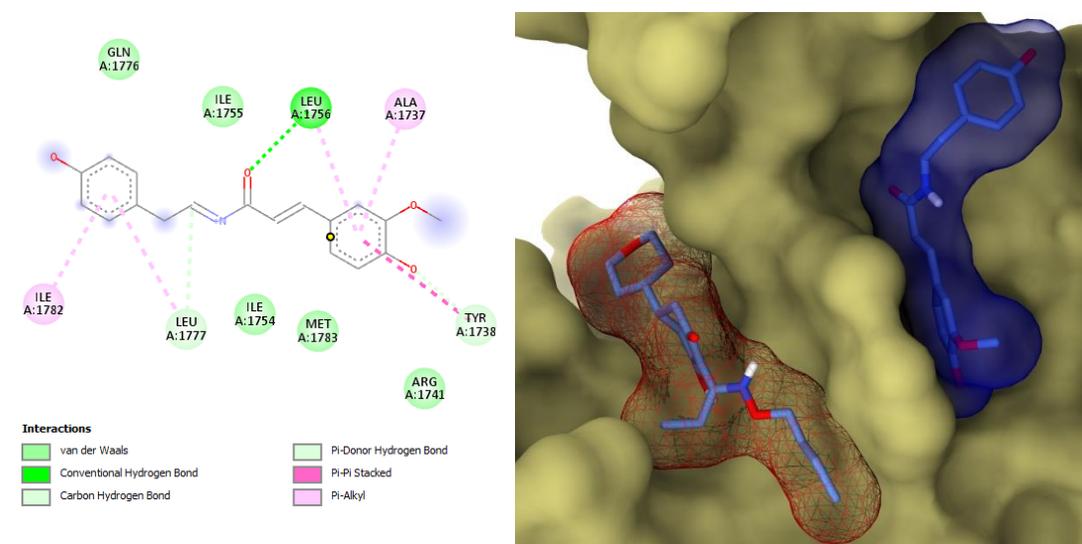
Acoplamiento molecular de ciclopasiflósido V (- 9,4 ΔG)



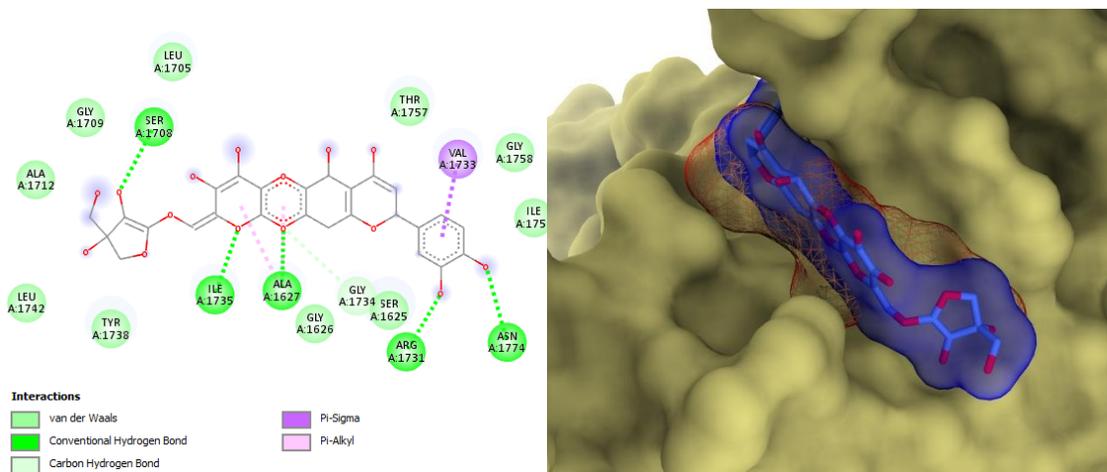
Acoplamiento molecular de ácido ciclopasifloico E (- 7,9 ΔG)



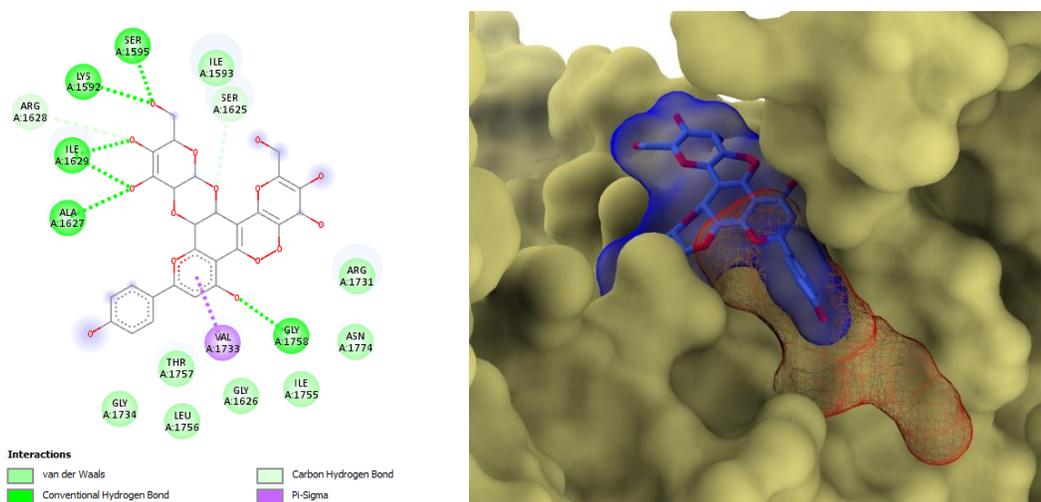
Acoplamiento molecular de moupinamida (- 6,5 ΔG)



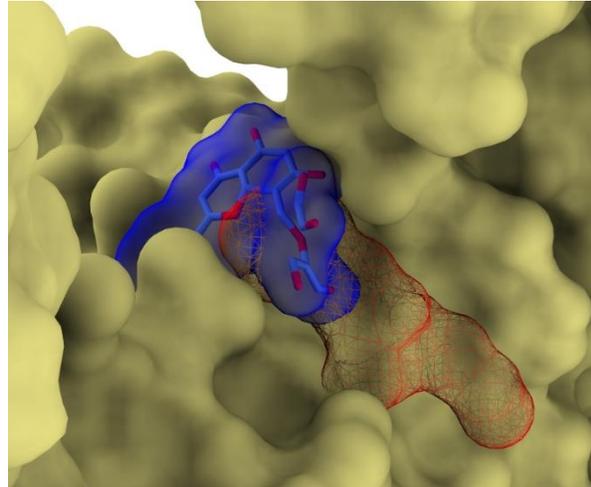
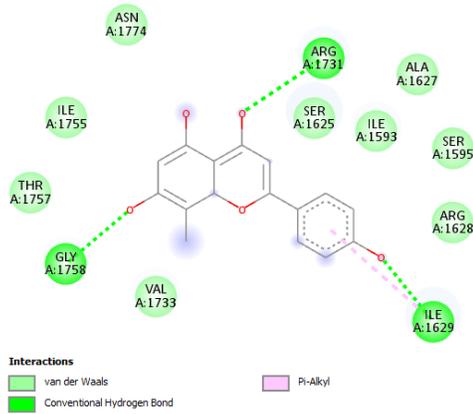
Acoplamiento molecular de luteolina (- 8,0 ΔG)



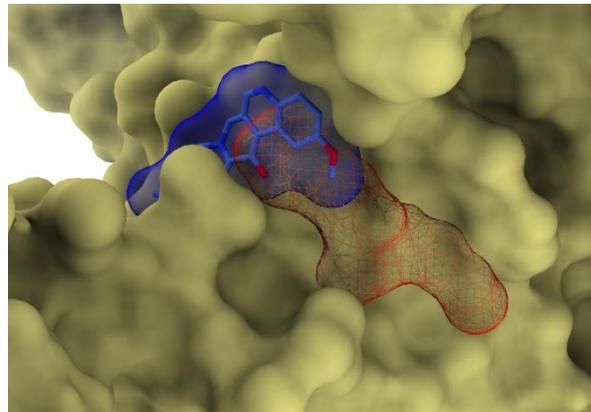
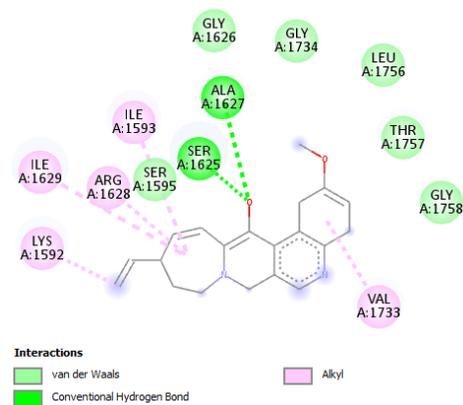
Acoplamiento molecular de saponarina (- 7,2 ΔG)



Acoplamiento molecular de vitexina (- 6,9 ΔG)



Acoplamiento molecular de quinina (- 6,9 ΔG)



Acoplamientos moleculares de ligandos no endógenos con la enzima ACC2

El acoplamiento molecular del AV mostró que, ninguno de los compuestos bioactivos estudiados presenta energías libres de unión superiores al inhibidor

6U3/ND-30, solo hay dos ligandos activos con diferentes afinidades por el receptor con energía de acoplamiento cercanas al inhibidor y que se unen específicamente en la misma posición del inhibidor endógeno en el sitio activo de la enzima, estos fueron el pasiflorato de glucosilo (- 11 kcal/mol) y el ácido ciclopasifloico E (- 10,2 kcal/mol) (Figura 15; Tabla 17; Tabla 18). Los demás ligandos exhibieron energías libres de unión demasiado bajas en comparación con el inhibidor 6U3, por lo tanto, no se procedió a examinarlas con más detalle.

En la Figura 16 se muestra un diagrama 2D con los tipos de contactos formados entre el receptor ACC2 y el inhibidor 6U3. La interacción del complejo se estabiliza principalmente por dos enlaces de hidrógeno, uno de hidrogeno donante de pi, uno hidrofóbico, seis pi-alquilo, entre otros, también se ve estabilizado por las interacciones de Van der Waals (Tabla 17; Figura 16). De los dos ligandos citados anteriormente, el Pasiflorato de glucosilo es el que genera más interacciones estabilizantes con ocho enlaces de hidrogeno y el ácido ciclopasifloico E tiene tres enlaces de hidrogeno con un enlace de hidrogeno donante de Pi (Tabla 17; Tabla 18).

Tabla 15. Resultado de la interacción entre un inhibidor endógeno y dos ligandos no endógenos seleccionados por su energía libre de unión en complejo con la proteína ACC2.

Ligando	Enlaces de hidrógeno convencionales	Enlace de hidrógeno donante de Pi	Enlace alquilo	Enlace de hidrógeno carbono	Enlace pi-alquilo	Pi- sulfuro
6U3/ND-30	2 (ARG281, ARG277)	Pi-sigma 1 (TRP681)	Pi-Pi stacked 1 (TRP681)	1 (VAL587)	6 (VAL648, PRO590*2, LYS274*2, ILE270)	1 (MET594)
Pasiflorato de glucosilo	8 (LYS678*2, ASN679*2, ASP567, ASP618, LYS617, ARG281)					
Ácido ciclopasifloico E	3 (GLU593, ASP597, ARG281)	1 (TRP681)				

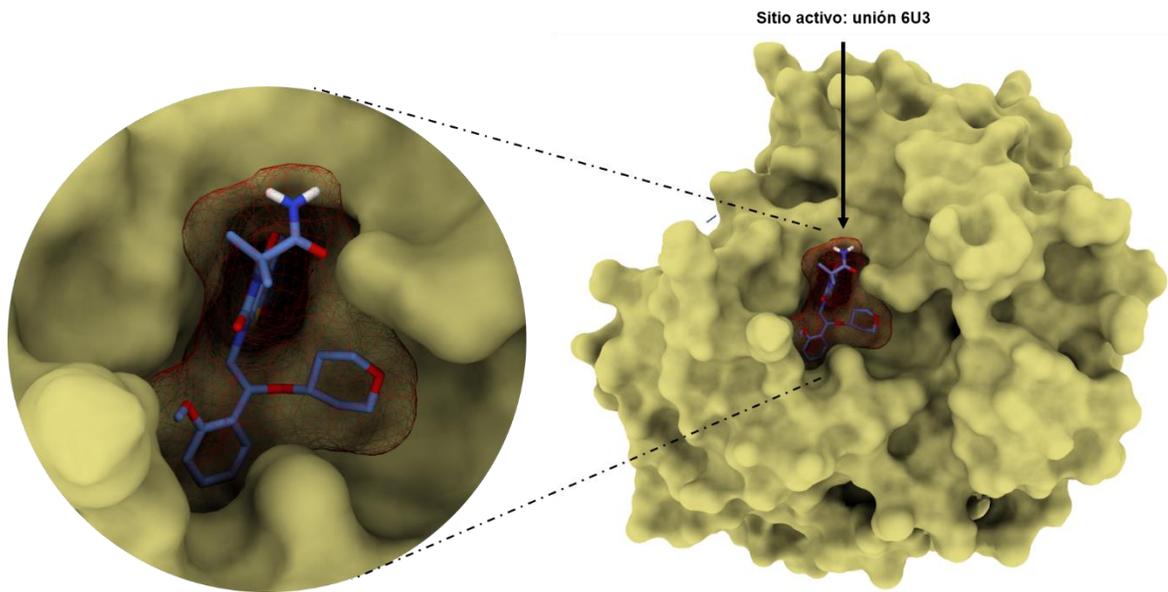


Figura 15. Salida de AV, que muestra el sitio de unión del inhibidor endógeno 6U3/ND-30 en interacción con el sitio activo de la ACC2. En malla roja se muestra la superficie de incidencia del inhibidor sobre la ACC2.

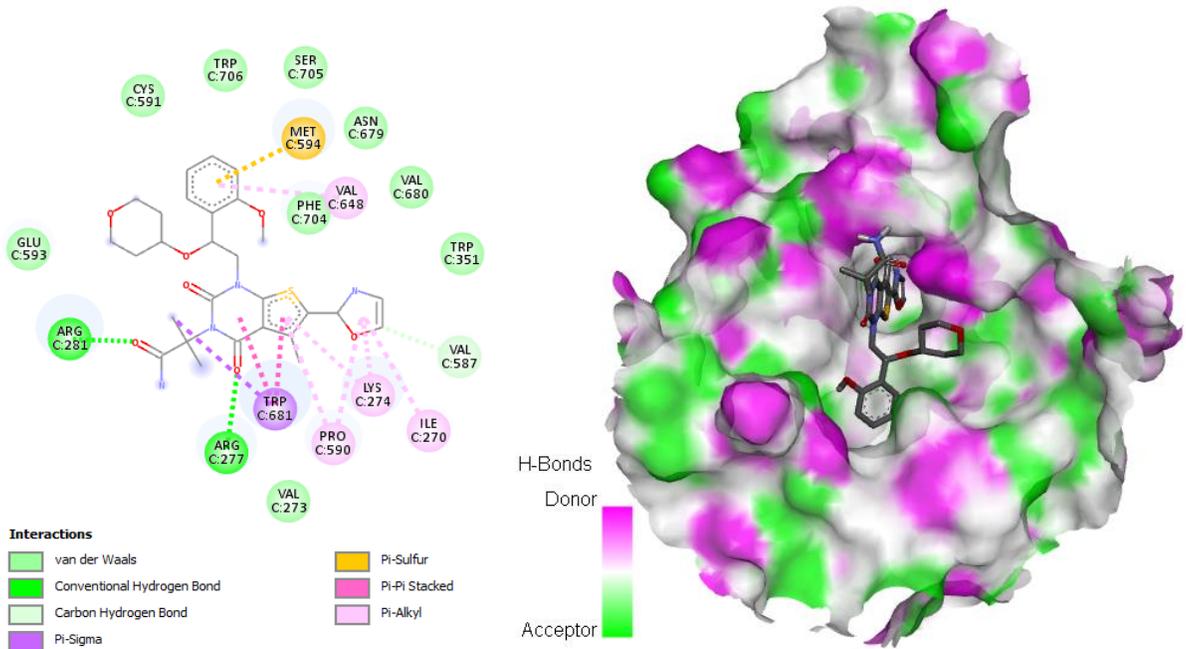
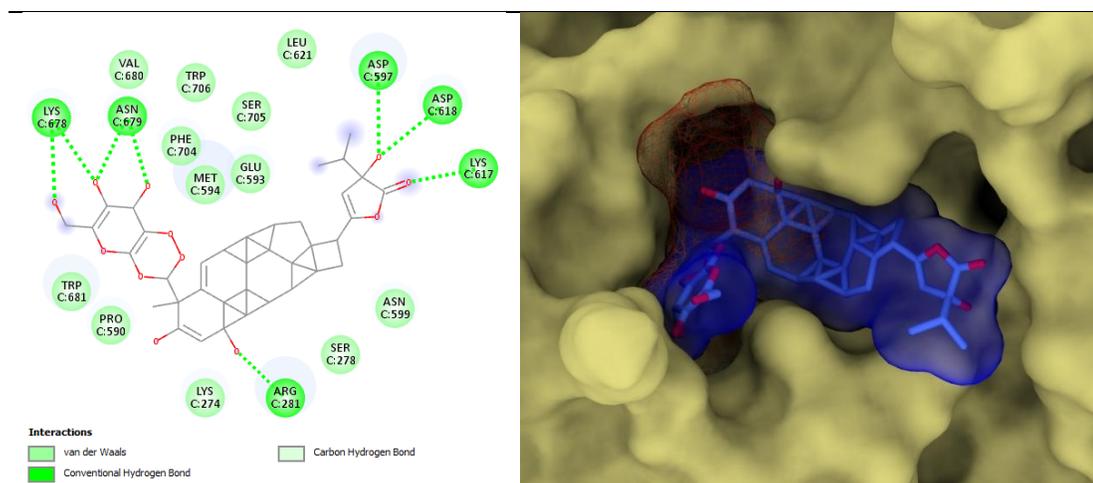


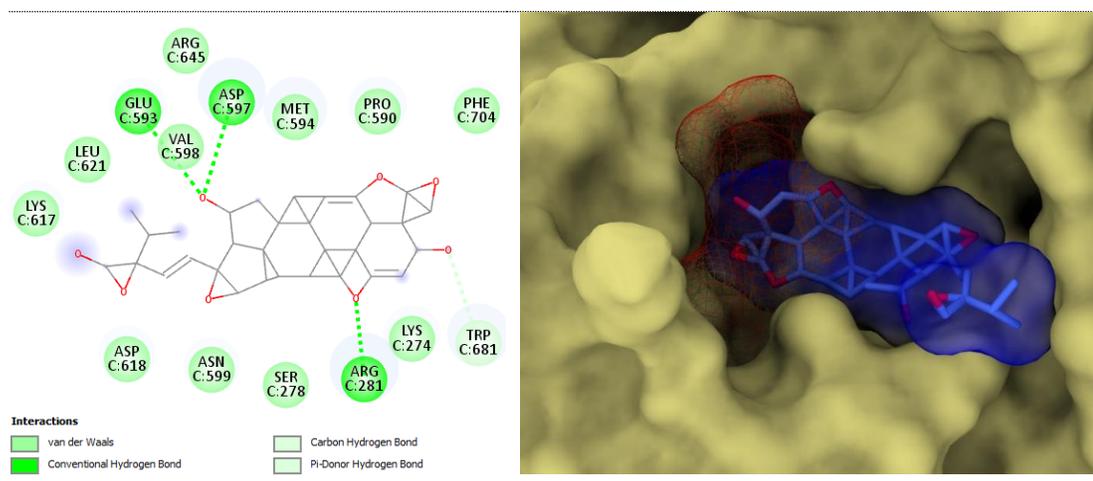
Figura 16. A la izquierda un diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor ACC2 y el inhibidor endógeno 6U3/ND-30. A la derecha se muestra salida de AV del 6U3, superficie de contacto que muestra las zonas más probables de donar y/o aceptar enlaces de hidrogeno en la enzima ACC2.

Tabla 16. Posición de acoplamiento de los ligandos no endógenos que tuvieron una energía libre de unión cercana al inhibidor endógeno 6U3/ND-30 en la enzima ACC2. (a) Diagrama 2D que muestra los tipos de contactos formados entre el receptor y el ligando. (b) Salida de AV, que muestra los ligandos no endógenos en interacción con el sitio activo de la ACC2 en 3D. Superficie en malla de color rojo: representa la posición de unión del 6U3/ND-30 para fines comparativos.

Acoplamiento molecular de pasiflorato de glucosilo (-11 ΔG)



Acoplamiento molecular de ácido ciclopasifloico E (-10,2 ΔG)



Análisis de propiedades ADME: Ensayo de absorción, distribución, metabolismo, excreción.

Como se evidenció en resultados anteriores, que de todos los compuestos analizados en las tres enzimas solo cinco son óptimos candidatos a inhibidores, por su alta energía libre de unión y por la superposición del inhibidor endógeno en el sitio activo de las enzimas, estos fueron luteolina, ácido clorogénico, ácido ciclopasifloico E, pasiflorato de glucosilo y moupinamida. Por otra parte, también se tuvieron en cuenta los compuestos de saponarina e isoorientina, que ocuparon alrededor de la mitad de la posición del inhibidor endógeno en el sitio activo de las enzimas y presentaron energías de acoplamiento superiores a los inhibidores. Por estas razones, a estos siete compuestos se les realizó un análisis de las propiedades ADME y de toxicidad.

Las propiedades ADME de los siete compuestos seleccionados se muestran en la Tabla 19. Se evidenció que todos los compuestos son solubles, pero el ácido ciclopasifloico E, pasiflorato de glucosilo y moupinamida según el coeficiente de partición entre n- octanol y agua ($\log P_{o/w}$) son más lipofílicos. Por otra parte, todos los compuestos presentan una baja absorción gastrointestinal a excepción de la moupinamida. En cuanto a la accesibilidad sintética (de 1 muy fácil a 10 muy difícil), el pasiflorato de glucosilo presentó el mayor puntaje con 8,76 y la moupinamida el valor más bajo 2,55, los demás compuestos presentaron puntajes intermedios (Tabla 19).

Tabla 17. Lista de propiedades farmacocinéticas (físicoquímicas, lipofilia, solubilidad en agua, semejanza con el fármaco y química medicinal) de los siete compuestos seleccionados.

Propiedades	Parámetros	Lut	Ac	AcE	Pas	Moup	Sap	Iso
Propiedades físico-químicas	Átomos pesados	41	25	96	49	23	42	32
	Arom. átomos pesados	16	6	0	0	12	16	16
	Enlaces rotables	7	5	7	7	7	6	3
	Refractividad molar	134,59	83,50	148,08	176,66	88,98	198,73	108,63
Lipofilia	Log Po/w	-1,09	-0,39	2,84	2,16	2,39	-1,65	-0,24
Solubilidad en agua	Log S (ESOL)	Soluble	Muy soluble	Moder. soluble	Moder. soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Farmacocinética	Absorción GI	Baja	Baja	Baja	Baja	Alta	Baja	Baja
Química medicinal	Accesibilidad sintética	6,11	4,16	7,27	8,76	2,55	6,38	5,04

Nota: Lut = luteolina, Ac = Acido clorogénico, AcE = Ácido ciclopasifloico E, Pas = Pasiflorato de glucosilo, Moup = Moupinamida, Sap = Saponarina, Iso = Isoorientina. N/A = La predicción de consenso para esta sustancia química se considera poco confiable ya que solo se puede hacer una predicción.

Análisis de toxicidad

Para identificar la toxicidad y los efectos adversos de los siete compuestos seleccionados, se utilizó la herramienta TEST de libre acceso y el servidor ProTox-II. Cada software se utilizó para evaluar varios parámetros toxicológicos como la toxicidad aguda, la hepatotoxicidad, la citotoxicidad, la carcinogenicidad, la mutagenicidad y la inmunotoxicidad, y el resultado se calculó a partir de la dosis letal media prevista (DL50) en mg/kg de peso (Tabla 20). El ácido ciclopasifloico E fue el único compuesto que no presentó toxicidad en órganos ni en punto finales, los demás compuestos presentaron como máximo un punto de toxicidad. Así mismo, se evidenció que la isoorientina es el compuesto que más genera toxicidad en general presentando la clase 3, los demás compuestos presentaron clases de citotoxicidad superiores indicando

menos toxicidad (clase 6, no general ningún tipo de daño). En cuanto a la toxicidad para el desarrollo, la moupinamida es el único compuesto tóxico.

Tabla 18. Lista de propiedades de toxicidad (toxicidad en órganos, puntos finales de toxicidad, vías de señalización de receptores nucleares Tox21, vía de respuesta al estrés Tox21, LC50 (96 h) peces cabezudos, toxicidad en el desarrollo, LD50 oral en ratas, factor de bioacumulación) de los siete compuestos seleccionados.

Punto final	Objetivo	Lut	Ac	AcE	Pas	Moup	Sap	Iso
Toxicidad en órganos	Hepatotoxicidad	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Puntos finales de toxicidad	Carcinogenicidad	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
	Inmunotoxicidad	Activo	Activo	Inactivo	Activo	Activo	Activo	Inactivo
	Mutagenicidad	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Activo
	Citotoxicidad	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
	LD50 (mg/kg)	N/A	5000	9800	500	500	5000	159
	Clase de toxicidad	N/A	5	6	4	4	5	3
	Tox21-Vías de señalización de los receptores nucleares.	Receptor de andrógenos (AR)	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Receptor de hidrocarburos de arilo (AhR)		Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Elemento de respuesta al factor de choque térmico.		Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Peces cabezudos LC50 (96 h)	mg/L	0,00344	3,38	N/A	N/A	0,28	N/A	0,31
48-h Daphnia magna LC50.	mg/L	159,47	153,94	5,48	11,48	8,41	205,81	32,34
Toxicidad para el desarrollo.	Valor	0,45	0,44	0,47	0,67	0,72	0,40	0,57
		No tóxico	No tóxico	No tóxico	No tóxico	Tóxico	No tóxico	Tóxico
DL50 de rata por vía oral.	mg/kg	1306,88	10488,44	68,97	9,99	1955,76	3433,94	1534,90
Factor de bioacumulación.	Log10	1,12	N/A	N/A	N/A	0,61	0,78	0,88

Nota: Lut = luteolina, Ac = Acido clorogénico, AcE = Ácido ciclopasifloico E, Pas = Pasiflorato de glucosilo, Moup = Moupinamida, Sap = Saponarina, Iso = Isoorientina. N/A = La predicción de consenso para esta sustancia química se considera poco confiable ya que solo se puede hacer una predicción.

5. DISCUSIÓN

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Passiflora edulis*

De acuerdo con el objetivo inicial de esta investigación se cuantificó la presencia de algunos metabolitos de interés en el EE. Se identificaron fenoles (239,3 mg EAG), polisacáridos (221,9 mg EG), flavonoides (182,4 mg EC), taninos (45,1 mg EAT) y alcaloides (8,4 mg EQ). Algunos autores han cuantificado estos mismos grupos de metabolitos en extractos de *P. edulis*. El contenido total fenólico del EE de hojas en *P. edulis* fue superior a lo reportado por Aguillón et al, (36) donde mencionan un contenido de $150,3 \pm 22,5$ mg EAG para un EE de hojas de maracuyá. En otros tipos de extractos, como el acuoso de hojas que reportan da Silva et al, (71) con un contenido de $8,3 \pm 0,22$ mg EAG, dicha diferencia posiblemente se deba a la polaridad de los fenoles presentes en el EE, es decir, el etanol pudo extraer más tipos de fenoles (no tan polares) que el agua debido a su menor polaridad. De los muchos tipos de polifenoles naturales que se han descrito, la luteolina un constituyente de la *P. edulis* reduce la lipogénesis mediante la inhibición de la activación de FASN en las células de cáncer de próstata y mama (72). Por otra parte, el contenido total de polisacáridos y flavonoides del EE de hojas en *P. edulis*, fue superior a lo reportado en otras investigaciones con $154,7 \pm 16,9$ mg EG y 29,4 mg EC (%p/v), respectivamente (34,73). En cambio, el contenido total de taninos del EE fue inferior a lo reportado en otra investigación con $67,90 \pm 3,02$ mg EAT (74).

Kuppusamy et al, (75) mencionan que los polisacáridos derivados de plantas tienen un papel protector en el desarrollo de lesiones de colon. Por otro lado, Ding et al, (76) mencionan que diversos flavonoides se disuelven en el estómago y el intestino delgado, donde pueden ser absorbidos al menos parcialmente a través de la mucosa del intestino delgado, lo que a su vez produce efectos metabólicos y sistémicos. Por ejemplo, las proantocianidinas

extraíbles de la dieta (EPA) se hidrolizan parcialmente en epicatequina en el intestino delgado y se absorben. En otras palabras, estos flavonoides pueden proporcionar metabolitos absorbibles y bioactivos para el tracto intestinal una vez que son fermentados por microorganismos colónicos. El estudio en mención mostró que 10 mL/kg de fibra dietética rica en proantocianidinas podrían inducir cambios en la expresión de genes supresores de tumores y genes protooncogenes y afectar la síntesis de lípidos, el metabolismo energético, el ciclo celular y la apoptosis, lo que sugirió que los polifenoles y flavonoides podrían ayudar a reducir el riesgo de CC.

Se ha reportado que el ácido tánico (AT) exhibe actividad anticancerígena potencial contra varias líneas de células cancerosas (77), donde se ha evidenciado además que el AT presenta efectos duales al inhibir la señalización lipogénica y las vías metabólicas de los lípidos, observándose que la expresión de proteínas responsables de la lipogénesis se reguló negativamente, además, la permeabilidad de la membrana y la funcionalidad de las células de cáncer de próstata se vieron gravemente afectadas y provocaron una desorganización nuclear durante la exposición al compuesto (74). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se sabe que los taninos están poco biodisponibles, se metabolizan y convierten ampliamente mediante microbiota colónica en otras formas bioactivas.

Además, las diferencias encontradas respecto a las concentraciones de los metabolitos posiblemente se deban a la metodología y estándares empleados, como también según Blanco et al, (78) a que la producción y cantidad de metabolitos secundarios varía entre individuos de la misma especie por su localización geográfica, condiciones ambientales y biológicas a las que fueron expuestos los biotipos. Este acontecimiento fue considerado como un punto importante en la búsqueda de compuestos promisorios y caracterización de la actividad biológica de *P. edulis*, ya que las propiedades identificadas y descritas en esta investigación pueden resultar variables a las descritas por

otros autores. Entre las causas, se encuentra que las características y propiedades de cada extracto pueden ser mediadas y potenciadas por la compleja mezcla de metabolitos presentes en cada uno. De hecho, cada extracto en particular, podría ser más efectivo que la administración de algunos compuestos individualmente. Como se ha descrito, la mayoría de compuestos aislados de especies del género *Passiflora* actúan como “profármacos”, pues su actividad requiere de una activación metabólica o es dependiente de la interacción con otros compuestos (79).

VIABILIDAD CELULAR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis*

Los ensayos biológicos realizados con SFB revelaron que el EE de hojas de *P. edulis*, presentan un efecto antiproliferativo significativo sobre SW480 a 24 y 48 horas ($IC_{50/24horas} = 4705 \mu g/mL$ - $IC_{50/48horas} = 4269 \mu g/mL$). Además, el porcentaje de inhibición máximo del EE fue de 47,8% a las 48 horas y del 29,6% a las 24 horas en SW480. En contraste, el EE generó un mayor efecto sobre las células SW480, que en la línea celular HFF (no tumoral), esto nos muestra que el EE tiene mayor selectividad por la línea celular tumoral SW480 que por la no tumoral HFF ($IC_{50/24horas} = 18471$), hecho que es favorable ya que se busca una actividad antiproliferativa diferencial, es decir, que el EE no sea tóxica sobre células normales. Esto sugiere que el EE obtenido en este estudio presenta compuestos bioactivos con actividad antiproliferativa, además, de generar efectos morfológicos prominentes en las células tratadas respecto a las no tratadas, sin embargo, según el Instituto Nacional de Cáncer (EE. UU) sugiere que un extracto crudo con IC_{50} inferior a $30 \mu g/mL$ se considera altamente citotóxico (80). Usando el criterio NCI, esto sugiere que los extractos evaluados aquí presentan baja actividad. En lo relacionado con nuestro estudio, hay poca información disponible sobre el potencial anticancerígeno del EE que podría estar mediado por un mecanismo

citotóxico, antiproliferativo o alteraciones metabólicas. Por un lado, investigaciones anteriores reportan actividades antiproliferativas sobre SW480 del 42% a 48 horas de exposición del EE de hojas de *P. edulis* al 10% (v/v), dicha actividad es inferior a la reportada en nuestro estudio (47,8%) (81). Algunos de estos efectos se han establecido en otras especies del género *Passiflora*, caso del extracto etanólico de *P. ligularis* que mostró actividad antiproliferativa relevante sobre las células de carcinoma hepatocelular humano ($IC_{50} = 5 \text{ mg/mL}$), pero no se observó efecto citotóxico en cultivos primarios de hepatocitos (82). Por otro lado, el extracto de *P. foetida* (especie hermana de *P. edulis*) a una dosis de 92 mg/kg presentó resultados antitumorales y una letalidad celular superior al 50% en un modelo *in vivo* de carcinoma de Walker. El potencial antitumoral de las especies del género *Passiflora* L. se ha descrito en un modelo *in vitro* de carcinoma de Ehrlich, con una IC_{50} de 800 $\mu\text{g/mL}$ (83). Por lo tanto, estas investigaciones sugieren que la concentración media letal antiproliferativa y citotóxica de extractos del género *Passiflora* presenta concentraciones mínimo de 800 $\mu\text{g/mL}$ hasta 50 mg/mL.

Los resultados revelaron que el extracto tiene un efecto sobre la viabilidad y proliferación celular. Estos efectos podrían estar relacionados con la presencia de algunos metabolitos que se han descrito en extractos de *P. edulis* como terpenos y carbohidratos, que se han encontrado tanto en extractos acuosos de la fruta como en extractos etanólicos de las hojas, así mismo, los glucósidos como "Passiflorine" y "Passicapsin", alcaloides, carotenoides, antocianinas, ácido ascórbico y lactonas que se han encontrado en diferentes partes de esta planta, podrían estar involucrados en los efectos biológicos observados en el presente trabajo (31,76).

Estos resultados de viabilidad celular favorecen el diseño metodológico de la investigación, debido a que no está afectando la viabilidad celular de SW480 respecto al control en las concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Es una

ventaja, porque reduce el sesgo al momento de determinar el contenido total de triglicéridos y colesterol, ya que el efecto que se evidenció sobre los lípidos se debería al extracto y no al número de células.

EFECTO HEMOLÍTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* EN ERITROCITOS HUMANOS

El modelo de eritrocitos se ha utilizado ampliamente ya que presenta una indicación directa de la toxicidad de las formulaciones inyectables, así como una indicación general de la toxicidad de la membrana, debido a que es objetivo principal del ataque de radicales libres porque poseen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, otra ventaja del modelo de eritrocitos es que la sangre está fácilmente disponible y que las células son fáciles de aislar de la sangre; además, su membrana tiene similitudes con otras membranas celulares. Varios investigadores han utilizado eritrocitos como sistema modelo para el estudio de la interacción de los fármacos con las membranas. La hemólisis se debe a la destrucción de los glóbulos rojos que resultó de la lisis de la bicapa lipídica de la membrana y se relaciona con la concentración y la potencia del extracto, esa actividad hemolítica que presenta cada extracto está relacionada con su composición química (84,85). El extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis* tiene un efecto mínimo sobre la estabilidad de la membrana de eritrocitos, además, dicha actividad está por debajo del ácido ascórbico a 500 µg/mL que es un agente protector y antioxidante; estos datos sugirieron el efecto no tóxico del extracto, lo que lo hace adecuado para la preparación de fármacos implicados en el tratamiento de la enfermedad del cáncer. Así mismo, el EE de *P. edulis* no presenta toxicidad en eritrocitos humanos en concentraciones de hasta 500 µg/ml.

En otra investigación, realizada por Bandara et al, (84) con extractos metanólico de hojas de *P. suberosa* pudieron inhibir la hemólisis de los eritrocitos de vaca de una manera dependiente de la dosis. La presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos en los extractos puede

considerarse responsable de la inhibición de los radicales libres formados como resultado de la peroxidación lipídica, así mismo, se ha informado que las antocianinas reducen la hemólisis de los eritrocitos debido a su eficacia antioxidante. El cribado fitoquímico que se ha realizado en diferentes especies de *Passiflora* mostró la presencia de antocianinas en los extractos de *P. suberosa* y *P. edulis* (86,84), lo que condujo a una potente actividad antihemolítica exhibida. Además, se ha demostrado que la actividad hemolítica baja o nula es una característica importante de los agentes “antisickling”. Por ejemplo, la anemia de células falciformes modifica la flexibilidad de la membrana de los eritrocitos haciéndolos más sensibles y frágiles frente a los radicales libres. Cualquier compuesto con potente eficacia antioxidante como el extracto acuoso de *P. edulis* tiene la capacidad de evitar que la hemoglobina se oxide y así prevenir la generación de radicales libres y, por lo tanto, podría usarse como un fármaco “antisickling” (86).

EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora edulis* SOBRE LÍPIDOS TOTALES (COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS)

Todavía no está claro el mecanismo de acción de la actividad anticancerígena de los extractos de maracuyá, es probable que dependa de los efectos directos de los compuestos bioactivos sobre las células de CC o si está relacionada para este caso específico, con la reducción de lípidos sistémicos, que en última instancia confiere efectos indirectos que limitan el crecimiento del cáncer colorrectal. Así mismo, el impacto de extractos de *P. edulis* en el metabolismo de lípidos del CC ha sido poco investigado, nuestro estudio representa un punto de partida válido para arrojar luz sobre este importante tema.

En términos generales, hemos demostrado que el EE de hojas de maracuyá afecta más a los triglicéridos que al colesterol a nivel intracelular, caso contrario se evidenció a nivel extracelular, donde se vio una regulación positiva del flujo de salida del colesterol a 48 horas de exposición del EE, ahora bien, el EE a las 24 horas presentó una regulación negativa sobre colesterol,

incluso, por encima de los triglicéridos, es decir, el efecto diferencial del EE sobre el colesterol se viene dando a las 48 horas, en contraparte, sobre los triglicéridos no es diferencial ya que si bien se está reteniendo la expulsión a las 24 horas, no es estadísticamente significativa la cantidad que retiene respecto al control, una vez pasan 48 horas de incubación se ve un regulación positiva del flujo de salida pero no es significativo.

El análisis del efecto del EE de hojas de *P. edulis* sobre el contenido total de triglicéridos y colesterol en células de cáncer colorrectal es pionero en el área, debido a que no hay reportes hasta el momento acerca del efecto potencial en la reducción del colesterol y triglicéridos totales en líneas celulares. Ahora bien, se tiene evidencia de que los extractos vegetales generalmente contienen múltiples componentes y tienen el potencial de apuntar a vías combinatorias con menos efectos secundarios, proporcionando así una alternativa para un control más efectivo y seguro del hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y la regulación positiva del flujo de salida de colesterol y triglicéridos en la enfermedad del CC (87,31).

En consecuencia, una posible interpretación de los hallazgos de esta investigación, como la reducción del contenido total de triglicéridos por parte EE, es que, según Lettieri et al, (88) las células sufren un deterioro dramático en el crecimiento celular, lo que culmina en un estado metabólico donde la tasa de consumo de lípidos neutros es probablemente más alta que la tasa de almacenamiento, ya que las células intentan sobrevivir al potente estrés inducido por los compuestos bioactivos del EE. En otros tipos de investigación, si bien no se realizan ensayos sobre lípidos en modelos celulares, es un buen acercamiento el estudio de Sari et al, (89) donde realizaron un estudio *in vivo* sobre el efecto del extracto de *P. edulis* donde 100 mg de extracto/kg de peso corporal en ratas tuvo un efecto reductor sobre el nivel sérico de colesterol total, por otro lado, 50 mg de extracto/kg de peso corporal disminuyó el nivel sérico de triglicéridos en dos semanas en ratas

jóvenes, evidenciando que se requiere menor concentración de extracto de maracuyá para disminuir los niveles séricos de triglicéridos, estos resultados son afines a nuestra investigación donde se requiere menor IC₅₀ del EE de *P. edulis* para reducir el contenido total de triglicéridos a 24 y 48 horas (Tabla 5), es importante mencionar que el colesterol intracelular también se vio reducido.

La salida de colesterol de las células o también conocido como el transporte reverso del colesterol, se refiere a la eliminación del exceso de colesterol de las células periféricas y para este caso de las células de CC. Se han descrito dos transportadores importantes que contribuyen a regular la salida de colesterol de las células: el transportador de casete de unión a ATP A1 (ABCA1), que es responsable de la salida a APOA-I libre, translocasa de fosfolípidos y la formación de partículas HDL naciente, y el transportador de casete de unión a ATP G1 (ABCG1), que regula la salida a HDL madura (90). La promoción de la salida de colesterol puede controlar y sensibilizar al cáncer (91).

Existe evidencia acumulada de que la medicina herbal podría promover la salida de colesterol a HDL a través de ABCA1 o ABCG1, como leoligina (89), leonurina (92), andrografólida (93), alicina (94), puerarina (95), crisina (96), luteolina (97) y resveratrol (98). Como es bien conocido, el aumento de los niveles de colesterol intracelular crea un entorno propicio para la progresión del tumor, ahora bien, regular positivamente estos receptores a través de compuestos bioactivos podría reducir los niveles de colesterol intracelular. En este estudio, se encontró que el EE de maracuyá regula positivamente el flujo de salida de colesterol (leve). Este hallazgo es importante, ya que en otras investigaciones tales como Lai et al, (99) demostraron que las células de cáncer de pulmón con TTF-1 alto (factor de transcripción que aumenta la actividad del ABCA1) disminuyeron los niveles de colesterol intracelular, provocando una sensibilización de la línea celular a las estatinas (fuerte inhibidor de la HMGCR). Entonces, se plantea que regular positivamente la

salida de colesterol podría optimizar el tratamiento del cáncer y mejorar la comprensión general de la fisiopatología del cáncer.

También, Ingale & Hivrale (100) mencionan que las saponinas del maracuyá tienen actividad reductora sobre el colesterol plasmático y se utilizan ampliamente como un componente de adyuvantes potentes para estimular la respuesta inmunitaria, principalmente cuando se complejan con el colesterol. Sin embargo, no todas las especies de *Passiflora* contienen saponinas en sus hojas. Además, las saponinas disminuyeron eficazmente las concentraciones de triglicéridos séricos y colesterol total, pero no mostraron ningún efecto aparente sobre las concentraciones de HDL y colesterol hepático (100).

EVALUACIÓN *in silico* DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Passiflora edulis* COMO INHIBIDORES DE LAS ENZIMAS 3-HIDROXI-3-METIL-GLUTARIL-COA REDUCTASA (HMGCR) Y LA ACETIL-COENZIMA A CARBOXILASA (ACC)

La semejanza de los fármacos

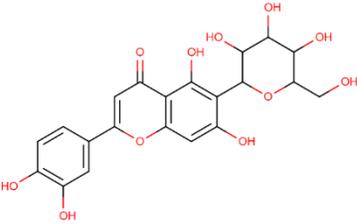
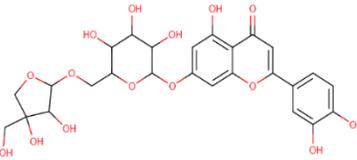
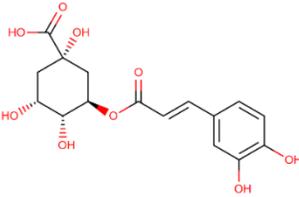
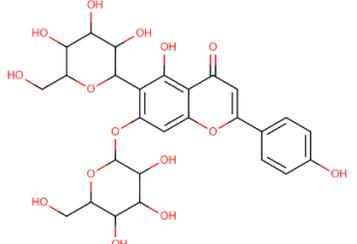
Se ha demostrado desde lo experimental que los compuestos bioactivos evaluados en este estudio presentan afinidad por una o más de las enzimas estudiadas (Tabla 19), además, de lo evidenciado en nuestro estudio. Para determinar que compuesto tiene potencial como fármaco, uno de los métodos es seguir la regla de los cinco (Ro5). Según esta regla, los fármacos activos por vía oral no deben tener más de una infracción de los criterios establecidos (101). Por lo tanto, se verificó si de los compuestos elegidos como posibles candidatos a fármaco cumplían con la Ro5 de Lipinski. Algunos de esos compuestos que muestran violaciones hacia la Ro5 son la luteolina (3), ácido ciclopasifloico E (2), pasiflorato de glucosilo (3), saponarina (3), Isoorientina (2), caso contrario ocurrió con la moupinamida y ácido clorogénico que si cumplieron con la Ro5 (Tabla 11). La regla se utiliza para evaluar la similitud del compuesto bioactivo con un fármaco en general, así como para determinar

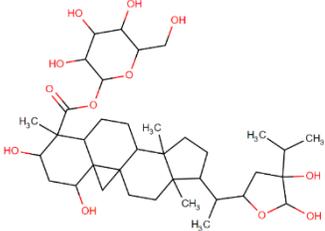
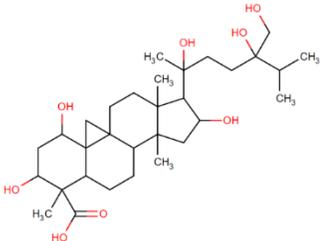
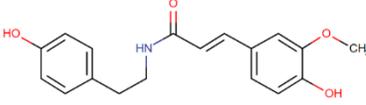
si algún compuesto químico en particular posee propiedades químicas y físicas para ser utilizado como fármaco activo, que puede consumirse por vía oral en seres humanos (102). También actúa como base para predecir una alta probabilidad de éxito o fracaso de un compuesto con actividad farmacológica o biológica particular para ser desarrollado como fármaco. Ro5 sugiere además que, si un compuesto muestra dos o más violaciones de Ro5, entonces muestra baja solubilidad o permeabilidad (101). Para este caso, los cinco compuestos mencionados anteriormente que no cumplen la regla Ro5 posiblemente al momento de experimentar con ellos, presenten baja solubilidad, baja permeabilidad de membrana y resulten ser nocivos al consumirse por vía oral, esto en un modelo teórico hipotético. Ahora bien, al ser un modelo teórico tiene cierta incertidumbre que, para este estudio, se trató de minimizar calculando las características ADME. Partiendo de la Ro5, la moupinamida y el ácido clorogénico son los que mayores semejanzas presentan desde las propiedades químicas, físicas y farmacológicas con un fármaco.

Acoplamiento molecular de ligandos sobre la enzima HMGCR

Este estudio, tuvo como objetivo identificar posibles compuestos bioactivos de *Passiflora edulis* similares a fármacos potenciales que pueden inhibir las enzimas diana HMGCR, ACC1 y ACC2 involucradas en el metabolismo lipídico mediante la realización de estudios de acoplamiento molecular. Respecto a la enzima HMGCR se han encontrado varios resultados que muestran que estos compuestos tienen una mejor postura de acoplamiento que el sustrato HMG-CoA e inhibidor 116/cerivastatina endógenos y que están cristalizados (Tabla 12; Tabla 13; Tabla 14). Si se yuxtaponen los resultados, los candidatos potenciales para convertirse en fármacos dirigidos a la enzima HMGCR fueron luteolina, ácido clorogénico, moupinamida, e isoorientina.

Tabla 19. Lista de compuestos bioactivos y algunos reportes experimentales relacionados con los lípidos y cáncer.

Compuesto	Reportes de actividad biológica
<p style="text-align: center;"><i>Isoorientina</i> CAS number 4261-42-1</p> 	<p style="text-align: center;">Flavonoides</p> <p>La isoorientina (ISO) es capaz de prevenir el desarrollo de la hiperlipidemia y la lesión hepática inducidas por el alto contenido en fructosa al regular el metabolismo de los lípidos, la capacidad antioxidante y la liberación de citoquinas inflamatorias (103).</p> <p>En otras especies vegetales, la ISO aislada de hojas de <i>Eremurus spectabilis</i> afectó la proliferación de células de cáncer colorrectal (CRC) a través de las vías del ciclo celular. También alteró la expresión del gen P53 de la apoptosis. (104).</p> <p>Ye et al, (105) demostraron que la isoorientina tiene efectos antitumorales potenciales sobre el cáncer de páncreas a través de las vías AMPK.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Luteolina</i> CAS number 491-70-3</p> 	<p>La luteolina reduce la lipogénesis mediante la inhibición de la activación de FASN en las células de cáncer de próstata y mama. De manera similar, la luteolina disminuye la acumulación de TG mediante la regulación a la baja de la expresión de los genes SREBP1c y FASN en las células HepG2 (72).</p> <p>Wong et al, (106) mostraron que la luteolina modula la transcripción de HMGCR al disminuir la expresión y la translocación nuclear de SREBP-2.</p> <p>Sezika et al, (107) demostró que la luteolina ejerce efectos anticancerígenos contra las células del CCR modulando la pleiotrofina a través de la expresión de miR-384.</p>
<p style="text-align: center;">Ácido clorogénico CAS number 327-97-9</p> 	<p>Cho et al, (108) observaron que tanto el ácido clorogénico como el ácido cafeico reducían los niveles en plasma de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol en ratones. Por otro lado, Huang et al (109) encontraron que el ácido clorogénico suprimió de manera dosis dependiente los lípidos séricos en una dieta rica en grasas.</p> <p>Wan et al (110) encontraron que el ácido clorogénico redujo significativamente el colesterol total, LDL y aumentó el colesterol HDL. Sin embargo, es necesario ampliar estudios en humanos (111).</p>
<p style="text-align: center;"><i>Saponarina</i> CAS number 20310-89-8</p> 	<p>Kim et al, (112) demostraron que la saponarina aumentó los niveles de calcio intracelular e indujo la fosforilación de la AMPK, aumentando así la resistencia y disminuyendo los niveles de colesterol mediante la inhibición de los procesos de biosíntesis de grasas y colesterol en modelo celular de HepG2 y adipocitos 3T3-L1.</p>

Triterpenoides	
<p><i>Pasiflorato de glucosilo</i> CAS number 1392-82-1</p> 	<p>El pasiflorato de glucosilo tiene propiedades hipolipemiantes (113); en hámsteres alimentados con una dieta hipercolesterolémica se encontró que dietas con fracciones ricas en fibra insoluble preparadas a partir de la semilla de maracuyá disminuyeron eficazmente las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol total, además que aumentó significativamente la excreción fecal de lípidos totales, colesterol y ácidos biliares (41). Se encontró que un mayor contenido de polifenoles y polisacárido en el extracto etanólico puede estar relacionado con la inhibición de la metaloproteasa de matriz MMP-2 y MMP-9 (114).</p>
<p><i>Ácido ciclopasifloico E</i> CAS number 301540-74-9</p> 	<p>Los ácidos ciclopasifloicos son otros de los compuestos aislados del género <i>Passiflora</i> (115); este ácido en particular fue producto de algunas purificaciones adicionales, respecto a sus propiedades biológicas específicas aún no se ha encontrado reporte de efectos sobre el metabolismo de los lípidos, lo cual da lugar a un amplio campo para nuevas investigaciones.</p>
Alcaloides	
<p><i>Moupinamida</i> CAS number 66648-43-9</p> 	<p>Ariya et al (116) mediante un análisis de acoplamiento molecular y estudios de interacción, reporto que ocho compuestos, entre los que se encontraba la moupinamida, presentaban mayor afinidad de unión con metalopeptidasas y formaban complejos estables. Concluyó que la moupinamida era los fármacos prometedores para el tratamiento del cáncer, superando incluso otros medicamentos ya disponibles en el mercado. Gong et al, (117) menciona que la moupinamida tiene efectos terapéuticos en la prevención y el tratamiento de inflamación intestinal y tumores, incluido el cáncer colorrectal (CCR).</p>

El receptor HMGR tiene una estructura diana equipada con un ligando de catálisis (1DQ9) y un inhibidor (1HWJ) en el Protein Data Bank (PDB). La estructura de HMGR humana en complejo con el sustrato HMG-CoA permitió una caracterización detallada del sitio activo. El análisis cristalográfico, así como los estudios de solución, revelan que la porción catalítica de HMGR humano es un tetrámero (61), donde cada monómero tiene su sitio activo. Por

lo tanto, se utilizó el método de acoplamiento dirigido para el receptor de la enzima HMGCR en su análisis de acoplamiento molecular. La búsqueda y selección de compuestos bioactivos se basó en el reporte y experimentos realizados sobre y con *P. edulis*. Hay tres criterios principales para llevar a cabo el acoplamiento molecular: intensidad o energía de enlace, enlaces moleculares y caracterización de enlaces. Por lo tanto, se seleccionaron 16 ligandos como compuestos líderes adecuados para inhibir el rendimiento HMGCR y en estudios adicionales basados en los criterios mencionados anteriormente (Tabla 12).

Según la investigación de Istvan et al, (60), el área del sitio de unión de la HMGCR involucró seis tipos de residuos diferentes que fueron asparagina, tirosina, alanina, lisina, serina e histidina, los cuales se encontraron en 12 posiciones en el sitio activo de ASN567, TYR479, ALA564, TYR479, ARG571, LYS722, ARG568, SER852, SER565, HIS866, SER865 y LYS755 (que están formando enlaces de hidrogeno). En el re-acoplamiento del ligando catalítico HMG-CoA y posterior análisis de los enlaces moleculares, se encontraron 7 superposiciones exactas de los residuos del sitio catalítico que fueron LYS735, SER565, HIS752, ARG568*2, ASN567 y LYS722, más de la mitad de las posiciones estaban unidas en forma de enlaces de hidrogeno y enlaces hidrofóbicos confiriendo estabilidad al complejo, nuevamente validando el sitio activo como unión del ligando. En el caso del inhibidor 116/ cerivastatina, de los cuatro enlaces que se reportaron (Tabla 13) todos están en posiciones exactas respecto a los residuos del sitio de unión reportados en el cristal que fueron SER565, SER865, ARG568 y LYS722. Una de las posiciones más importantes según reporta Istvan et al, (61), es la Ser565 debido a que contribuye a la formación de un enlace de hidrógeno. En resumen, estos estudios revelan cómo las estatinas se unen e inhiben su objetivo, la HMGCR. Los compuestos voluminosos e hidrofóbicos de las estatinas ocupan el bolsillo de unión a la HMG y parte de la superficie de unión para la CoA. Así, el acceso

del sustrato HMG-CoA a HMGCR se bloquea cuando se unen las estatinas. La estrecha unión de las estatinas con su receptor se debe probablemente al gran número de interacciones de van der Waals entre los inhibidores y el receptor HMGCR.

Ahora bien, los ligandos de interés que se unieron al sitio activo de este receptor pueden inhibir significativamente el funcionamiento del receptor, extrapolando las interacciones moleculares a un modelo teórico. Las interacciones de ligando que tuvieron afinidad de unión más negativa (mejor fuerza de unión) que la reportada por el acoplamiento del inhibidor (control) 116/cerivastatina que fue de - 7,0 kcal/mol (energía de corte), fueron 11 compuestos (Tabla 12), sin embargo, debido a la superposición de ligando/inhibidor control respecto al compuestos de interés, se indicó que los mejores candidatos fueron la luteolina, moupinamida, ácido clorogénico e isoorientina, así mismo, esa característica energética y de posición del ligando representó que estaba unido exactamente a más de un residuo del sitio activo del receptor, por ejemplo, en SER865 y ASN755 en forma de interacciones de enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos y van der Waals (Tabla 13; Tabla 14).

Cuantos más enlaces de hidrógeno se forman con el residuo de aminoácido, más fuertes son los acoplamientos. Esto hace que la puntuación de energía sea más baja y los enlaces serán más estables (102). En este estudio, cada ligando seleccionado tiene un número diferente de enlaces de hidrógeno y está ubicado en un residuo de aminoácido diferente respecto al receptor HMGCR. La luteolina presentó cinco enlaces de hidrogeno (ASN755*2, GLU559, GLY560, CYS561), la moupinamida un enlace de hidrogeno (ASN755), la isoorientina siete enlaces de hidrogeno (SER865, SER565, HIS861, ARG568*2, LYS722, ARG571), por último, el ácido clorogénico tiene cinco enlaces de hidrogeno con HMGCR en los residuos de ASN755, ALA751*2, GLU559 y HIS866.

La enzima HMGCR tienen enlaces residuales de aminoácidos en forma de interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los enlaces de hidrógeno se producen en cada ligando que se une al receptor de la enzima (Tabla 13). Las interacciones hidrofóbicas evitan un entorno líquido y tienden a agruparse en la estructura globular interna de las proteínas (118). Las interacciones hidrofóbicas pueden ser en forma de enlaces Pi-Sigma, Pi-alquilo y Alquilo (119). Este estudio muestra que cada ligando tiene interacciones hidrofóbicas que pueden apoyar la inhibición del receptor. En cuanto al enlace de van der Waals, contribuye al ligando a inhibir el receptor diana debido al gran número, aunque la fuerza de esta interacción no es tan fuerte como la del enlace de hidrógeno. Los enlaces de Van der Waals son atracciones eléctricas relativamente débiles debido a la polaridad inducida o permanente de las moléculas (120).

Acoplamiento molecular de ligandos sobre la enzima ACC1

También se tuvo como objetivo predecir la capacidad de inhibición de los compuestos bioactivos que se encuentran en *P. edulis* contra la ACC1, se han encontrado varios resultados que muestran que estos compuestos tienen una mejor postura de acoplamiento que el inhibidor B89/tepraloxidim cristalizado junto a la enzima (Tabla 12; Tabla 15; Tabla 16). Si se yuxtaponen los resultados, los candidatos potenciales para convertirse en fármacos dirigidos a la enzima ACC1 fueron la luteolina, ácido ciclopasifloico E, pasiflorato de glucosilo y saponarina.

El receptor ACC1 tiene una estructura diana equipada con el inhibidor B89 (3K8X) en el Protein Data Bank (PDB). La estructura de ACC1 en complejo con el sustrato B89/tepraloxidim se ha determinado a una resolución de 2,3 Å y permitió una caracterización más detallada del sitio activo. El análisis cristalográfico, ha demostrado que la actividad de la biotina carboxilasa (BC) cataliza la carboxilación dependiente de ATP de un cofactor de biotina, y luego

la actividad de la carboxiltransferasa (CT) cataliza la transferencia de este grupo carboxilo de la biotina activado al aceptor acetil-CoA, así mismo, demostraron que la porción catalítica del dominio CT de la ACC1 presentó tres monómeros y cada uno contiene un sitio activo como diana terapéutica. Por lo tanto, se utilizó el método de acoplamiento dirigido para el dominio CT de la ACC1 en su análisis de docking molecular. Para el análisis de acoplamiento molecular sobre la ACC (1 y 2), se siguió la misma búsqueda y selección de compuestos mencionado en el ítem anterior "*Acoplamiento molecular de ligandos sobre la enzima HMGCR*". Como también se siguieron los tres criterios principales para llevar a cabo el acoplamiento molecular: intensidad o energía de enlace, enlaces moleculares y caracterización de enlaces (Tabla 12).

Según la investigación de Xiang et al, (62), el área del sitio de unión de la ACC1 involucro tres tipos de residuos diferentes que fueron glicina, isoleucina y alanina, los cuales se encontraron en 4 posiciones en el sitio activo GLY1734, IIE1735, ALA1627, GLY1998 (que están formando enlaces de hidrogeno). En el re-acoplamiento del inhibidor y posterior análisis de los enlaces moleculares, se encontraron 3 superposiciones exactas de los residuos del sitio catalítico que fueron ALA1627, TYR1738 y ALA1712, sin embargo, solo el residuo ALA1627 estuvo formando enlaces de hidrogeno, los dos residuos restantes formaron enlaces de hidrofóbicos, que sumado a las interacciones de van der Waals confirió estabilidad al complejo, nuevamente validando el sitio activo como unión del ligando. Resulta interesante, que Xiang et al (62), mencionaron que una vez el inhibidor B89/tepraloxidim se uniera al receptor ACC1 presentaron pequeños cambios conformacionales donde residuos como TYR1738 antes de la polimerización de monómeros generaban interacciones de van der Waals y después de la polimerización cambiaran a formar enlaces menos débiles como los de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas, este residuo TYR1738 según reportan tiene un efecto importante en esos cambios

de conformaciones y es que abren un pequeño bolsillo en la interfaz del dímero del dominio CT. En comparación, el bolsillo no existe en la estructura de la enzima libre, subrayando la importancia funcional de estos (pequeños) cambios conformacionales. Sin estos cambios, el inhibidor no puede unirse a la enzima y no puede inhibir su actividad carboxiltransferasa. Entonces, este sitio de unión puede ser un punto de anclaje importante para desarrollar inhibidores del dominio CT.

Ahora bien, los ligandos de interés que se unieron al sitio activo de este receptor pueden inhibir significativamente el funcionamiento del receptor, extrapolando las interacciones moleculares y en un modelo teórico. Las interacciones de ligando que tuvieron afinidad de unión más negativa (mejor fuerza de unión) que la reportada por el acoplamiento del inhibidor B89/tepraloxidim que fue de $-6,3$ kcal/mol (energía de corte) fueron 10 compuestos (Tabla 12), sin embargo, debido a la superposición del inhibidor endógenos respecto al no endógeno, se indicó que los mejores candidatos fueron la luteolina, ácido ciclopasifloico E, pasiflorato de glucosilo y saponarina, así mismo, esa característica energética y de posición del ligando representó que estaba unido exactamente a más de un residuo del sitio activo del receptor, por ejemplo, en TYR1738, GLY1734 y ALA1627 en forma de interacciones de enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos y alquilo (Tabla 15; Tabla 16).

En este estudio, cada ligando seleccionado tiene un número diferente de enlaces de hidrógeno y está ubicado en un residuo de aminoácido diferente respecto al receptor ACC1. La luteolina presentó cinco enlaces de hidrogeno (SER1708, ILE1735, ALA1627, ARG1731, ASN1774), el ciclopasifloico E un enlace de hidrogeno (LEU1756), el pasiflorato de glucosilo tres enlaces de hidrogeno (ASN1744, ALA1627, SER1625), por último, la saponarina tiene seis enlaces de hidrogeno con ACC1 en los residuos de ALA1627, ILE1629*2, LYS1592, SER1595 y GLY1758. En el ítem anterior ya se ha mencionado la

importancia que tienen los enlaces de hidrogeno, hidrofóbicos tales como Pi-Sigma, Pi-alquilo y Alquilo como también las interacciones de van der Waals en la unión del inhibidor sobre el receptor, en este caso ACC1, que pueden apoyar la inhibición del receptor.

Acoplamiento molecular de ligandos sobre la enzima ACC2

Hemos encontrado varios resultados que muestran que algunos compuestos tienen una mejor postura de acoplamiento que el inhibidor 6U3/ND-30 cristalizado junto a la enzima (Tabla 12; Tabla 17; Tabla 18). Si se yuxtaponen los resultados, los candidatos potenciales para convertirse en fármacos moduladores dirigidos a la enzima ACC2 fueron el pasiflorato de glucosilo y ácido ciclopasifloico E.

El receptor ACC2 tiene una estructura diana equipada con el inhibidor B89 (5KKN) en el Protein Data Bank (PDB). La estructura de ACC2 en complejo con el sustrato 6U3/ND-630 se ha determinado a una resolución de 2,6 Å y permitió una caracterización más detallada del sitio activo. El análisis cristalográfico, demostró que el ND-630 inhibe la actividad del dominio biotina carboxilasa (BC) de la ACC2 al interactuar dentro de una región del sitio activo que es aceptor de fosfopéptidos y sitio de dimerización de la enzima, con el fin de interrumpir el proceso de la dimerización de la subunidad o monómeros e inhibir la actividad, así mismo, demostraron que la porción catalítica del dominio BC de la ACC2 presentó tres monómeros y cada uno contiene un sitio activo de importancia terapéutica. Por lo tanto, se utilizó el método de acoplamiento dirigido para el receptor de la enzima ACC2 en su análisis de docking molecular con los ligandos de interés (Tabla 12).

Según la investigación de Harriman et al, (63), el área del sitio de unión del 6U3 sobre la ACC2 involucró tres residuos diferentes que fueron arginina, triptófano y lisina, los cuales se encontraron en 4 posiciones en el sitio activo

ARG281, ARG277, TRP681, IYS274 (que están formando enlaces de hidrogeno e hidrofóbicos). En el re-acoplamiento del inhibidor y posterior análisis de los enlaces moleculares, se encontraron todas las superposiciones de los residuos del sitio catalítico respecto al inhibidor mencionadas anteriormente, nuevamente validando el sitio activo de unión al ligando. Es importante mencionar, que 6U3/ND-630 gana potencia al llenar también un bolsillo estrecho y profundo cerca de Val587, dicho bolsillo también se logró evidenciar en el re-acoplamiento (Figura 16).

Ahora bien, los ligandos de interés que se unieron al sitio activo de este receptor pueden inhibir significativamente el funcionamiento del receptor, en un modelo teórico. No se reportaron interacciones de ligando que tuvieran afinidad de unión más negativas o igual (mejor fuerza de unión) que la reportada por el acoplamiento del inhibidor 6U3/ND-630 que fue de $-11,7$ kcal/mol (energía de corte) (Tabla 12), sin embargo, el pasiflorato de glucosilo (-11 kcal/mol) y ácido ciclopasifloico E ($-10,2$) exhibieron energías libre de unión muy cercanas a la del 6U3/ND-630, posiblemente no sean fuertes inhibidores de la ACC2 pero se postulan como candidatos a modular la actividad enzimática, debido a que hubo una superposición del inhibidor endógeno respecto a los dos ligandos, ya que se acopla en la misma posición en el sitio activo (Tabla 16), a pesar de que la energía de unión esté por encima del inhibidor endógeno, es una energía libre de interacción alta sí se compara con la de ligandos catalíticos que reportan afinidades de unión más bajas de -10 kcal/mol, así mismo, esa característica energética y de posición del ligando representó que estaba unido exactamente a más de un residuo del sitio activo del receptor, por ejemplo, en ARG28 y TRP681 en forma de interacciones de enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos e hidrógeno donante de Pi (Tabla 17; Tabla 18).

En este estudio, cada ligando seleccionado tiene un número diferente de enlaces de hidrógeno y está ubicado en un residuo de aminoácido diferente

respecto al receptor ACC2. El pasiflorato de glucosilo presentó ocho enlaces de hidrogeno (LYS678*2, ASN679*2, ASP567, ASP618, LYS617, ARG281) y el ácido ciclopasifloico E tiene tres enlaces de hidrogeno con ACC2 en los residuos de GLU593, ASP597 y ARG281. En el ítem anterior ya se ha mencionado la importancia que tienen los enlaces de hidrogeno, hidrofóbicos tales como Pi-Sigma y Pi-alquilo como también las interacciones de van der Waals en la unión del inhibidor sobre el receptor, en este caso ACC2, que pueden apoyar la inhibición del receptor.

La ACC existe como dos isoenzimas específicas de tejido que están codificadas por genes separados y muestran distribuciones celulares distintas (67). ACC1 es una enzima citosólica presente en tejidos lipogénicos (hígado, tejido adiposo); ACC2 es una isoenzima asociada a la mitocondria y presente en tejidos oxidativos (hígado, corazón, músculo esquelético). En el hígado, la malonil-CoA formada en el citoplasma por ACC1 se usa principalmente para síntesis de AG y elongación, mientras que la malonil-CoA formada en la superficie mitocondrial por ACC2 actúa principalmente para regular la oxidación de AG mitocondrial a través de la inhibición alostérica de carnitina palmitoiltransferasa -1. Durante las últimas dos décadas han surgido numerosas evidencias que apoyan firmemente el concepto de que la inhibición directa de la ACC es un objetivo terapéutico importante (9,11). Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de AG y/o la estimulación de la oxidación tienen el potencial de afectar el cáncer de manera favorable, partiendo de la evidencia del metabolismo alterado de los ácidos grasos en el cáncer que es un sello distintivo y contribuye a la proliferación celular anormal y sostenida de la malignidad.

Análisis de propiedades ADME: Ensayo de absorción, distribución, metabolismo, excreción.

Después de la administración del fármaco por cualquier vía al cuerpo humano o en el modelo animal, sufre la absorción, distribución, metabolismo, excreción

resultando en un transporte activo o pasivo al sitio diana (65). Además, la interacción con las macromoléculas biológicas diana puede producir un efecto farmacológico deseable o indeseable. Entonces, el diseño de un medicamento es un proceso de evaluación paso a paso y, sin la evaluación, la justificación para rechazar el medicamento es costoso para cualquier empresa, debido al diseño experimental *in vitro* e *in vivo* tan robusto. La biodisponibilidad de un fármaco depende de la seguridad y la eficacia, puesto que la falta de esas características son las principales causas del fracaso de un fármaco, que dependen principalmente de las propiedades de ADME. Nosotros evaluamos las propiedades ADME de todos los candidatos a fármaco obtenidos anteriormente, que fueron siete compuestos bioactivos utilizando el servidor SwissADME *in silico* para ver las propiedades farmacocinéticas como lipofilicidad, solubilidad en agua, similitud con el fármaco y química medicinal de los compuestos. Es así que, el pasiflorato de glucosilo, ácido ciclopasifloico E y moupinamida presentaron un índice de lipofilia (Log Po/w) entre 2,16 y 2,84, indicando que son compuestos lipofílicos que pueden difundirse fácilmente a través de la membrana celular, sin embargo, la alta lipofilicidad ($\log P > 5$) a menudo contribuye a un alto recambio metabólico, baja solubilidad y mala absorción oral. Además, los compuestos altamente lipofílicos tienden a unirse a objetivos hidrófobos distintos del objetivo deseado y, por lo tanto, existe un mayor riesgo de promiscuidad y toxicidad (121). La formulación común para los compuestos bioactivos es la absorción oral e intestinal, donde el valor Log Po/w ideal es de 1,35 a 1,8 (122). Por tanto, la preparación oral no es adecuada para los compuestos de interés, por otro lado, una forma de dosificación inyectable puede ser una mejor opción para obtener un inicio de acción rápido ya que la absorción gastrointestinal (GI) para estos compuestos es baja (Tabla 19). Excepto, el compuesto bioactivo moupinamida que presentó una alta absorción intestinal, sin embargo, el Log Po/w que es 2,39 se pasa del límite para una administración por vía oral, pero esto se compensa con la alta absorción GI. Ahora bien, según Hopkins et al, (123) y Peters et al,

(124) la promiscuidad máxima para un compuesto es cuando Log Po/w alcanza un umbral superior a 2,5, el de moupinamida es inferior a este corte (125). En cuanto a la accesibilidad sintética, es un proceso para evaluar la facilidad de síntesis de compuestos donde la puntuación varía de 1 (muy fácil) a 10 (muy difícil), donde la síntesis química de la moupinamida en teoría sería fácil y rápida, caso contrario, con el pasiflorato de glucosilo y ácido ciclopasifloico E.

Los otros compuestos bioactivos presentaron un índice de lipofilia (Log Po/w) entre -1,65 y -0,24 indicando que son compuestos hidrofílicos no que pueden difundirse fácilmente a través de la membrana celular (no se absorben bien), por lo tanto, la dosificación inyectable puede ser una mejor opción para obtener un inicio de acción rápido ya que la absorción gastrointestinal (GI) para estos compuestos es baja, por otro lado, una ventaja es que son metabólicamente estables pero se excretan rápidamente. Por último, el valor de accesibilidad sintética de la luteolina, ácido clorogénico, saponarina e isoorientina está entre 4,16 y 6,38, y según Daina et al, (68) la síntesis química de estos compuesta tendría una complejidad en teoría, media.

Análisis de toxicidad

Para una mejor selección de compuesto bioactivos como candidatos a fármacos, la medición de la toxicidad *in silico* es un procedimiento importante antes de que el candidato a fármaco se someta a ensayos experimentales *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos. La medición computacional de toxicidad *in silico* se ha utilizado ampliamente debido a su precisión, rapidez y accesibilidad, que puede proporcionar información sobre cualquier compuesto sintético o natural. Banerjee et al, (70) clasifican la toxicidad de acuerdo con el sistema globalmente armonizado de clasificación de etiquetado de productos químicos (GHS). Los valores de DL50 se expresan en (mg/ kg): clase I: fatal en caso de ingestión ($LD50 \leq 5$), clase II: fatal en caso de ingestión ($5 < LD50 \leq 50$), clase III: tóxico por ingestión ($50 < LD50 \leq 300$), clase IV: nocivo por

ingestión ($300 < LD50 \leq 2000$), clase V: puede ser nocivo si se ingiere ($2000 < LD50 \leq 5000$) y clase VI: no tóxico ($LD50 > 5000$). Se identificó la toxicidad y el efecto adverso de los siete compuestos seleccionados, utilizamos tanto la herramienta TEST de libre acceso como el servidor ProTox-II. De acuerdo con el servidor ProTox-II, el compuesto ácido ciclopasifloico E pertenecía a la clase 6 y la DL50 es de aproximadamente 9800 mg/kg y no serían tóxicos en caso de administración oral. También se evidenció que, el ácido clorogénico y saponarina pertenecían a la clase 5 y la DL50 oscilaba entre 4500 y 5500 mg/kg por lo que la ingesta oral podría ser nociva. En el caso del pasiflorato de glucosilo y moupinamida pertenecían a la clase 4 y la DL50 oscilaba entre 450 y 550 mg/kg por lo que la ingesta oral sería nociva. Por último, la isoorientina pertenecía a la clase 3 con un DL50 de 159 mg/kg y es tóxico por ingestión. La luteolina, ácido clorogénico, pasiflorato de glucosilo, moupinamida y saponarina tienen cierta inmunotoxicidad.

6. CONCLUSIONES

El EE de hojas de *P. edulis* presenta metabolitos en orden descendente de concentración de fenoles, polisacáridos, flavonoides, taninos y alcaloides. En cuanto a la viabilidad celular, el EE presentó un efecto de forma diferencial sobre las dos líneas celulares, presentando mayor selectividad por la línea celular tumoral SW480 que por la no tumoral HFF a las 24 horas. El EE de hojas tiene menor actividad hemolítica que el control negativo (ácido ascórbico) a 500 µg/mL, siendo este último un protector de la membrana de los eritrocitos humanos.

En cuanto a la modulación lipídica, el EE a nivel intracelular afectó en mayor proporción tanto a 24 como a 48 horas el contenido total de triglicéridos, es decir, posiblemente la biosíntesis de triglicéridos de *novo* se redujo y/o aumento la β - oxidación, además, es dependiente de la dosis, por consiguiente, los niveles de triglicéridos intracelulares disminuyeron cuando la concentración de los tratamientos aumentó tanto a las 24 como a las 48 horas en comparación con el control. A nivel extracelular, la secreción de triglicéridos solo aumentó a las 48 horas y depende de la dosis. El EE a nivel extracelular estimuló en gran medida la expulsión del colesterol a las 48 horas superando a la de los triglicéridos, por consiguiente, la biosíntesis de colesterol de *novo* también se vio afectada, es decir, existe una reducción significativa del colesterol intracelular en el tiempo y en la dosis dependiente del control.

Con base en lo anterior y para brindar un posible mecanismo de acción del EE sobre los lípidos, se logró determinar *in silico* que cuatro compuestos bioactivos que son luteolina, ácido clorogénico, moupinamida e isoorientina podrían inhibir la actividad enzimática de la HMGCR y por consiguiente, posiblemente se este bloqueando la biosíntesis *de novo* de colesterol, por ende, los niveles intracelulares disminuyen junto con las hormonas, remodelación de membrana y división celular. Cuatro compuestos bioactivos que son pasiflorato de glucosilo, ácido ciclopasifloico E, saponarina y

nuevamente la luteolina, pueden inhibir la actividad enzimática de la ACC1, por consiguiente, se bloquea la síntesis de novo de AG citoplasmáticos y los niveles intracelulares de ácidos grasos y triglicéridos disminuyen. Todos estos compuestos bioactivos mencionados, tienen una afinidad de unión que es más baja (más energética) que el inhibidor endógeno en la respectiva enzima.

En el caso de la enzima ACC2, se encontraron dos compuestos que posiblemente estén modulando la actividad enzimática, debido a las energías libres de unión que reportaron el pasiflorato de glucosilo (-11 kcal/mol) y el ácido ciclopasifloico E (- 10,2 kcal/mol) sobre la enzima, que no fueron más bajas que el inhibidor 6U3/ND. Por consiguiente, se bloquea la síntesis de AG mitocondriales (leve) a través de la inhibición alostérica de la carnitina palmitoiltransferasa I, esto deriva en un aumento de la beta oxidación de AG en la mitocondrial. Disminuyendo a su vez, los AG y triglicéridos intracelulares.

Finalmente, con base en la prueba de toxicidad *in silico*, los compuestos en su mayoría presentaron toxicidad baja, y el análisis ADME determinó la fácil absorción en el sitio del tejido de compuestos bioactivos como ácido ciclopasifloico E, pasiflorato de glucosilo y moupinamida (todos lipofílicos), que es fácilmente soluble en grasa, además, de emplear una dosificación inyectable para mejorar la acción de los compuestos.

Este estudio propone a estos siete compuestos naturales como los posibles antagonistas de las enzimas limitantes en cada una de las vías metabólicas correspondientes, afectando la síntesis de triglicéridos y colesterol en un modelo celular de cáncer colorrectal SW480.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar un fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *Passiflora edulis* y evaluar de nuevo los efectos de los compuestos bioactivos aislados sobre los niveles lípidos tanto intracelular como extracelular, y de esta manera se podría determinar que compuestos están ejerciendo la actividad sobre los lípidos.
2. Realizar experimentos *in vitro* con el extracto y SW480 para cuantificar la disponibilidad de las enzimas. También, ensayos de inhibición competitiva con las enzimas de interés en estado recombinante.
3. Realizar experimentos *in vitro* para cuantificar la expresión de los genes que codifican para las enzimas de interés.
4. Realizar experimentos *in silico* del tipo dinámica molecular con los candidatos a fármacos para validar la información con más variables.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2016.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2016. *CA Cancer J. Clin.* 2016; 66: 7–30. doi:10.3322/caac.21332
3. Organización panamericana de la salud (OPS). Enfermedades no transmisibles y salud mental/Programa de Cáncer. United States of America. 2020.
4. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20: 137–155. doi:10.1038/s41580-018-0085-z.
5. Afonso MS, Machado RM, Lavrador MS, Quintao ECR, Moore KJ, Lottenberg AM. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients.* 2018; 10(6):760. doi:10.3390/nu10060760
6. Kljg YA, Deme JC, Corey RA, et al., Mechanism of lipid droplet formation by the yeast Sei1/Ldb16 Seipin complex. *Nat Commun.* 2021; 12: 5892. doi:10.1038/s41467-021-26162-6
7. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2020. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2020
8. Munir R, Lisec J, Swinnen JV et al., Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *Br J Cancer.* 2019; 120: 1090–1098. doi:10.1038/s41416-019-0451-4.
9. Koundouros N, Pouligiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer.* 2020; 122: 4–22. doi:10.1038/s41416-019-0650-z
10. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model Mech.* 2013; 6: 1353–1363.
11. Currie E, Schulze A, Zechner R, Tobias C, Walther TC, Farese R. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metab.* 2013; 18 (2): 153-61.
12. Harwood HJ. Jr Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin Ther Targets.* 2005; 9: 267–281.
13. Wang W, Bai L, Li W, Cui J. The Lipid Metabolic Landscape of Cancers and New Therapeutic Perspectives. *Front. Oncol.* 2020; 10: 605154. doi: 10.3389/fonc.2020.605154.
14. Sharma B, Gupta V, Dahiya D, Kumar H, Vaiphei K, Agnihotri N. Clinical relevance of cholesterol homeostasis genes in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019; 1864(10):1314–27. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.06.008.
15. Huang B, Song BL, Xu C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Metab.* 2020; 2(2):132-141. doi:10.1038/s42255-020-0174-0.
16. Clendening JW, Pandyra A, Boutros PC, et al. 2010. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(34):15051–6. doi:10.1073/pnas.0910258107
17. Ali A, Levantini E, Fhu CW, et al. 2019. CAV1 - GLUT3 signaling is important for cellular energy and can be targeted by Atorvastatin in Non-Small Cell Lung Cancer. *Theranostics.* 9(21):6157–74. doi: 10.7150/thno.35805
18. Donovan M.G., Selmin O.I., Doetschman T.C., Romagnolo D.F. 2016. Mediterranean Diet, Inflammatory Bowel Diseases, and Colon Cancer. In: Romagnolo D., Selmin O. (eds) Mediterranean Diet. Nutrition and Health. Humana Press, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27969-5_14.

19. Pointet al., Taieb J. Cáncer de colon. EMC - Tratado de medicina. 2017; 21:1-7.
20. Tham SY, Mai CW, Fu JY, Loh H-S. Combined Treatment of 5-Fluorouracil and Delta-Tocotrienol Induce of Apoptosis and Autophagy in Colorectal Cancer Cells. *Journal of Global Oncology*. 2018; 4(2). doi: 10.1200/jgo.18.82200.
21. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015; 6: 4103–4112.
22. Vilas-Boas AA, Pintado M, Oliveira ALS. Natural Bioactive Compounds from Food Waste: Toxicity and Safety Concerns. *Foods*. 2021; 10(7):1564. doi:10.3390/foods10071564
23. Fridlender M, Kapulnik Y, Koltai H. Plant derived substances with anti-cancer activity: From folklore to practice. *Front. Plant Sci.* 2015; 6:1–9. doi:10.3389/fpls.2015.00799
24. Stella OB, Felix A. 2021. Biosynthesis of Natural Products, Bioactive Compounds - Biosynthesis, Characterization and Applications, Leila Queiroz Zepka, Tatiele Casagrande do Nascimento and Eduardo Jacob-Lopes, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.97660.
25. Lichota A, Gwozdziński K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *Int J Mol Sci.* . 2018; 19(11): 3533. doi:10.3390/ijms19113533.
26. Araya S, Martins AM, Junqueira NTV, Costa AM, Faleiro FG, Ferreira ME. Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). *BMC Genomics*. 2017; 18(1):549. doi:10.1186/s12864-017-3881-5
27. Miroddi M, Calapai G, Navarra M, Minciullo PL, Gangemi S. *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *J Ethnopharmacol.* 2013; 150(3): 791–804. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.047
28. Miroddi M, Mannucci C, Mancari F, Navarra M, Calapai G. Research and development for botanical products in medicinals and food supplements market. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 649-720.
29. Casierra-Posada F, Jarma-Orozco A. Nutritional Composition of *Passiflora* Species. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. 2016; 517–534. doi:10.1016/b978-0-12-408117-8.00022-2
30. Taiwe GS, Kuete V. 2017. Chapter 24 - *Passiflora edulis*. Victor Kuete. Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Academic Press. 513-526.
31. He X, Luan F, Yang Y, et al., *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Front Pharmacol.* 2020; 11:617. doi:10.3389/fphar.2020.00617
32. Sakalem ME, Giuseppina N, Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2012; 22(6): 1219-1232. doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000108
33. Fields GB. Mechanisms of Action of Novel Drugs Targeting Angiogenesis-Promoting Matrix Metalloproteinases. *Front Immunol.* 2019; 10:1278. doi:10.3389/fimmu.2019.01278
34. Arango S, Ramírez V, Maldonado ME, Uribe D, Aguillón J. Cytotoxic and apoptotic activities of the aqueous fruit extract of *Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa* in an in vitro model of human colon cancer. *J. Chem. Pharm. Res.* 2017; 9: 258–264.
35. Ramírez V, Arango SS, Uribe D, Maldonado ME, Aguillón J. Effect of the ethanolic

- extract of *Passiflora edulis* F. Flavicarpa leaves on viability, cytotoxicity and apoptosis of colon cancer cell lines. *J. Chem. Pharm. Res.* 2017; 9: 135–139.
36. Aguillón J, Arango SS, Uribe DF, et al., Citotoxic and apoptotic activity of extracts from leaves and juice of *Passiflora edulis*. *J Liver Res Disord Ther.* 2018; 4(2):67 –71. doi: 10.15406/jlrtd.2018.04.00102
 37. Smruthi R, Divya M, Archana K, Ravi M. The active compounds of *Passiflora* spp and their potential medicinal uses from both *in vitro* and *in vivo* evidences. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences.* 2021; 4(1): 45-55. doi: 10.21608/jabps.2020.44321.1105.
 38. Lacerda-Miranda G, Soares VM, Thole AA, et al., Effect of Passion Fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg.*) Peel flour on the prognosis of acute pancreatitis after overnutrition during lactation. *Nat. Prod. J.* 2016; 6: 203–209. doi: 10.2174/221031550666160725154815.
 39. Chau C-F, Huang Y-L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2005; 49(8): 786–790. doi:10.1002/mnfr.200500060.
 40. de Souza CG, Rodrigues THS, Silva LMA, Ribeiro PRV, de Brito ES. Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. *J. Sci. Food Agric.* 2018; 98: 1362–1368. doi:10.1002/jsfa.8601
 41. Opo FADM, Rahman MM, Ahammad F, et al., Structure based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking and ADMET approaches for identification of natural anti-cancer agents targeting XIAP protein. *Sci Rep.* 2021; 11: 4049. doi:10.1038/s41598-021-83626-x
 42. Lateef T, Naeem S, Qureshi SA. In-silico studies of HMG-Co A reductase inhibitors present in fruits of *Withania coagulans* Dunal (Solanaceae). *Trop J Pharm Res.* 2020; 9(2): 306. doi: 10.4314/tjpr.v19i2.13.
 43. Rahman SMM, Atikullah M, Islam MN, et al., Anti-inflammatory, antinociceptive and antidiarrhoeal activities of methanol and ethyl acetate extract of *Hemigraphis alternata* leaves in mice. *Clin Phytosci.* 2019; 5 (16). doi:10.1186/s40816-019-0110-6
 44. Aguillón J, Maldonado M, Loango N, Landázuri P, Arango S. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts of *Passiflora edulis*. *Perspect Nutr Hum.* 2013; 13:13-25.
 45. Muñoz-Bernal O, Torres-Aguirre G, Nuñez-Gastélum J, Rodrigo-García J, Ayala-Zavala F, Alvarez-Parrila E. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas.* 2017; 20(2): 23-28. doi: 10.1016/j.recqb.2017.04.003.
 46. López-Legarda X, Taramuel-Gallardo A, Arboleda-Echevarría C, Segura-Sánchez F, Restrepo-Betancur L. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista cubana de Química.* 2017; 29: 180-198. Enlace: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000200002
 47. Armentano M, Bisaccia B, Miglionico R, et al., Antioxidant and proapoptotic activities of sclerocarya birrea [(A. Rich.) Hochst.] Methanolic root extract on the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *BioMed Research International.* 2015. doi: 10.1155/2015/561589.
 48. Fazel S, Hamidreza M, Rouhollah G, Mohammadreza V. Spectrophotometric

- determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pharm. Sci.* 2008; 32:17-20.
49. Leibovitz A, Stinson J, McCombs III W, McCoy C, Mazur K, Mabry N. Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research.* 1976; 36: 4562-4569.
 50. Gagos S, Hopwood VL, Iliopoulos D, et al. Chromosomal markers associated with metastasis in two colon cancer cell lines established from the same patient. *Anticancer Research.* 1995; 15(2):369-378.
 51. Neira LF, Stashenko E, Escobar P. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Rev.Univ.Ind.Santander.Salud.* 2014; 46 (1): 15-22.
 52. Maldonado-Celis ME, Arango-Varela SS, Rojano BA. Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw. against colon cancer cell lines. *Rev Cubana Plant Med.* 2014; 19(2):172-184.
 53. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006; 1: 1112–1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
 54. Commo F, Bot B. 2016. R package nplr: n-parameter logistic regressions cran.r-project.org. Enlace: <http://gauss.inf.um.es:8080/IC50/>.
 55. Martínez M, Mancuello C, Pereira C, et al. Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. *Steviana.* 2013; 5: 114-121.
 56. Nabavi SM, Habtemariam S, Nabavi SF, Moghaddam AH, Latifi AM. Prophylactic effects of methyl-3-O-methyl gallate against sodium fluoride-induced oxidative stress in erythrocytes *in vivo*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2013; 65(6): 868–873. doi:10.1111/jphp.12048
 57. Walker JM. (Ed.). 2009. The Protein Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. doi:10.1007/978-1-59745-198-7
 58. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37: 911-917.
 59. Aguilón-Osma J, Luzardo-Ocampo I, Cuellar-Nuñez ML, Maldonado-Celis ME, Loango-Chamorro N, Campos-Vega R. Impact of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. *Journal of food biochemistry.* 2019; 43(7): e12879. doi:10.1111/jfbc.12879
 60. Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *The EMBO Journal.* 2000; 19(5): 819–830. doi:10.1093/emboj/19.5.819
 61. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science.* 2001; 292(5519): 1160–1164.
 62. Xiang S, Callaghan MM, Watson KG, Tong L. A different mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by tepraloxydim. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009; 106(49):20723–20727. doi:10.1073/pnas.0908431106
 63. Harriman G, Greenwood J, Bhat S, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016; 13(13): E1796–E1805. doi:10.1073/pnas.1520686113.

64. Cosconati S, Forli S, Perryman AL, Harris R, Goodsell DS, Olson AJ. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2010; 5 (6): 597–607.
65. Han Y, Zhang J, Hu CQ, Zhang X, Ma B, Zhang P. 2019. *In silico* ADME and toxicity prediction of cefazidime and its impurities. *Front. Pharmacol.* 10:434. doi:10.3389/fphar.2019.00434
66. Moitessier N, Englebienne P, Lee D, Lawandi J, Corbeil CR. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 153 (S1): S7–S26.
67. Hadni H, Elhallaoui M. 2D and 3D-QSAR, molecular docking and ADMET properties: In silico studies of azaaurones as antimalarial agents. *New J. Chem.* 2020; 44: 6553–6565.
68. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 2017; 7:42717. doi:10.1038/srep42717
69. Martin TM, Harten P, Venkatapathy R, Das S, Young DM. A hierarchical clustering methodology for the estimation of toxicity. *Toxicology mechanisms and methods*. 2008; 18 (2-3): 251–266. doi: 10.1080/15376510701857353
70. Banerjee P, Eckert AO, Schrey AK, Preissner R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic acids research*. 2018; 46(W1): W257–W263. doi:10.1093/nar/gky318
71. da Silva JK, Betim-Cazarin C, Colomeu T. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. *Food Research International*. 2013; 53: 882–890.
72. Liu G, Zhang Y, Liu C, et al. Luteolin alleviates alcoholic liver disease induced by chronic and binge ethanol feeding in mice. *Journal of Nutrition*, 2014; 144(7): 1009–1015. doi:10.3945/jn.114.193128
73. Silva de Mesquita LS, Carvalho de Mesquita JW, Dutra RP, et al. Extraction Parameters Affect Flavonoids Content and Antioxidant Activities in *Passiflora edulis*. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016; 8(10):99-107.
74. Saravanan S, Parimelazhagan T. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*. 2014; 3(2): 56–64. doi:10.1016/j.fshw.2014.05.001
75. Kuppusamy P, Yusoff M, Maniam GP, Arief-Ichwan SJ, Soundharrajan I, Govindan N. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014; 4(3):173–181.
76. Ding S, Xu S, Fang J, Jiang H. El efecto protector de los polifenoles para el cáncer colorrectal. *Front Immunol.* 2020; 11: 1407. doi:10.3389 / fimmu.2020.01407
77. Nagesh PKB, Chowdhury P, Hatami E, et al. Tannic acid inhibits lipid metabolism and induce ROS in prostate cancer cells. *Sci Rep.* 2020; 10: 980. doi:10.1038/s41598-020-57932-9
78. Blanco M, Ringuet J, Consolini A, Viña S. 2014. Rendimiento de biomasa y aceite esencial de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown en respuesta a las prácticas agronómicas, y sus propiedades farmacológicas. *Universidad Nacional de la Plata-Facultad de Ciencias Exactas Departamento De Ciencias Biológicas*. Enlace: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/43581/Documento_completo.pdf?sequence=1

79. Salama M, Shahira-Mohammed E, Salem M. Bioactive lead compounds and molecular targets for the treatment of heart disease. Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discoverys. *Pharmacy*. 2020; 488.
80. Vijayarathna S, Sasidharan S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 2(10): 826-829
81. Ramírez V, Arango S, Maldonado ME, et al. Biological activity of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* ethanolic leaves extract on human colonic adenocarcinoma cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019; 9(02): 2019: 064-071.
82. Pessoa C, Costa-Lotufo LV, Leyva A, de Moraes MEA, de Moraes MO. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. *Advances in Phytomedicine*. 2006; 197–211. doi:10.1016/s1572-557x(05)02012-x
83. Sujana N, Ramanathan S, Vimala V, Sundaram M, Pemaiah B. Antitumour potential of *Passiflora incarnata*.L against Ehrlich ascites carcinoma. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012; 4(2):17-20.
84. Bandara KRV, Padumadasa C, Peiris DC. Potente actividad antibacteriana, antioxidante y tóxica de extractos de hojas de *Passiflora suberosa* L. *PeerJ*. 2018; 6: e4804. doi: 10.7717 / peerj.4804
85. Zohra M, Fawzia A. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. 2014; 5: (8): 495-500.
86. Ghada B, Pereira E, Pinela J, et al. Recovery of Anthocyanins from Passion Fruit Epicarp for Food Colorants: Extraction Process Optimization and Evaluation of Bioactive Properties. *Molecules*. 2020; 25(14): 3203. doi:10.3390/molecules25143203
87. Feng M, Darabi M, Tubeuf E, et al. Free cholesterol transfer to high-density lipoprotein (HDL) upon triglyceride lipolysis underlies the U-shape relationship between HDL-cholesterol and cardiovascular disease. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2020; 27(15), 1606–1616. doi:10.1177/2047487319894114
88. Lettiero B, Inasu M, Kimbung S, Borgquist S. Insensitivity to atorvastatin is associated with increased accumulation of intracellular lipid droplets and fatty acid metabolism in breast cancer cells. *Scientific Reports*. 2018; 8(1). doi:10.1038/s41598-018-23726-3
89. Sari DK, Marianne M, Lestari S, Laksmi LI. Difference in Level of Malondialdehyde, Total Cholesterol, and Triglyceride After Administration of Passion Fruit Seed's Ethanol Extract in Wistar Rats. *Preprints*. 2019; 07: 01-79. doi: 10.20944/preprints201907.0179.v1
90. Ji X, Shi S, Liu B, et al. Bioactive compounds from herbal medicines to manage dyslipidemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 118, 109338. doi:10.1016/j.biopha.2019.109338.
91. Maslyanko M, Harris RD, Mu D. Connecting Cholesterol Efflux Factors to Lung Cancer Biology and Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(13): 7209. doi:10.3390/ijms22137209
92. Wang A, Ladurner S, Latkolik S, et al. Leoligin, the major Lignan from Edelweiss (*leontopodium nivale* subsp. *alpinum*), promotes cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *J. Nat. Prod*. 2016; 79(6): 1651-1657.
93. Jiang T, Ren K, Chen Q, et al. Leonurine Prevents Atherosclerosis Via Promoting the Expression of ABCA1 and ABCG1 in a Ppar γ /Lxra Signaling Pathway-Dependent Manner. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017; 43(4), 1703–1717. doi:10.1159/000484031

94. Lin XL, Hu HJ, Liu YB. Allicin induces the upregulation of ABCA1 expression via PPARgamma/LXRalpha signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Int. J. Mol. Med.* 2017; 39(6): 1452-1460.
95. Li CH, Gong D, Chen LY. Puerarin promotes ABCA1-mediated cholesterol efflux and decreases cellular lipid accumulation in THP-1 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 811: 74-86.
96. Wang S, Zhang X, Liu M. Chrysin inhibits foam cell formation through promoting cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. *Pharm. Biol.* 2015; 53(10): 1481-1487.
97. Francisco V, Figueirinha A, Costa G. The flavone luteolin inhibits liver X receptor activation. *J. Nat. Prod.* 2016; 79(5): 1423-142.
98. Ye G, Chen G, Gao H, et al. Resveratrol inhibits lipid accumulation in the intestine of atherosclerotic mice and macrophages. *J. Cell. Mol. Med.* 2019; 23(6): 4313–4325. doi:10.1111/jcmm.14323
99. Lai SC, Phelps CA, Short AM, Dutta SM, Mu D. Thyroid transcription factor 1 enhances cellular statin sensitivity via perturbing cholesterol metabolism. *Oncogene.* 2018; 37(24), 3290–3300. doi:10.1038/s41388-018-0174-7
100. Ingale G, Hivrale U. Pharmacological studies of *Passiflora sp.* and their bioactive compounds. *Plant Sci.* 2010; 4(10):417–26.
101. Tallei TE, Tumilaar SG, Niode NJ, et al. Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (M^{Pro}) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study. *Scientifica.* 2020; 6307457: 18. doi:10.1155/2020/6307457
102. Lipinski CA. 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies.* 1(4):li 337–341. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
103. Yuan L, Han X, Li W, Ren D, Yang X. 2016. Isoorientin Prevents Hyperlipidemia and Liver Injury by Regulating Lipid Metabolism, Antioxidant Capability, and Inflammatory Cytokine Release in High-Fructose-Fed Mice. *J. Agric. Food Chem.* 64(13): 2682–2689. doi:10.1021/acs.jafc.6b00290.
104. Gundogdu G, Dodurga Y, Elmas L, Yilmaz-Tasci S, Karaoglan ES. Investigation of the anticancer mechanism of isoorientin isolated from *Eremurus spectabilis* leaves via cell cycle pathways in HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells. *Eurasian J Med.* 2018; 50(3): 168-172.
105. Ye T, Su J, Huang C, et al. Isoorientin induces apoptosis, decreases invasiveness, and downregulates VEGF secretion by activating AMPK signaling in pancreatic cancer cells. *OncoTargets and Therapy.* 2016;9: 7481–7492.
106. Wong TY, Lin SM, Leung LK. The flavone luteolin suppresses SREBP-2 expression and post-translational activation in hepatic cells. *PLoS ONE.* 2015; 10(8): 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0135637
107. Sezika E, Aslana M, Yesilada E, Itob S. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay- directed fractionation techniques. *Life Sciences.* 2005; 76: 1223–123.
108. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; 48(3): 937–943. doi:10.1016/j.fct.2010.01.003
109. Huang K, Liang X, Zhong Y, He W, Wang Z. 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPARα and LXRα transcription. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2014; 95(9): 1903–1910. doi:10.1002/jsfa.6896

110. Wan CW, Wong CNY, Pin WK, et al. Chlorogenic Acid Exhibits Cholesterol Lowering and Fatty Liver Attenuating Properties by Up-regulating the Gene Expression of PPAR- α in Hypercholesterolemic Rats Induced with a High-Cholesterol Diet. *Phytotherapy Research*. 2012; 27(4): 545–551. doi:10.1002/ptr.4751
111. Santana J, Cisneros L, Jacobo D. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2017; 22(3), 358. doi:10.3390/molecules22030358
112. Kim JS, Jeong E, Jo SM, Park J, Kim JY. Comparative Study of the Effects of Light Controlled Germination Conditions on Saponarin Content in Barley Sprouts and Lipid Accumulation Suppression in HepG2 Hepatocyte and 3T3-L1 Adipocyte Cells Using Barley Sprout Extracts. *Molecules*. 2020; 25(22), 5349. doi:10.3390/molecules25225349
113. Patel S, Soni H, Mishra K, Singhai AK. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.* 2011; 1(1): 1-16.
114. Puricelli L, Dell'Aica I, Sartor L, Garbisa S, Caniato R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia*. 2003; 74: 302–304. doi: 10.1016/S0367-326X(03)00023-6.
115. Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S. New Cycloartane Triterpenoids from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products*. 2000; 63(10): 1377–1380. doi:10.1021/np00018A2
116. Ariya SS, Joseph B, Christy J. Exploring the antineoplastic effect of phytochemicals from *Ipomea sepiaria* against matrix metalloproteinases: a pharmacoinformatics approach. *Int. J. Computational Biology and Drug Design*. 2020; 13(3): 255. doi:10.1504/ijcbdd.2020.107889
117. Gong B, Kao Y, Zhang C, Zhao H, Sun F, Gong Z. Exploring the Pharmacological Mechanism of the Herb Pair “*HuangLian-GanJiang*” against Colorectal Cancer Based on Network Pharmacology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019: 1–12. doi:10.1155/2019/2735050
118. Lins L, Brasseur R. The hydrophobic effect in protein folding. *The FASEB Journal*. 1995; 9(7): 535–540.
119. Zubair MS, Maulana S, Mukaddas A. Penambatan molekuler dan simulasi dinamika molekuler senyawa dari genus *nigella* terhadap penghambatan aktivitas enzim protease HIV-1. *Galenika Journal of Pharmacy*. 2020; 6(1):132–140.
120. Widiastuti NLGK. Pendidikan sains terintegrasi keterkaitan konsep ikatan kimia dengan berbagai bidang ilmu. *Widya Accarya*. 2019; 10(2): 1–16.
121. Qiu Y, Chen Y, Zhang G, et al. 2017. Developing solid oral dosage forms: Pharmaceutical theory & practice. Oral Formulations for Preclinical Studies. Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition).
122. *Bhal* SK. 2007. Logp—making sense of the value. Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada. 1–4.
123. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 2002; 1(9): 727–730. doi:10.1038/nrd892
124. Peters JU, Schnider P, Mattei P, Kansy M. Pharmacological Promiscuity: Dependence on Compound Properties and Target Specificity in a Set of Recent Roche Compounds. *ChemMedChem*. 2009; 4(4): 680–686. doi:10.1002/cmdc.200800411

125. Chackalamannil S, Rotella D, Ward SE, et al. 2017. Comprehensive medicinal chemistry III. Amsterdam. Elsevier

9. ANEXOS

Tabla A1. Efecto del EE de hojas de *Passiflora edulis* sobre SW480 y HFF a 24 y 48 horas.

Línea celular tumoral SW480		
Concentración del EE ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (%) A las 24 horas	Viabilidad celular (%) A las 48 horas
50	103,4 \pm 8,36	101,8 \pm 6,1
100	94,0 \pm 3,48	101,6 \pm 1,9
200	94,3 \pm 4,34	98,1 \pm 2,7
500	87,4 \pm 3,54	96,4 \pm 5,5
1000	85,5 \pm 5,90	69,2 \pm 8,5
1500	81,9 \pm 5,50	66,3 \pm 2,3
2000	72,6 \pm 14,21	57,6 \pm 1,8
3000	70,4 \pm 4,59	52,2 \pm 4,7
Línea celular no tumoral HFF		
50	105,0 \pm 1,40	103,0 \pm 0,1
100	112,9 \pm 0,47	115,4 \pm 0,8
200	107,9 \pm 2,81	87,1 \pm 5,2
500	78,5 \pm 4,21	71,7 \pm 2,6
1000	81,1 \pm 2,34	56,2 \pm 0,2
1500	80,5 \pm 1,40	53,4 \pm 0,6
2000	80,8 \pm 0,00	51,7 \pm 0,6
3000	71,9 \pm 1,40	49,6 \pm 2,6

(\pm) error estándar de la media a partir de 3 ensayos biológicos y cada uno por triplicado.

Tabla A2. Porcentaje de hemólisis de los tratamientos del extracto etanólico sobre los eritrocitos.

Tratamientos y controles ($\mu\text{g/mL}$)	% de hemólisis sobre eritrocitos humanos
50	8,68 \pm 1,2
100	15,0 \pm 1,8
200	17,6 \pm 2,6
500	12,7 \pm 2,3
Peróxido de hidrógeno 500	100 \pm 1,6
Vitamina C 500	26,4 \pm 1,2

(\pm) error estándar de la media a partir de 3 ensayos biológicos y cada uno por triplicado.

Tabla A3. Contenido de colesterol y triglicéridos intracelulares después de la exposición a los diferentes tratamientos del extracto etanólico de *P. edulis* durante 24 y 48 horas.

Colesterol intracelular a 24 horas			
Tratamiento	µg colesterol/µg de proteína	% Colesterol	% disminución de colesterol
<i>Control</i>	89,5	100	-
<i>50 µg/mL</i>	82,9	91,7	8,3
<i>100 µg/mL</i>	75,7	83,7	16,3
<i>200 µg/mL</i>	65,6	72,5	27,5
Intracelular a 48 horas			
<i>Control</i>	39,2	100	-
<i>50 µg/mL</i>	35,1	89,8	10,2
<i>100 µg/mL</i>	30,9	78,8	21,2
<i>200 µg/mL</i>	29,8	76,2	23,8
Triglicéridos intracelulares a 24 horas			
Tratamiento	µg triglicéridos/µg de proteína	% Triglicéridos	% disminución de triglicéridos
<i>Control</i>	8,9	100	-
<i>50 µg/mL</i>	7,4	82,1	17,9
<i>100 µg/mL</i>	6,3	70,1	29,9
<i>200 µg/mL</i>	5,8	65,0	35,0
Intracelulares a 48 horas			
<i>Control</i>	11,1	100	-
<i>50 µg/mL</i>	10,7	95,6	4,4
<i>100 µg/mL</i>	9,0	80,6	19,4
<i>200 µg/mL</i>	8,0	72,0	28,0

Tabla A4. Contenido de colesterol y triglicéridos extracelulares después de la exposición a los diferentes tratamientos del extracto etanólico de *P. edulis* durante 24 y 48 horas.

Colesterol extracelular a 24 horas			
Tratamiento	µg/mL colesterol	% Colesterol	% flujo salida de colesterol
<i>Control</i>	77,6	100	-
<i>50 µg/mL</i>	27,5	35,5	- 64,5
<i>100 µg/mL</i>	21,3	27,5	- 72,5
<i>200 µg/mL</i>	29,2	37,6	- 62,4
Extracelular a 48 horas			
<i>Control</i>	11,7	100	-
<i>50 µg/mL</i>	12,6	107,4	+7,4
<i>100 µg/mL</i>	13,0	111,0	+11,0
<i>200 µg/mL</i>	13,2	112,7	+12,7
Triglicéridos extracelulares a 24 horas			
Tratamiento	µg/mL triglicéridos	% triglicéridos	% flujo salida de triglicéridos
<i>Control</i>	5,9	100	-
<i>50 µg/mL</i>	4,2	70,6	- 29,4
<i>100 µg/mL</i>	3,9	66,2	- 33,8
<i>200 µg/mL</i>	4,0	68,2	- 31,8
Extracelular a 48 horas			
<i>Control</i>	33,6	100	-
<i>50 µg/mL</i>	35,1	104,6	+ 4,6
<i>100 µg/mL</i>	35,6	106,0	+ 6,0
<i>200 µg/mL</i>	36,2	107,9	+ 7,9

Nota: signo (-) representa una regulación negativa del flujo de salida del colesterol o triglicéridos; signo (+) representa una regulación positiva del flujo de salida del colesterol o triglicéridos.