

“Aislamiento biodirigido y caracterización química de los metabolitos secundarios de la partición de acetonitrilo de tallos de *Passiflora subpeltata* responsables de la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas de mama humano”

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de: **Maestra en  
Ciencias Naturales e Ingeniería**

presenta:

L.B.M Andrea Rodríguez Zamora

Director: Dr. Ernesto Rivera Becerril

Directora: Dra. Erika Iris Puente Guzmán

Asesora: Dra. Ana Leticia Arregui Mena

México, CDMX, 2023

## AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías, CONAHCYT, por el otorgamiento de la beca con número CVU: 1144656 para la realización de los estudios de maestría en el Posgrado de Ciencias Naturales e Ingeniería.
- A mi comité tutorial, el Dr. Ernesto Rivera Becerril, la Dra. Erika Iris Puente Guzmán y la Dra. Ana Leticia Arregui Mena, por apoyarme y guiarme durante todos mis estudios de Maestría.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana por su apoyo y por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.
- Al Dr. José Martín Landeros Gálvez por su apoyo, enseñanza y asesoría en la realización de este trabajo.
- Al Dr. David Erasmo García Díaz por donar el cloruro de tetraetilamonio y por su asesoría en la realización de este trabajo.
- A la Dra. Martha Martínez Gordillo por su apoyo en la identificación del material vegetal.
- A mi familia por su apoyo y comprensión.
- Al jurado evaluador por su retroalimentación que permitió el enriquecimiento del presente trabajo.

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, mi hermano y mi abuelita, por ser mi soporte en la vida y darme la inspiración para levantarme todos los días y continuar.*

*“La ciencia es solo un nombre para el esfuerzo constante que la respalda”*

*-Dr. Stone, Riichiro Inagaki.*

## ÍNDICE

I.	Resumen	06
II.	Abreviaturas	09
1.	Introducción	12
1.1.	Marco teórico	12
1.1.1.	Cáncer	12
1.1.2.	Cáncer de mama y principales tratamientos	12
1.1.3.	Potencial de membrana como regulador del ciclo celular	16
1.1.4.	Canales de potasio dependientes de voltaje	19
1.1.5.	Kv10.1 y su rol en cáncer	21
1.1.6.	Género <i>Passiflora</i>	26
1.1.7.	Metabolitos con actividad anticancerígena presentes en <i>Passiflora</i>	27
1.1.8.	<i>Passiflora subpeltata</i>	30
1.2.	Antecedentes inmediatos	31
2.	Justificación	34
3.	Hipótesis	34
4.	Objetivos	35
4.1.	Objetivo general	35
4.2.	Objetivos particulares	35
5.	Metodología	36
5.1.	Recolección del material vegetal	36
5.2.	Optimización de la extracción	37
5.3.	Cromatografía en columna de la fracción de CH <sub>3</sub> CN	38
5.4.	Caracterización fitoquímica cualitativa	39
5.5.	Actividad antioxidante	39
5.6.	Contenido fenólico total	40
5.7.	Cultivo celular	40
5.8.	Ensayos de MTT	41
5.9.	Cromatografía en columna de las fracciones con mayor actividad de la fracción de CH <sub>3</sub> CN de <i>P. subpeltata</i>	42

5.10. Optimización de la purificación	43
5.11. Caracterización de las fracciones activas	44
6. Resultados y discusión	45
6.1. Optimización de la extracción	45
6.2. Actividad antioxidante de la fracción de CH <sub>3</sub> CN de <i>P. subpeltata</i>	47
6.3. Contenido fenólico total de la fracción de CH <sub>3</sub> CN de <i>P. subpeltata</i>	48
6.4. Ensayo biodirigido: purificación y viabilidad celular	49
6.5. Comparación de las IC <sub>50</sub> de las fracciones activas	58
6.6. Viabilidad celular en presencia de TEA-Cl	60
6.7. Análisis fitoquímico cualitativo de las fracciones activas de la fracción de CH <sub>3</sub> CN de tallos de <i>P. subpeltata</i>	62
6.8. Espectroscopía de FT-IR	64
6.9. Resonancia magnética nuclear de H <sup>1</sup>	65
7. Conclusiones	68
8. Perspectivas	69
9. Referencias	71

## I. RESUMEN

**Introducción:** El cáncer es un término utilizado para un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. La característica que lo define es la división rápida de células anormales que pueden sobrepasar sus límites e invadir a otros tejidos e incluso a otros órganos en un proceso denominado metástasis. Esta división celular se debe a la desregulación del ciclo celular, que puede ser afectado por diferentes factores, entre ellos la modulación del potencial de membrana ( $V_m$ ), el cual se ve afectado por la conductancia del ion potasio ( $K^+$ ) que es el principal regulador del  $V_m$  en reposo, ya sea en células excitables o no excitables, por lo tanto, los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje ( $K_v$ ) juegan un papel importante en la fluctuación del  $V_m$  a lo largo del ciclo celular. Algunos  $K_v$  se encuentran implicados en diversos procesos oncogénicos, como  $K_v10.1$  que se sobreexpresa en tumores más agresivos. Se ha descrito que este canal es regulado por algunos metabolitos secundarios de plantas tales como los flavonoides y en ese sentido, *Passiflora* es un género de plantas en el que se han descrito este tipo de compuestos, por lo que podrían tener algún efecto farmacológico sobre estos canales.

**Objetivo:** En el presente trabajo se buscó purificar mediante un ensayo biodirigido los metabolitos secundarios de una fracción de acetonitrilo ( $CH_3CN$ ) obtenida a partir del extracto metanólico de tallos de *P. subpeltata*, para caracterizarlos químicamente mediante técnicas espectroscópicas, así como farmacológicamente en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

**Materiales y métodos:** El material vegetal se recolectó de la zona de Ciudad Universitaria en la alcaldía Coyoacán de la Ciudad de México. El extracto metanólico crudo de los tallos de *P. subpeltata* se obtuvo a partir de una extracción sólido-líquido de flujo continuo. A partir de este extracto, se realizó una extracción líquido-líquido de flujo continuo con hexano/metanol donde se recuperó la fracción de hexano. Con esta fracción se realizó una segunda extracción con hexano/ $CH_3CN$ , para obtener la fracción de  $CH_3CN$ . A esta fracción se le realizaron mediciones de actividad antioxidante mediante el ensayo del DPPH y

contenido fenólico mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. A esta fracción también se le realizó un ensayo biodirigido a partir utilizando cromatografías en columna y en placa preparativa para purificar los compuestos con actividad de disminución de viabilidad de las células MDA-MB-231 y MCF-7. Se determinaron las concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) de las fracciones con mayor actividad mediante el ensayo MTT. Se realizó un ensayo de MTT utilizando el bloqueador de canales Kv, cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl) para determinar un posible efecto sinérgico con las fracciones obtenidas de *P. subpeltata*. La caracterización química de la fracción terciaria con mayor actividad se realizó utilizando diferentes reveladores. La caracterización espectroscópica se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (<sup>1</sup>H).

**Resultados:** Se optimizó la metodología de extracción de la fracción de CH<sub>3</sub>CN. Esta fracción presentó una actividad antioxidante de 5.15 microgramos (μg) de equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/100 g de masa seca y una concentración de fenoles totales de 15.16 μg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de masa seca. En el ensayo biodirigido se obtuvo la fracción terciaria V.A.2, que presentó mayor actividad con un porcentaje de inhibición de viabilidad en células MDA-MB-231 del 64.00% y de 77.88% en células MCF-7. La IC<sub>50</sub> de la subfracción V.A.2 en MDA-MB-231 fue de 100.43±7.5 μg/mL y en MCF-7 fue de 66.1±4.5 μg/mL. El tratamiento en conjunto del TEA-Cl y las fracciones activas (17, V.A y V.A.2) en ambas líneas celulares, disminuyó la viabilidad celular en comparación con el control y con el tratamiento solamente de las fracciones. La caracterización química mostró que la fracción terciaria V.A.2 contiene ácidos grasos insaturados, compuestos con carbonilos, fenoles, grupos sensibles a oxidación, aldehídos y alcoholes. En la espectroscopía FT-IR se observaron señales correspondientes a los grupos funcionales de alcoholes, carbonos con hibridación sp<sup>3</sup> y grupos carbonilo. En la RMN <sup>1</sup>H se observaron señales de aldehídos, carbonos aromáticos sp<sup>2</sup> y carbonos saturados sp<sup>3</sup>. Finalmente, se observó que la fracción es una mezcla de compuestos.

**Conclusiones:** La fracción de CH<sub>3</sub>CN presentó poca actividad antioxidante y bajo contenido fenólico. Se purificó la fracción terciaria V.A.2 y se observó que es una mezcla de compuestos. En el ensayo MTT utilizando TEA-Cl, se observó un posible efecto sinérgico con las fracciones activas (17, V.A y V.A.2). Con la caracterización química y espectroscópica se determinó que la fracción terciaria V.A.2 probablemente contenga ácidos grasos insaturados, aldehídos, compuestos aromáticos y alcoholes. Este es uno de los primeros trabajos en relacionar metabolitos del género *Passiflora* y su efecto anticancerígeno, mediante un posible mecanismo dirigido hacia canales iónicos de potasio.



## II. ABREVIATURAS

AAE: equivalentes de ácido ascórbico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AF: ácido fosfomolíbdico

ATR: reflectancia total atenuada

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

C-terminal: extremo carboxilo terminal

Ca<sup>2+</sup>: ion calcio

CDCl<sub>3</sub>: cloroformo deuterado

CDK: cinasa dependiente de ciclina

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: cloruro de metileno

CH<sub>3</sub>CN: acetonitrilo

Cl<sup>-</sup>: ion cloruro

cm: centímetros

CNBHD: dominio de homología de unión a nucleótidos cíclicos

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

D2R: receptor de dopamina D2

DMEM/F12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

D: dragendorff

EAG: Canales éter *a-go-go*

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

ELK: canales similares a éter *a-go-go*

ERG: canales relacionados con éter *a-go-go*

FBS: suero fetal bovino

FC: Folin-Ciocalteu

FeCl<sub>3</sub>: cloruro férrico

FT-IR: espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50

H<sub>1</sub>: receptor 1 de histamina

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HIF-1: factor inducible por hipoxia 1

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

K<sup>+</sup>: ion potasio

KBr: bromuro de potasio

KCa: canales de potasio activados por calcio

KCNH: subfamilia H de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje

Kir: canales de potasio rectificadores internos

Kv: canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje

L: litros

mg: miligramos

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

$\mu$ L: microlitros

MMP-2: metaloproteinasa de la matriz extracelular 2

MMP-9: metaloproteinasa de la matriz extracelular 9

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio

mV: milivoltios

N-terminal: extremo amino terminal

Na<sup>+</sup>: ion sodio

NH: ninhidrina

nm: nanómetros

PAS: dominio Per-Arnt-Sim

ppm: partes por millón

Rf: coeficiente de reparto

RMN: resonancia magnética nuclear

TEA-Cl: cloruro de tetraetilamonio

UV: ultravioleta

UV-Vis: ultravioleta-visible

V: vainillina

VB: verde de bromocresol

VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular

V<sub>m</sub>: potencial de membrana

Y: yodo

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Marco Teórico**

#### **1.1.1. Cáncer**

El cáncer es un término utilizado para un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. La característica que lo define es la división rápida de células anormales que pueden sobrepasar sus límites e invadir a otros tejidos e incluso a otros órganos en un proceso denominado metástasis (1). La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas donde las células adquieren mutaciones que activan oncogenes y/o desactivan genes supresores de tumores, provocando una activación continua y descontrolada del ciclo celular (1, 2). Los principales mecanismos de los cambios genéticos que ocurren en las células son mutaciones, cambios en los cromosomas, alteraciones en vías de señalización y cambios epigenéticos (2) que se generan por predisposición genética y causas ambientales. De esta forma, la carcinogénesis puede ocurrir en casi cualquier órgano, dando lugar a la elevada cantidad de tipos de cáncer que son diagnosticados actualmente.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, con aproximadamente 19.3 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes en el mundo en el 2020, donde 1 de cada 6 muertes fue debido a cáncer (1, 3). Otro problema actual de esta enfermedad es que es difícil de curar, pues es complicado retirar cada una de las células malignas y las terapias también son tóxicas para las células normales (1). El cáncer es una enfermedad de gran impacto en el mundo lo que aumenta la investigación para la búsqueda de nuevos tratamientos.

#### **1.1.2. Cáncer de mama y principales tratamientos**

Existen muchos tipos de cáncer dependiendo el tejido donde se origine, pero uno que actualmente tiene mucha importancia, es el cáncer de mama. A nivel mundial en el 2020, fue el tipo de cáncer con mayor incidencia (24.5%) y mortalidad (15.5%) en mujeres, convirtiéndose en la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (4). Con un estimado

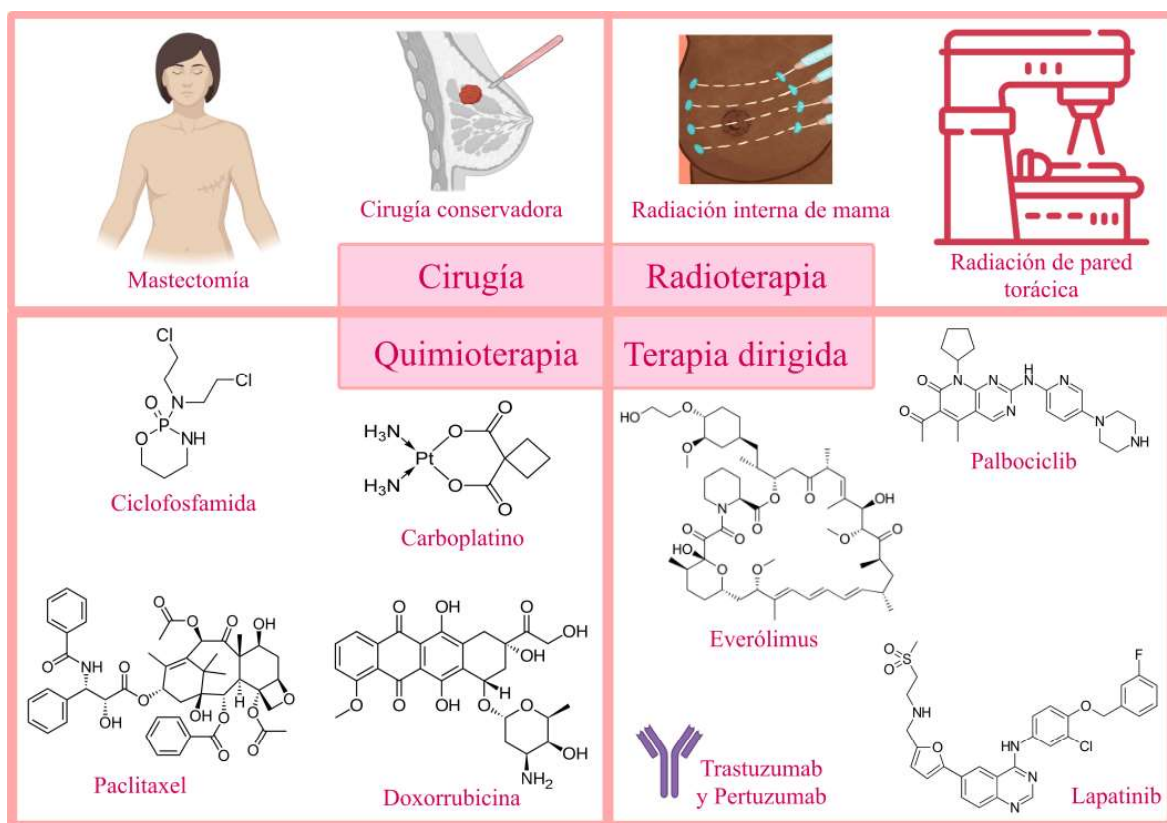
de 2.3 millones de casos nuevos en el 2020 (11.7%), el cáncer de mama superó al cáncer de pulmón (11.4%) como el más diagnosticado en mujeres en el mundo (4). En este mismo año en México, el cáncer de mama ocupó el primer lugar en incidencia (15.3%), mortalidad (8.8%) y prevalencia durante el 2020 (5). Estos datos muestran que este tipo de cáncer es un problema de salud pública, de ahí surge la necesidad de generar nuevas estrategias de tratamiento para las personas que se ven afectadas por esta enfermedad.

Los tratamientos utilizados para el cáncer de mama incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida (6, 7). La elección del tratamiento dependerá de la etapa en la que se encuentre el cáncer, el subtipo que afecte al paciente, el tamaño del tumor y la viabilidad de poder llevar a cabo cualquiera de los tratamientos (7, 8).

Existen dos tipos principales de procedimientos quirúrgicos: cirugía de conservación de mama y mastectomía (**Figura 1**). La cirugía de conservación es un enfoque de tratamiento localizado que permite la eliminación del tejido tumoral a la vez que se preserva el tejido mamario (8). Este tipo de cirugía suele estar acompañada por terapia adyuvante que permite reducir el tamaño del tumor antes del procedimiento o después de este para disminuir el riesgo de metástasis y asegurar la recuperación del paciente (6). La cirugía conservadora no puede llevarse a cabo si no se puede retirar la mayor parte del tumor con un resultado cosmético satisfactorio (9). Por su parte, la mastectomía es la extirpación de la mama y puede ser total, subcutánea o conservadora de la areola del pezón; ya sea un uno o ambos senos (10). El principal problema es la carga psicológica que enfrentan las pacientes, sobre todo cuando no se realiza una reconstrucción inmediata. La cirugía también puede provocar cambios en la morfología mamaria como encogimiento de las mamas, dilatación de los vasos sanguíneos, pigmentación e hinchazón de las mamas (11). Hay que resaltar que, si el cáncer ha invadido otras partes del cuerpo, no es posible realizar la extirpación mediante cirugía. Además, no es posible extirpar todas las células cancerígenas, por lo que es necesario realizar terapia adyuvante o neoadyuvante (como quimioterapia o radioterapia), las cuales traen consigo diversos efectos secundarios (7).

La quimioterapia es un tratamiento sistémico donde se emplean fármacos que inhiben la proliferación celular al interferir con la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o proteínas; lo que eventualmente lleva a las células a apoptosis (7, 12). Suele utilizarse en tumores negativos a receptor de estrógenos (ER-negativo), como los subtipos de peor pronóstico (triple negativo y HER2 positivo); así como en pacientes de alto riesgo (8, 10). Actualmente, el tratamiento incluye la aplicación de fármacos como carboplatino, ciclofosfamida, taxanos (como el paclitaxel) y antraciclinas (como la doxorubicina) (**Figura 1**); donde terapias basadas en taxanos y antraciclinas han demostrado reducir la mortalidad a un tercio (7, 8, 10). Debido a la naturaleza de estos fármacos, suelen presentar múltiples efectos adversos como pérdida de cabello, náusea, vómito, fatiga, susceptibilidad a infecciones, anemia, problemas gastrointestinales, mucositis, problemas en el ciclo menstrual, infertilidad y en algunos casos, cardiomiopatía y neuropatía (8, 12).

La radioterapia consiste en utilizar radiación ionizante para eliminar las células cancerosas mediante la generación de radicales libres que provocan el rompimiento de la doble hélice del ADN, provocando apoptosis (7, 13). La radiación puede ser externa o interna (braquiterapia) dependiendo de la localización del tumor (7). Suele utilizarse después de una cirugía para destruir las células cancerosas remanentes y así evitar la posibilidad de que ocurra metástasis. En el cáncer de mama, las técnicas que se emplean son la radioterapia interna de mama y la de pared torácica (después de la mastectomía) (**Figura 1**) (8). Al igual que la quimioterapia, el mecanismo de acción de la radioterapia también destruye células normales y provoca diversos efectos adversos como irritación y oscurecimiento de la piel, linfedema, fatiga, pruritos, hipersensibilidad, mucositis, plexopatía braquial, riesgo de un segundo cáncer radiogénico, complicaciones cardiovasculares y del sistema nervioso central y problemas de fertilidad (8, 11, 13–15).



**Figura 1.** Principales tratamientos para el cáncer de mama.

La terapia hormonal es aquella donde se modifica la cantidad de hormonas o se bloquean los receptores a estas (6, 7). Se utiliza en pacientes con cáncer de mama del subtipo luminal bloqueando los receptores de estrógenos, evitando que esta hormona estimule las células cancerosas (8). A pesar de ser un tratamiento más específico, también puede provocar diversos efectos adversos como sofocos, sequedad vaginal, artralgia, mialgia, algunos fármacos como el tamoxifeno pueden aumentar el riesgo de trombos y cáncer de útero, mientras que los inhibidores de la aromatasa pueden ocasionar problemas musculoesqueléticos como la osteoporosis (9). Además, aproximadamente el 50% de los tumores positivos a receptores de hormonas se vuelven resistentes al tratamiento (8).

Finalmente, la terapia dirigida es aquella que utiliza moléculas específicas para inhibir vías de señalización alteradas en las células tumorales (7). En el caso del cáncer de mama puede

ser adyuvante o neoadyuvante y se utiliza terapia dirigida al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab), a la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa/objetivo de rapamicina en mamíferos (everólimus) y a cinasas dependientes de ciclinas (palbociclib) (**Figura 1**). Dentro de los efectos adversos, la terapia dirigida puede provocar erupciones en la piel, estomatitis, xerostomía, alopecia, onicolisis, entre otros (16). Estas terapias tienen un costo elevado y los pacientes de bajos recursos no tienen acceso a ellos.

Los tratamientos que se emplean actualmente suelen tener diversos efectos adversos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Todo esto hace énfasis en la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que presenten una menor cantidad de efectos secundarios y mayor especificidad.

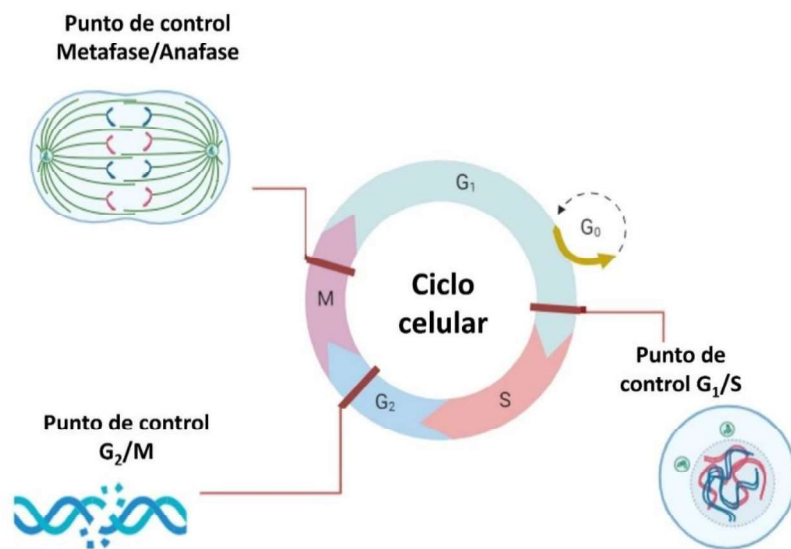
### **1.1.3. Potencial de membrana como regulador del ciclo celular**

En el 2011, Hanahan y Weingberg describieron las principales características que las células adquieren para formar tumores y que permiten entender la biología del cáncer. Los autores describen que las características fundamentales de las células cancerosas son: su habilidad de mantener una proliferación continua, evadir supresores del crecimiento, invasión, metástasis, supervivencia a muerte celular, angiogénesis, inmortalidad replicativa, evasión del sistema inmune, inflamación, alteraciones metabólicas, inestabilidad genómica y mutaciones (17). En particular, la proliferación continua es resultado de la progresión del ciclo celular. El ciclo celular es un proceso organizado y altamente regulado donde los componentes internos de una célula progenitora se duplican y se segregan en dos células hijas idénticas (18). Consiste en cuatro fases: gap 1 (G1), síntesis de ADN (S), gap 2 (G2) y mitosis (M); también existe la fase G0, en la cual se encuentran las células quiescentes (18). Unos de los componentes más importantes del sistema de control del ciclo celular son las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (CDK), que actúan en conjunto formando complejos



ciclina/CDK. Estos complejos adquieren actividad de cinasa para fosforilar distintos blancos, lo que les permite progresar en las fases del ciclo celular (7, 18).

Dado que la inestabilidad genómica puede potenciar la oncogénesis, es necesaria la actividad de mecanismos reguladores del ciclo celular. Existen sistemas de control (*checkpoints*) para los eventos clave del ciclo, regulando la entrada y salida de una fase a otra y asegurando que la replicación y segregación de los cromosomas sea adecuada (**Figura 2**) (18, 19). Tradicionalmente, se habla de tres puntos de control principales: G1/S o de inicio, donde las células se comprometen a dividirse; la transición de G2/M, que permite la entrada a la mitosis solo de las células que hayan replicado su genoma de manera adecuada; y la transición metafase/anafase o punto de control del huso mitótico, que permite la separación de las cromátides hermanas, completando la mitosis (18).



**Figura 2.** Puntos de control del ciclo celular.

Se ha observado que la despolarización del  $V_m$  podría servir como una señal de inicio de mitosis y síntesis de ADN; controlando la actividad del ciclo celular (29). El  $V_m$  se define como la diferencia de voltaje entre el citoplasma y el medio extracelular debido a la presencia de diversos canales iónicos y transportadores que mueven iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ ) a través

de la membrana plasmática (20). En células excitables (como neuronas y fibras musculares) cambios en el  $V_m$  permiten llevar a cabo el potencial de acción; sin embargo, también juega un papel importante en células no excitables. En la década de los 60, Clarence D. Cone Jr realizó estudios en células de sarcoma, donde demostraron que el  $V_m$  se vuelve hiperpolarizado al entrar en la fase M del ciclo celular (20). Así, en 1971 desarrolló la teoría unificada sobre el mecanismo básico del control mitótico normal y la oncogénesis, donde plantea que cambios en el  $V_m$  durante la transición G1/S permiten el inicio o inhibición de la síntesis de ADN mediante la regulación de vías metabólicas (21). Observaciones posteriores mostraron que existe una correlación con el grado de diferenciación de las células: células altamente diferenciadas poseen un  $V_m$  hiperpolarizado, mientras que células en constante proliferación suelen tener un  $V_m$  despolarizado (21). Actualmente, se sabe que existen eventos bioeléctricos que controlan el  $V_m$  regulando funciones celulares como proliferación, migración y diferenciación (20).

Como punto de control del ciclo celular, la modulación del  $V_m$  permite la transición entre G1/S y G2/M. Estudios previos demostraron que la despolarización de la membrana inhibe la progresión de G1/S en células gliales (22), sugiriendo que la hiperpolarización es necesaria para iniciar la síntesis del ADN. Por otro lado, la despolarización de la membrana permite la transición entre G2/M, marcando el inicio de la mitosis (22, 23). El  $V_m$  fluctúa a lo largo del ciclo celular: la hiperpolarización permite la transición entre G1/S principalmente por el flujo de iones de potasio, mientras que la despolarización es necesaria para la transición de G2/M, debido a un flujo de iones cloro (20, 22).

La actividad de canales y transportadores que permiten una distribución diferencial de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ),  $\text{K}^+$ , calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) entre el citoplasma y el medio extracelular, genera el  $V_m$  (20). Debido a la acción de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , hay una menor concentración de  $\text{Na}^+$  en el interior de la célula. Se necesitan otros cationes para equilibrar la carga dentro de la célula; este equilibrio se logra por los iones  $\text{K}^+$  (18). El  $\text{K}^+$  entra a la célula mediante la acción de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y también puede entrar o salir a través de canales de  $\text{K}^+$  (18). Los

canales de  $K^+$  mantienen un equilibrio en donde los aniones del citoplasma atraen iones  $K^+$  al interior celular y el  $K^+$  sale de la célula debido a su gradiente de concentración (18). Esta entrada y salida de  $K^+$  mantiene el potencial de membrana en reposo hiperpolarizado. En células excitables, los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje permiten la entrada de iones  $Na^+$ , despolarizando el potencial de membrana e iniciando un potencial de acción (18). En general, el potencial de membrana en reposo se encuentra entre -40 y -70 milivoltios (mV), con una carga neta negativa en el lado intracelular de la membrana (24).

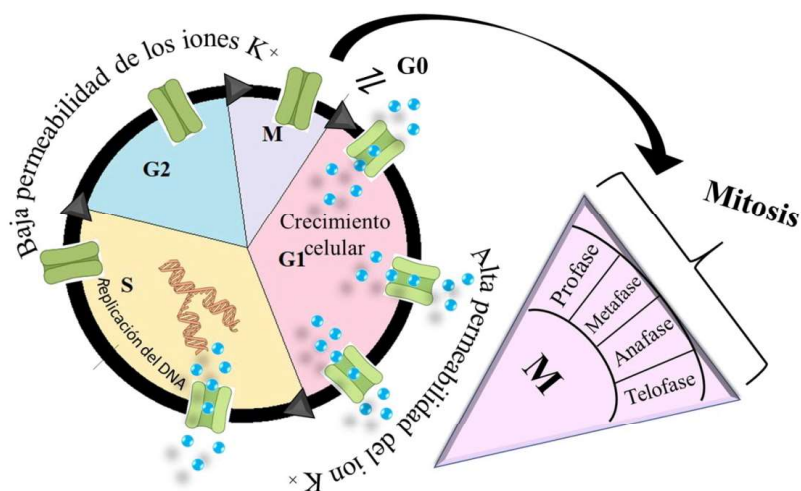
El  $V_m$  también está relacionado con la proliferación celular en el cáncer. Las células tumorales mantienen su  $V_m$  despolarizado (de -5 a -50 mV) en comparación con células normales que se encuentra en estado de reposo (de -40 a -90 mV) (20, 25-27). Esta despolarización se debe principalmente a la sobreexpresión de canales iónicos como  $Kv10.1$ ,  $Kv11.1$ ,  $TREK-1$ ,  $K_{ir} 4.1$  (22, 25). La despolarización del  $V_m$  induce un fenotipo metastásico en melanocitos normales, concluyendo que el  $V_m$  es un factor que puede regular el equilibrio entre la carcinogénesis y el crecimiento normal (28). Un  $V_m$  despolarizado puede considerarse como un marcador en células tumorales que mantiene a las células progresando rápidamente en el ciclo celular.

#### **1.1.4. Canales de potasio dependientes de voltaje**

Los canales de  $K^+$  son la familia más extensa de canales iónicos representados por más de 70 genes en el genoma de los mamíferos (29). Se encuentran en células excitables y no excitables donde son responsables de la difusión pasiva de los iones  $K^+$  a través de la membrana plasmática (29). Su actividad es importante para llevar a cabo diferentes procesos biológicos como la liberación de insulina, la contracción muscular y la transmisión sináptica; sin embargo, también han demostrado estar implicados en proliferación celular, apoptosis, invasión y angiogénesis (29, 30). Estas últimas funciones hacen que cada vez haya más interés en estudiar canales de  $K^+$  relacionados con cáncer para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

La conductancia del ion  $K^+$  es el principal regulador del potencial de membrana en reposo, ya sea en células excitables o no excitables (31), por lo tanto, son los canales  $K_v$  los que juegan un papel importante en la fluctuación del  $V_m$  a lo largo del ciclo celular. Además, los iones  $K^+$  también son importantes para mantener la entrada de iones  $Ca^{2+}$  y regular el volumen celular (29). Estos canales son moléculas cruciales para que las células puedan llevar a cabo sus funciones de manera correcta.

De acuerdo con Huang y Jan (32), existen 4 mecanismos principales mediante los cuales los canales de  $K^+$  promueven proliferación celular. El primero es mediante cambios en el  $V_m$ ; existe una alta permeabilidad a iones  $K^+$  entre las fases  $G1/S$  y una baja permeabilidad entre  $G2/M$  (Figura 3) (31). El segundo es mediante la regulación del volumen celular, donde la expresión de algunos canales en la membrana plasmática se enriquece en ciertas fases del ciclo, modificando la morfología celular (32, 33). El tercero es promoviendo la entrada de  $Ca^{2+}$ , y el cuarto es mediante funciones no canónicas que promuevan transcripción de genes relacionados con proliferación (32). Los canales de  $K^+$  juegan un papel clave en la proliferación celular, por lo que su regulación podría utilizarse como estrategia terapéutica.



**Figura 3.** Representación esquemática de la actividad de canales de potasio durante el ciclo celular. Valores hiperpolarizantes cercanos al potencial de equilibrio del  $K^+$  se observan entre las fases  $G1$  y  $S$ , mientras que entre  $G2/M$  el  $V_m$  se encuentra despolarizado.

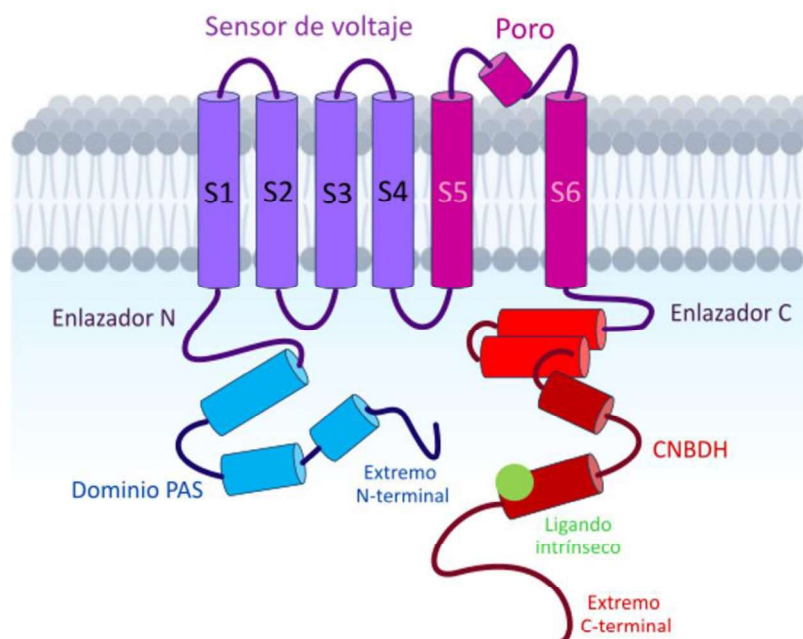
Los canales de potasio se dividen en 4 grupos: canales Kv, canales de K<sup>+</sup> activados por calcio (KCa), canales de K<sup>+</sup> rectificadores internos (K<sub>ir</sub>) y los canales de K<sup>+</sup> de dos poros. Estos canales juegan un rol importante en procesos celulares como proliferación, control del volumen celular, migración, apoptosis y excitabilidad (34). Se ha observado que, durante el primer ciclo celular de ovocitos de ratón, los Kv se encuentran activos en la transición de las fases M/G1 e inactivos durante S/G2 (31). Brüggemann y colaboradores observaron en ovocitos de *Xenopus* que la actividad de canales *éter a-go-go* (EAG) se inhibe al inicio de la mitosis. Ellos denominaron a este canal como una “entidad molecular sensible al ciclo celular” debido a que su inhibición es una señal electrofisiológica que le indica a la célula el inicio de la mitosis (23). Dado que son un grupo muy extenso e importantes en el ciclo celular, el presente trabajo se enfocará en los canales dependientes de voltaje.

Con 40 genes codificantes, los Kv son el subgrupo más grande de canales de K<sup>+</sup> (32). Los Kv son un grupo compuesto por 12 familias (Kv1-Kv12). A pesar de solo ser 12 familias, estos canales forman un grupo diverso debido a heteromultimerización, *splicing* alternativo, modificaciones postraduccionales, proteínas accesorias y subunidades modificadoras (35). Dada su importancia en el control del V<sub>m</sub>, algunos Kv se encuentran implicados en diversos procesos oncogénicos. Aquellos que han sido principalmente vinculados con cáncer son Kv1.1, Kv1.3, Kv1.5, Kv10.1 y Kv11.1 (20, 36). La desregulación de los Kv está asociada con aspectos clave del cáncer, lo que ha hecho que se consideren como oncogenes potenciales y, por lo tanto, como blancos terapéuticos potenciales. Los diferentes tipos de cáncer expresan diferentes combinaciones de Kv, de manera que estos pueden utilizarse en la búsqueda de terapias personalizadas y específicas, esperando menores efectos secundarios en los pacientes.

#### **1.1.5. Kv10.1 y su rol en cáncer**

La familia KCNH de los Kv está formada por los canales ERG (*éter a-go-go related*, KCNH2), los canales EAG (KCNH1) y los canales ELK (*éter a-go-go like*, KCNH3) (37, 38). Estos canales están formados por cuatro subunidades que a su vez están compuestas por

seis dominios transmembranales: S1-S4 forman el sensor de voltaje, mientras que el poro está formado por los dominios S5-asa-S6 (**Figura 4**) (37). En su región amino terminal (N-terminal) contienen un dominio Per-Arnt-Sim (PAS), un PAS-CAP y un dominio enlazador; al conjunto de estos dominios se les conoce como el “dominio EAG”, compartido entre todos los miembros de KCNH (37). En su región carboxilo terminal (C-terminal) contienen un dominio enlazador y un dominio de homología de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDH.) Cerca del CNBHD, hay un motivo de tres aminoácidos conocido como el ligando intrínseco (37).



**Figura 4.** Esquema representativo de la estructura de las subunidades de los canales de la familia KCNH (37).

Kv10.1 (también llamado EAG1) es un Kv perteneciente a la familia EAG. Este canal se caracteriza por tener una corriente rectificadora de  $K^+$  retardada y una activación lenta con un potencial de retención hiperpolarizado; esto significa que hay un cambio en la sensibilidad del voltaje en la apertura del canal (37). En cuanto a su localización, se encuentra distribuido en el sistema nervioso central, donde la distribución del ARN mensajero (ARNm) se encuentra en: la corteza cerebral (particularmente en el núcleo del tracto olfatorio lateral y el neocórtex), el bulbo olfatorio, el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, los ganglios basales

y en la capa de células granulares del cerebelo (39). También se expresa en mioblastos durante un periodo de tiempo muy corto durante su fusión (40) y una vez que las células musculares se vuelven multinucleadas, la expresión del canal se inhibe (41). A pesar de que es una proteína conservada en diferentes especies de mamíferos (incluido el humano), su rol fisiológico aún permanece prácticamente desconocido (42).

Su estructura es similar a la de los demás canales KCNH, pero contiene ciertas características que lo diferencian de los demás miembros de la familia. Kv10.1 está glicosilado en el asa que conecta los dominios S5 y S6, afectando la unión de toxinas peptídicas en el poro. El diámetro del poro es más pequeño que el del ion  $K^+$  hidratado, por lo que carece de la cavidad central ubicada debajo del filtro de selectividad de los canales de  $K^+$  canónicos. Esta cavidad es blanco de compuestos antiarrítmicos que bloquean el poro, sin embargo, al carecer de ella, Kv10.1 no se ve afectado por estos compuestos. Este canal es capaz de ser activado por voltaje aun sin el asa entre el sensor de voltaje y el poro; haciendo que la comunicación entre estos sea diferente a la de otros Kv (43). El CNBHD de estos canales es homólogo al de los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG) y los canales modulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN); sin embargo, el CNBHD de Kv10.1 no une nucleótidos cíclicos, sino que se encuentra asociado con el ligando intrínseco (residuos tirosina, asparagina, leucina) (37, 42). Dadas sus particularidades estructurales, aún se desconoce la existencia de ligandos específicos que regulen la actividad de estos canales.

Como ya se mencionó, la expresión de estos canales está restringida a mioblastos y a ciertas partes del sistema nervioso central. De la misma forma, el ARNm del canal se encuentra solamente en el cerebro y no en otros tejidos. Sin embargo, tanto la proteína como el ARNm del canal se encuentran expresados en células tumorales de diversos tejidos (44). En 1999, Pardo y colaboradores demostraron el potencial oncológico de Kv10.1 al observar que la sobreexpresión de estos canales induce una transformación maligna en células CHO y NIH/3T3. También observaron que tumores que expresan este canal presentan un crecimiento más rápido en comparación con tumores que no lo expresan (45).

A pesar de que aún se desconoce la función exacta del canal, hoy se sabe que está estrechamente relacionado con la proliferación celular. Uno de los mecanismos por los que se promueve la proliferación es el desensamble del cilio primario que permite la progresión del ciclo celular entre G2/M (46). La señalización para llevar a cabo este proceso se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula como resultado de la hiperpolarización inducida por Kv10.1. El  $\text{Ca}^{2+}$  a su vez, actúa como segundo mensajero en una cascada de señalización que implica la activación de cinasa Aurora A, la cual se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer y está implicada en proliferación, transición epitelio-mesénquima, metástasis y la renovación de células troncales cancerosas (47, 48). Esta sería una forma indirecta mediante la cual el canal podría estar promoviendo proliferación. Kv10.1 también permite la supervivencia celular. En células MCF-7, Kv10.1 promueve proliferación y migración al permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la interacción con el canal de calcio Orai1 (47, 49). También se ha reportado la capacidad oncogénica del canal mediante mecanismos no canónicos. Canales Kv10.1 con una mutación que elimina su actividad de canal iónico, son capaces de inducir tumores. Existe un aumento de la actividad de factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) en células que expresan Kv10.1 (50). HIF-1 es una proteína esencial para la reprogramación metabólica de las células tumorales, permitiendo la supervivencia en el ambiente hipóxico de los tumores (51). Los canales Kv10.1 pueden promover oncogénesis mediante mecanismos canónicos y no canónicos, convirtiéndolos en moléculas clave en el desarrollo del cáncer.

Este canal se expresa en aproximadamente el 70% de los tumores humanos (41). Su expresión no solo se limita a tumores sólidos, sino también a leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica, donde la expresión del canal aumenta con la edad del paciente y aumenta la tasa de recaída de la enfermedad (52). La expresión del canal también está relacionada con una tasa de supervivencia menor y resistencia a etopósido, doxorubicina y citarabina (52, 53). La expresión de estos canales en cáncer y su rol promotor de proliferación y malignidad los convierte en un potencial marcador molecular de esta enfermedad. Este canal también se expresa en las líneas celulares empleadas en el presente trabajo. De acuerdo con Hammadi y colaboradores, en ambas líneas (MDA-MB-231 y MCF-7) se expresa una proporción similar

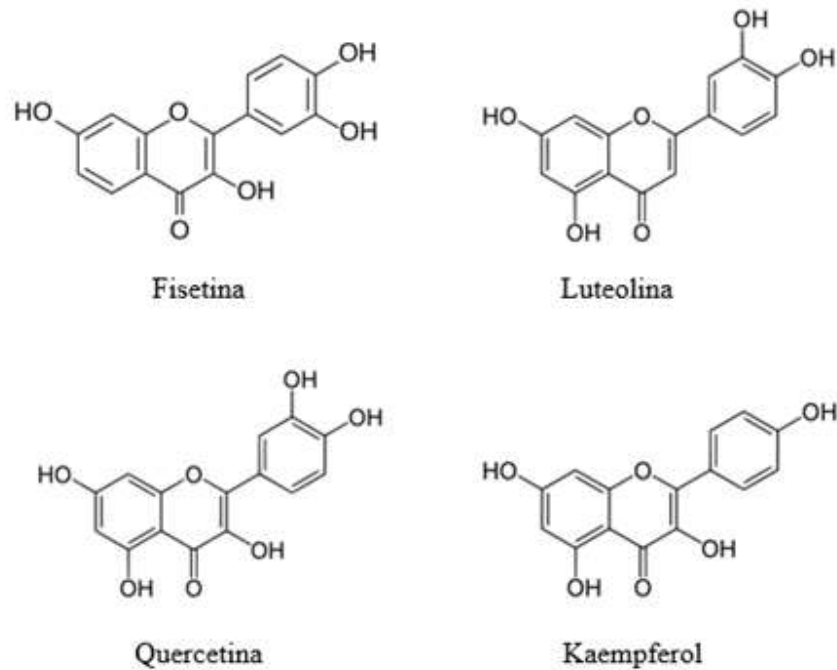


de la proteína, sin embargo, las MCF-7 tienen una mayor cantidad del ARNm en comparación con las MDA-MB-231 (52).

Tomando en cuenta el rol en el desarrollo del cáncer, su expresión limitada en tejidos sanos y su sobreexpresión en tejidos periféricos en cáncer; estos canales son un potencial blanco molecular para la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas con menores efectos secundarios en los pacientes, de manera que exista una ventaja sobre las terapias actuales. Un bloqueador específico de estos canales podría ser una nueva estrategia antitumoral, pero, no existen bloqueadores específicos de estos canales y la mayoría de los existentes, bloquean otros tipos de canales iónicos afectando a células sanas. Un bloqueador específico, incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica, sería ideal, ya que las células que expresan Kv10.1 ya están completamente diferenciadas y solo se tendría como blanco a las células tumorales en división constante (45). Por estos motivos, los canales Kv10.1 han adquirido relevancia en la investigación para encontrar ligandos específicos tanto de origen natural o sintéticos que regulen su actividad.

En este sentido, estos canales pueden ser regulados por diferentes moléculas como la calmodulina (37, 53), la epsina (54), entre otros. También es regulado por metabolitos secundarios del metabolismo de plantas, como los flavonoides (55). Carlson y su equipo demostraron que algunos flavonoides (fisetina, luteolina, quercetina y kaempferol) (**Figura 5**) son capaces de cambiar la dependencia de voltaje de activación del canal a potenciales más hiperpolarizados, alentando la desactivación del canal (55). Esto lo realizan al interactuar con el dominio CNBHD del canal. Los flavonoides tienen similitud estructural con la tirosina presente en el ligando intrínseco del canal. La regulación del canal posiblemente se deba a que los flavonoides desplazan el ligando intrínseco uniéndose al dominio CNBHD (55). Estos ejemplos sugieren que existen moléculas naturales capaces de modificar la actividad de los Kv10.1. En este sentido, *Passiflora* es un género de plantas en el que se ha reportado la presencia de estos flavonoides y otros metabolitos, convirtiéndolo

en un objeto de estudio interesante para la búsqueda de un producto natural que regule canales Kv10.1.



**Figura 5.** Estructura de los flavonoides que modifican la dependencia del voltaje de Kv10.1.

### 1.1.6. Género *Passiflora*

*Passiflora* es el género más extenso de la familia *Passifloraceae*, con aproximadamente 500 especies descritas hasta hoy (56, 57). Las especies pertenecientes a este género se encuentran distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta; principalmente en Centro y Sudamérica, y en menor proporción en Asia, Australia y África tropical (56-58). *Passiflora* es un género de plantas herbáceas o lianas difíciles de clasificar, ya que la morfología de estas especies suele variar (56, 58). Estas plantas se cultivan con un fin ornamental debido a sus flores exóticas y por sus frutos comestibles, principalmente el maracuyá (*P. edulis*) y la granadilla (*P. ligularis*). Además, estas plantas contienen metabolitos activos con actividad farmacológica para el tratamiento de diferentes patologías (58). Todas estas características resaltan la importancia del género *Passiflora* como objeto de estudio.

Los usos tradicionales del género están ampliamente reportados en diferentes países (57). En México, los aztecas llamaban “Coanenepilli” (*Coa*, culebra y *nenepilli*, lengua. Lengua de culebra) a *P. suberosa*, la cual utilizaban para expulsar semen retenido, piedras, coágulos de sangre, orina, aumentar el apetito y para evacuar humores flemáticos (58). *P. edulis* es una de las especies con más usos: sedante, diurético, antihelmíntico, antidiarreico, antihipertensivo, para tratar cólicos, estimular el sistema digestivo y para el tratamiento de la disentería (57). Otra especie utilizada tradicionalmente es *P. foetida* debido a su efecto para tratar el insomnio, histeria, mareos, dolor de cabeza, asma y la falta de periodo menstrual (57). Sin embargo, el uso más conocido de estas plantas es como ansiolítico (60, 61) y suele mezclarse con otras plantas (principalmente *Valeriana officinalis*) en medicamentos herbolarios como auxiliares en el tratamiento de ansiedad, angustia e irritabilidad. Otros usos de este género en medicina tradicional incluyen el tratamiento de dismenorrea, diabetes, fiebre, neurosis, neuralgia, epilepsias, neurastenia, quemaduras, hemorroides, para el tratamiento de la adicción a morfina y para mordeduras de serpientes (57, 61). Estas plantas tienen potencial en la investigación para encontrar nuevos tratamientos para enfermedades que tienen un alto impacto en la población, como el cáncer.

#### **1.1.7. Metabolitos con actividad anticancerígena presentes en *Passiflora***

*Passiflora* es un género de plantas con propiedades medicinales atribuidas desde hace siglos. Dichas propiedades se deben a los metabolitos secundarios característicos del género, como flavonoides, alcaloides, glucósidos y compuestos fenólicos (57). Algunos de los flavonoides reportados en este género son apigenina, luteolina, crisina, kaempferol, miricetina, quercetina y ermanina; así como los glucósidos de flavona vitexina, isovitexina, swertisina, orientina, isoorientina, entre otros (57). Los alcaloides presentes en el género principalmente son derivados de la  $\beta$ -carbolina; como la harmina, harmalina, harmalol, entre otros (57). También se ha reportado la presencia de terpenos como los ácidos ciclopasifloicos A-G, que son triterpenos de tipo cicloartano y sus saponinas, las ciclopasiflosidas (57); ácidos orgánicos

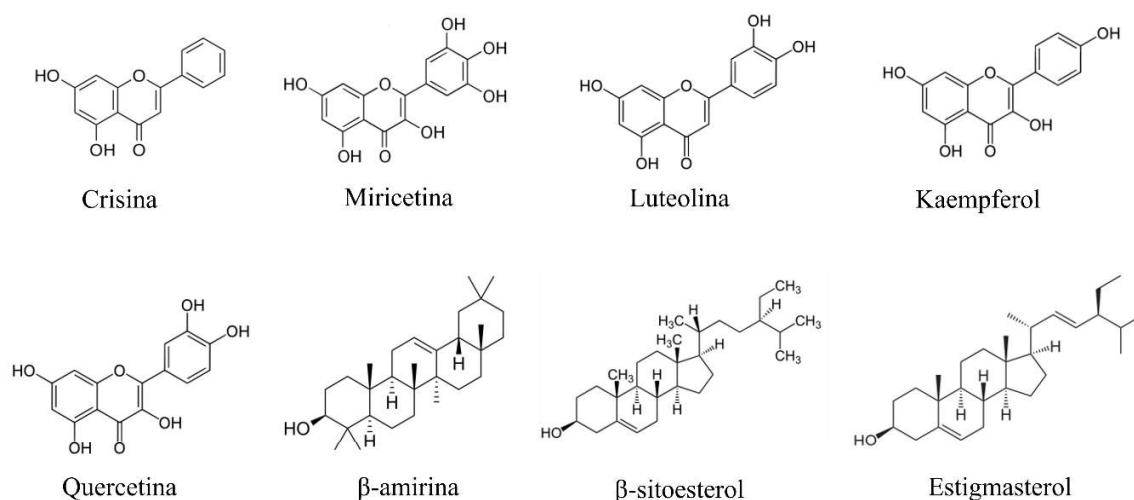
como el ácido vanílico, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido ascórbico y el ácido siríngico (62); y esteroides como el estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol (63) y la  $\beta$ -sitostenona (62), entre otros.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen vegetal que, al ser consumidos, generan efectos beneficiosos para la salud (64, 65). Los flavonoides poseen diferentes efectos anticancerígenos: modulan los efectos de las especies reactivas de oxígeno, provocan el arresto del ciclo celular, inducen apoptosis y autofagia, suprimen proliferación e invasividad disminuyendo metástasis entre otros efectos (66). El flavonoide más representativo del género es la flavona crisina (**Figura 6**). La actividad ansiolítica característica del género *Passiflora* es debido a este flavonoide. También posee actividad inhibitoria en células de cáncer de mama. El tratamiento de células MCF-7 con crisina aumentó la expresión de p53, disminuyendo la viabilidad de estas células (67). También presenta efectos apoptóticos en líneas celulares de cáncer cervicouterino, leucemia, glioma, cáncer de esófago, cáncer de próstata y cáncer de colon (68).

Otro flavonoide presente en *Passiflora* que ha demostrado actividad anticancerígena es el flavonol miricetina (**Figura 6**), que suprime proliferación, invasión y metástasis e induce el arresto del ciclo celular y apoptosis en células cancerígenas mediante la interacción con diferentes blancos moleculares (69). La miricetina posee efectos inhibitorios en cáncer de mama, gástrico, de esófago, de ovario, glioma, glioblastoma multiforme, colon, osteosarcoma canino, carcinoma hepatocelular, cáncer de tiroides, leucemia mieloide crónica, cáncer sinovial, meduloblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, colangiocarcinoma, entre otros (69). Por su parte, la luteolina (**Figura 6**) disminuye la producción del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) en células MDA-MB-231 inhibiendo angiogénesis (70, 71), disminuye la expresión de metaloproteinasa 2 (MMP-2) y metaloproteinasa 9 (MMP-9) en MDA-MB-231 y MCF-7 reduciendo el potencial invasivo de estas células y otros efectos que inhiben la transición endotelial-mesenquimal (70). En general, la luteolina presenta efectos anticancerígenos en

mama, colon, páncreas, próstata, glioblastoma, pulmón, boca, riñón, ovario, piel, hígado, estómago, esófago, vejiga, cáncer cervicouterino y coriocarcinoma (72).

El kaempferol (**Figura 6**) es otro flavonoide capaz de inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y VM7Luc4E2) (73). Provoca el arresto del ciclo celular en G2/M disminuyendo la expresión de CDK1, ciclina A y ciclina B; así como inducir apoptosis aumentando la expresión de p53 en células MDA-MB-231 (74). Esta molécula presenta efectos en cáncer de vejiga, leucemia, cerebro, osteosarcoma, cervicouterino, colon, riñón, hígado, pulmón, boca, ovario, páncreas, próstata y estómago (73). Finalmente, la quercetina es otro flavonoide cuya actividad anticancerígena es sumamente conocida. Este flavonoide tiene efectos antitumorales en linfoma, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer gástrico, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, melanoma, glioma, cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de páncreas (75).



**Figura 6.** Estructuras químicas de algunos flavonoides y terpenos encontrados en el género *Passiflora* que presentan actividad anticancerígena.

Los isoprenoides también son abundantes en el género *Passiflora*, principalmente terpenos, esteroides, saponinas y carotenoides (76). Algunos triterpenos como  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol

y estigmasterol (**Figura 6**) aislados de *Passiflora mucronata*, presentan actividad citotóxica en líneas de cáncer de próstata (PC3) y de melanoma de ratón (B16F10) (63). El  $\beta$ -sitoesterol aumenta la actividad de caspasa-8, iniciando la vía extrínseca de apoptosis (77). A pesar de la presencia de algunos triterpenos con actividad anticancerígena, aún existen muchos otros en *Passiflora* cuyo potencial no ha sido estudiado.

Los flavonoides y terpenoides son los grupos de metabolitos secundarios más abundantes en *Passiflora*, por lo que abordar los efectos de cada uno de ellos es imposible. Sin embargo, los ejemplos aquí presentados demuestran el potencial anticancerígeno de estos metabolitos y su importancia en la búsqueda de estrategias de tratamiento de origen natural.

#### **1.1.8. *Passiflora subpeltata***

*Passiflora subpeltata* Ortega, también conocida como flor de la pasión blanca o granada cimarrona, es una planta trepadora que crece en lugares de gran altitud (78). Es una planta que se desarrolla en lugares abiertos y pedregales: un ecosistema de matorral xerófilo (79). Se encuentra distribuida en México, Centroamérica, Venezuela, Colombia y la India. En México crece a lo largo del eje Neovolcánico y es considerada por la CONABIO como una especie invasiva (79). En cuanto a su descripción, es una especie con hojas trilobuladas que en la base tienen un par de hojas pequeñas llamadas estípulas; sus flores son de color blanco y pueden crecer hasta 5 cm de diámetro y sus frutos son entre amarillos y verdes (79).

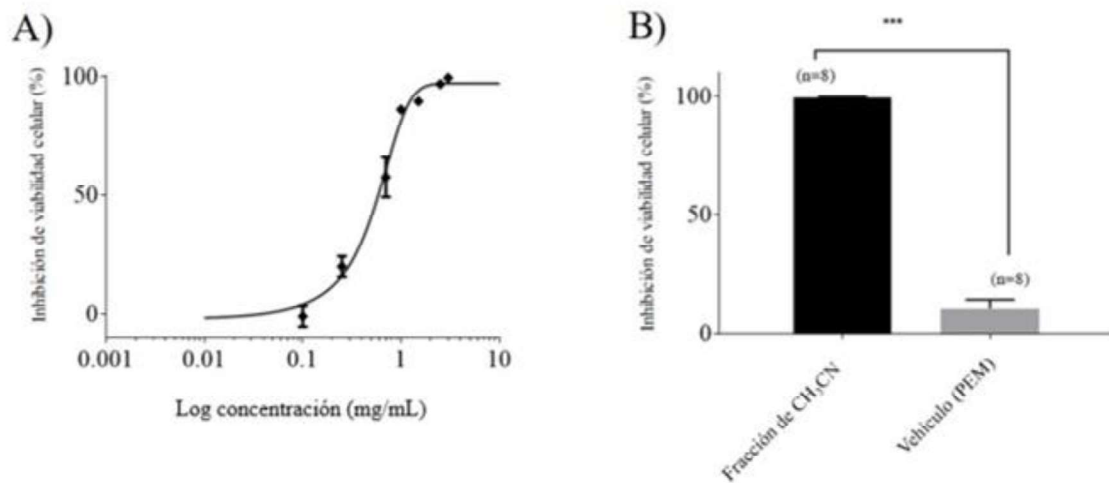
Tradicionalmente en la India, sus hojas son utilizadas para el tratamiento del dolor y como antiinflamatorio (78). También se ha reportado en sus hojas la presencia de un derivado de la cumarina llamada barterina: compuesto con actividad sedante y antiespasmódica (78). Un estudio realizado en ratones albinos suizos mostró que el extracto acetónico de hojas tiene actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica (78). Aunque se han realizado algunos estudios, es evidente la falta de información sobre su perfil fitoquímico, resalta el interés de estudiar esta especie.

## 1.2 Antecedentes inmediatos

Previamente, nuestro grupo de investigación realizó ensayos biodirigidos a partir de extractos de *P. subpeltata* con diferentes polaridades donde se observó que el extracto metanólico de tallos presentó la mayor disminución de viabilidad en células MDA-MB-231 (**Tabla 1**). Posteriormente, a partir del extracto metanólico, se obtuvo una fracción de CH<sub>3</sub>CN mediante particiones con disolventes inmiscibles que mostró actividad de inhibición de viabilidad en la misma línea celular. En ensayos de MTT previos se observó que la fracción de CH<sub>3</sub>CN presenta una disminución de viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 a una concentración de 3 mg/mL del 99.29±0.54% y una IC<sub>50</sub> de 470 µg/mL (Datos no publicados) (**Figura 7**). La fracción disminuye casi al 100% la viabilidad de células MDA-MB-231, indicando un posible efecto terapéutico.

**Tabla 1.** Porcentaje máximo de inhibición e IC<sub>50</sub> de los diferentes extractos de *P. subpeltata*.

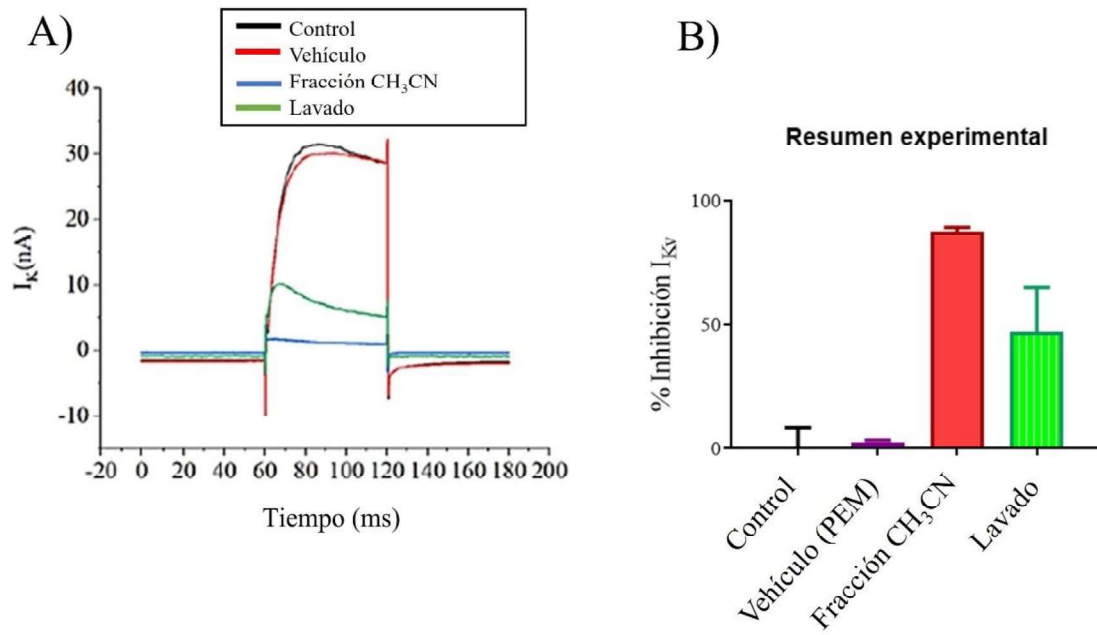
Extracto de <i>P. subpeltata</i>	Porcentaje máximo de inhibición (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Hojas metanol	55.37±8.37	0.73±0.07
Tallos metanol	94.30±1.78	0.53±0.14
Hojas acetona	76±1.53	0.90±0.06
Tallos acetona	78.31±5.98	0.84±7.66
Hojas cloroformo	100±2.50	1.75±0.58
Tallos cloroformo	98.42±2.12	2.07±0.4
Hojas hexano	90.69±2.18	0.75±1.66
Tallos hexano	52.90±4.80	1.37±0.21



**Figura 7.** Viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 expuesta a la fracción de CH<sub>3</sub>CN. **A)** Curva dosis respuesta. **B)** Porcentaje de inhibición máximo en comparación con el vehículo PEM (Polietilenglicol y etanol). Los valores son medias  $\pm$  desviación estándar de ocho réplicas. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando una prueba de t pareada;  $p \leq 0.05$ .

Los ensayos de *Patch-Clamp* permitieron determinar que la fracción inhibe la corriente del canal Kv10.1 en un  $87.82 \pm 7.63\%$  en células HEK-293 sobreexpresadas con el canal. Después de un lavado, hubo una recuperación parcial de la corriente, llegando a una inhibición del  $47.4 \pm 17.93\%$  (**Figura 8**). Esto demuestra que dentro de la fracción de CH<sub>3</sub>CN existen metabolitos secundarios capaces de inhibir la corriente de canales Kv10.1 (Datos no publicados).





**Figura 8.** Ensayos de *Patch Clamp* en configuración de célula completa. **A)** Efecto de la fracción de  $CH_3CN$  de tallos de *P. subpeltata* en canales  $Kv10.1$ . Se observan los trazos representativos de la corriente de  $K^+$ . **B)** Resumen experimental en gráficas;  $p \leq 0.05$ ;  $n=6$ .

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Las características del cáncer están íntimamente relacionadas y, por lo tanto, su regulación puede emplearse como estrategia de tratamiento. Dentro de estas características se encuentra una señalización proliferativa continua relacionada con el ciclo celular. A su vez, el ciclo celular tiene puntos de control dentro de los cuales se encuentra el potencial de membrana, resultado de la actividad de canales iónicos. Los canales Kv están asociados con carcinogénesis y su actividad puede ser regulada con productos naturales. La regulación de Kv10.1 mediante productos naturales como estrategia terapéutica es novedosa, debido a que el canal solo se expresa en el sistema nervioso central de manera normal, mientras que se sobreexpresa en tejidos tumorales. Una molécula que no atraviese la barrera hematoencefálica sería un tratamiento selectivo con menos efectos secundarios, porque no afectaría los canales normales del sistema nervioso, y solo afectaría las células tumorales que aumentan la expresión de Kv10.1. Este sería el primer trabajo experimental en donde se relacionen metabolitos secundarios de una especie de *Passiflora* con una posible regulación de canales iónicos para el tratamiento del cáncer. Al no ser una especie ampliamente estudiada, *P. subpeltata* podría contener metabolitos secundarios con potencial actividad anticancerígena no conocidos. Otras especies del género que ya han sido estudiadas sí tienen metabolitos secundarios con actividad anticancerígena, por lo que el estudio de *P. subpeltata* es relevante para la búsqueda de posibles tratamientos coadyuvantes para el cáncer de mama.

## 3. HIPÓTESIS

En estudios previos, se observó que la fracción de CH<sub>3</sub>CN obtenida a partir del extracto metanólico de tallos de *P. subpeltata* disminuye la viabilidad de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, así como la corriente del canal Kv10.1. Algún o algunos de los compuestos presentes en la fracción podrían estar interactuando con el canal Kv10.1. Esta interacción podría tener algún efecto inhibitorio en la proliferación de células cancerígenas.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Obtener la fracción de CH<sub>3</sub>CN del extracto metanólico de tallos de *P. subpeltata* para aislar y caracterizar los metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria de la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

### **4.2 Objetivos particulares**

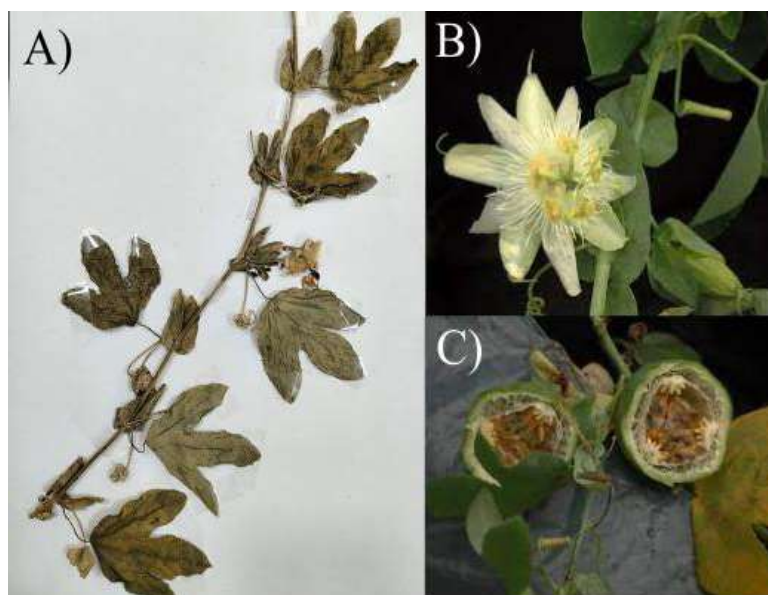
- Aislar él o los metabolitos responsables de la inhibición de viabilidad de células MDA-MB-231 y MCF-7.
- Caracterizar estructuralmente él o los metabolitos responsables de la inhibición de viabilidad de células MDA-MB-231 y MCF-7.
- Optimizar la metodología de extracción y purificación de él o los metabolitos responsables de la inhibición de viabilidad de células MDA-MB-231 y MCF-7.
- Evaluar la viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 en presencia de los metabolitos aislados de la fracción de CH<sub>3</sub>CN mediante el ensayo colorimétrico MTT.
- Evaluar el efecto de los metabolitos en combinación con TEA-Cl sobre la viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 mediante el ensayo colorimétrico MTT.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Recolección del material vegetal

El material vegetal se recolectó de la zona de Ciudad Universitaria en la alcaldía Coyoacán de la Ciudad de México (coordenadas 19°19'21.5"N 99°10'30.8"W). El espécimen fue identificado por la Dra. Marta Juana Martínez Gordillo del herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las características que se tomaron en cuenta para su identificación fueron sus hojas trilobuladas con estípulas en la base, la presencia de zarcillos en los tallos, flores blancas de aproximadamente 5 cm de diámetro y frutos de color verde (**Figura 9**).

Los tallos se separaron del resto de la planta y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm; posteriormente se dejaron secar en una estufa a 45 °C durante 48 horas (80).



**Figura 9.** *Passiflora subpeltata*. A) Se aprecian las hojas trilobuladas, las estípulas y los zarcillos. B) Flor blanca con la morfología característica del género: 5 pétalos, 5 sépalos, la paracorola, el androginóforo, los 5 estambres con las anteras y los 3 estilos. C) Fruto globoso con una cáscara de color verde, en su interior contienen semillas envueltas en una membrana translúcida. Las imágenes B y C fueron recuperadas de la página de CONABIO.

## 5.2. Optimización de la extracción

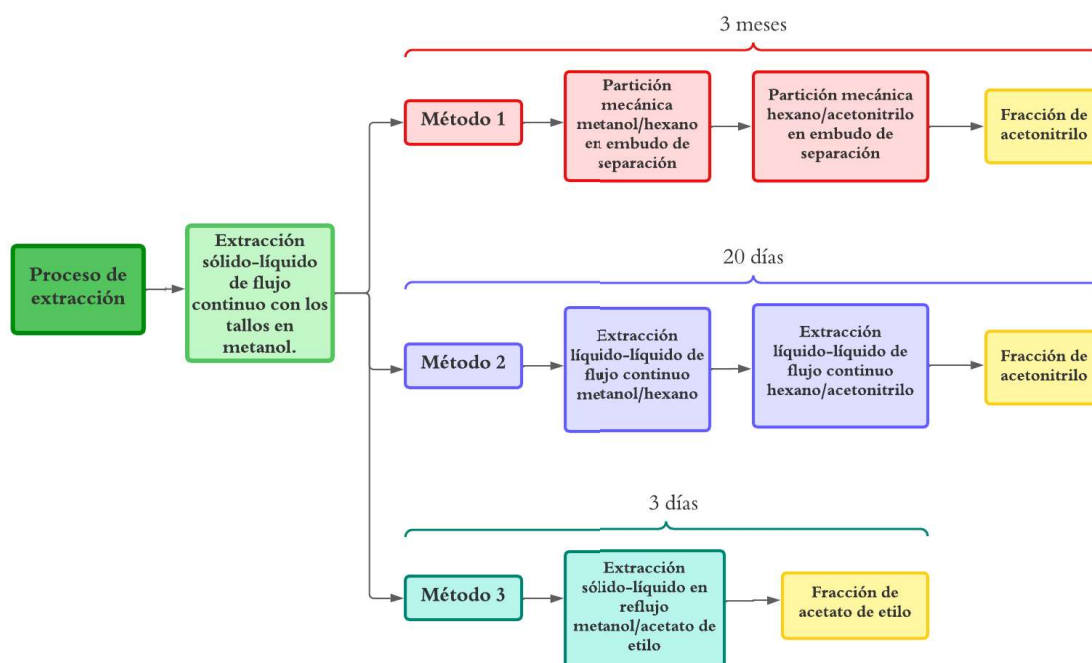
Se obtuvo el extracto metanólico de los tallos de *P. subpeltata* a partir de una extracción sólido-líquido de flujo continuo. Se realizaron dos extracciones, una con 770 gramos (g) y otra con 752 g de tallos. El material vegetal seco fue colocado en un sistema de extracción líquido-líquido de flujo continuo de vidrio con 5 litros (L) de metanol y se dejó durante un periodo de 10 a 15 días. El extracto metanólico obtenido fue llevado a sequedad mediante un rotavapor (*IKA RV10*) a 45 °C y presión reducida.

Para disminuir la complejidad del extracto, se obtuvieron fracciones mediante 3 métodos diferentes. En el primer método se realizaron particiones mecánicas con disolventes inmiscibles en un embudo de separación de un litro. A partir del extracto metanólico de tallos, se realizó una partición con hexano/metanol, donde se recuperó la fracción de hexano. Después se realizó una segunda partición con hexano/CH<sub>3</sub>CN para obtener la fracción de CH<sub>3</sub>CN (**Figura 10, método 1**).

En el segundo método (**Figura 10, método 2**) el extracto metanólico fue sometido a una extracción líquido-líquido de flujo continuo con hexano. Se colocaron 102.84 g del extracto metanólico en un extractor continuo de vidrio y se le adicionaron 700 mililitros (mL) de hexano dejando el proceso de extracción durante 8 días. La fracción de hexano resultante fue llevada a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y vacío. Posteriormente, la fracción de hexano fue sometida a una extracción líquido-líquido de flujo continuo con CH<sub>3</sub>CN. Se colocaron 6.145 g de la fracción de hexano con 400 mL de CH<sub>3</sub>CN en el extractor de vidrio durante 2 días. La fracción CH<sub>3</sub>CN resultante fue llevada a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y almacenada a -16 °C.

El tercer método (**Figura 10, método 3**) se realizó a partir del extracto metanólico crudo con 250 mL de acetato de etilo en reflujo durante 2 horas. Este proceso se realizó 3 veces. La

fracción de acetato de etilo resultante fue filtrada y llevada a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y almacenado a -4 °C.



**Figura 10.** Diagrama esquemático de los diferentes métodos empleados para obtener la fracción de CH<sub>3</sub>CN y de acetato de etilo de *P. subpeltata*.

### 5.3. Cromatografía en columna de la fracción de CH<sub>3</sub>CN

Se pesaron 4.7473 g de la fracción de CH<sub>3</sub>CN para realizar una separación mediante cromatografía en columna (2.5 cm x 40 cm) con flujo en gradiente empleando sílica gel. La columna fue eluida con un sistema de disolventes conformado por hexano/acetato de etilo. La polaridad de la fase móvil se fue modificando a lo largo del experimento: al principio se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 95:5 y se fue aumentando la polaridad de la fase móvil hasta eluir solamente con acetato de etilo (**Figura 11A**). Las fracciones se monitorearon mediante cromatografía en capa fina y se recuperaron en tubos *falcon* de 50 mL. Se agruparon las fracciones que fueron iguales en cromatografía en capa fina y se llevaron a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y se almacenaron a -16 °C.

#### **5.4. Caracterización fitoquímica cualitativa**

Los experimentos de cromatografía en capa fina se realizaron empleando placas de silica gel con base de aluminio (Si 60 de 10×20 cm *Merck*) utilizando como fase móvil una mezcla de los disolventes hexano/acetato de etilo en relación 6:4. Las muestras se colocaron a 3 milímetros (mm) desde el borde inferior de las placas. Las placas fueron visualizadas en una cámara UV a 254 nanómetros (nm) y 365 nm. Se utilizaron los reveladores químicos: yodo (Y), ácido fosfomolibdico (AF), cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>), verde de bromocresol (VB), ninhidrina (NH), Folin-Ciocalteu (FC), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 20% y reactivo de Dragendorff (D) para determinar el perfil fitoquímico cualitativo de los compuestos presentes en las muestras.

#### **5.5. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de eliminación de radicales de DPPH descrito previamente por Nithya y Madhavi (81) con algunas modificaciones. Se preparó una solución 0.5 mmol de DPPH en metanol. A cada fracción evaluada de 15 µg/mL se le agregaron 0.375 mL de la solución de DPPH y se aforó a 5 mL con metanol, posteriormente se determinó su absorbancia mediante un espectrofotómetro a 517 y 550 nm. Para determinar la capacidad de neutralización de radicales libres se elaboró una curva estándar empleando como patrón el ácido ascórbico. Se prepararon 6 concentraciones diferentes de ácido ascórbico 30, 25, 20, 15, 10 y 5 µg/mL; cada punto se realizó por quintuplicado. La fracción de CH<sub>3</sub>CN se probó a una concentración de 15 µg/mL. Como blanco se utilizó una mezcla de 15 µg/mL de la muestra (0.5 mL) y 3.5 mL de metanol. Se preparó una solución control de ácido ascórbico con 0.375 mL de la solución de DPPH, la cual se aforó a 5 mL con metanol.

Se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. La absorbancia se midió a 517 y 550 nm en el espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) (*Genesys 10S UV-Vis*). Los datos de actividad antioxidante de la fracción se expresaron como µg de peso AAE/100 g de masa seca. El porcentaje de disminución del radical se calculó con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de disminución} = 100 - \left[ \frac{100 (\text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \right]$$

### 5.6. Determinación del contenido fenólico total

El contenido total de fenoles fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito previamente por Kamtekar *et al.* (82) con algunas modificaciones. Se realizó una curva patrón de ácido gálico. Se preparó una solución stock a una concentración de 1000 µg/mL. Se disolvieron 10 mg de ácido gálico en 10 mL de agua destilada. La curva se realizó con concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL. En un tubo se colocó el volumen necesario de stock para cada concentración y se agregaron 5 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 5 minutos se agregaron a cada tubo 1.5 mL de una solución 20% de carbonato de potasio y se aforó a 10 mL con agua destilada. Cada punto se realizó por triplicado. La fracción de CH<sub>3</sub>CN se probó a 60 y 80 µg/mL. Se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que se generara un color azul intenso. La absorbancia se midió a 750 nm en el espectrofotómetro UV-Vis. Como blanco se utilizó agua destilada. Los valores de equivalentes de ácido gálico se obtuvieron interpolando directamente en la curva patrón. Los datos de contenido fenólico total de la fracción se expresaron como µg del peso GAE/100 g de masa seca.

### 5.7. Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de carcinoma de mama humano triple negativo, MDA-MB-231, y de cáncer de mama humano luminal A, MCF-7. Ambas líneas fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% ampicilina-estreptomicina en una incubadora con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) al 5% en una atmósfera húmeda, a una temperatura de 37 °C.



## 5.8. Ensayos de MTT

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo en 100  $\mu\text{L}$  de medio. Se permitió que las células se adhirieran durante un período de 24 horas a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  en una incubadora. Las células fueron tratadas durante 24 horas con una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (83, 84) de cada fracción disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO). El MTT (*Merck Millipore* CAS 298-93-1) se agregó a una concentración de 5  $\text{mg}/\text{mL}$  en cada pozo y se dejó incubar durante 2 horas. Se retiró el medio de cultivo y los cristales se disolvieron con 50  $\mu\text{L}$  de DMSO. La lectura se hizo a 570 nm en un lector de placas de 96 pozos *TECAN Infinite M1000*. Como control negativo se utilizó solamente medio, como control de vehículo se usó DMSO al 2% y además se utilizó un control de células sin tratamiento.

Para el cálculo de las  $\text{IC}_{50}$  lo único que se modificó fueron las concentraciones empleadas de cada fracción. Las células fueron tratadas durante 24 horas con una concentración de 200, 100, 50, 25 y 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las fracciones. La perfenazina se probó en concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El ensayo MTT se realizó de la misma manera antes descrita. La lectura se hizo a 570 nm en un lector de placas de 96 pozos *TECAN Infinite M1000*. Como control negativo se utilizó solamente medio, como control de vehículo se usó DMSO al 2% y además se utilizó un control negativo. El valor de la  $\text{IC}_{50}$  se obtuvo a partir de la interpolación directa de las curvas dosis respuesta, graficando el porcentaje de inhibición de viabilidad y el logaritmo de la concentración de las fracciones a partir de 3 experimentos independientes.

El ensayo utilizando el bloqueador de canales  $\text{K}_v$  se realizó bajo las mismas condiciones previamente descritas. Se utilizó una concentración 30 mM de cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl). Las células fueron tratadas durante 24 horas con las  $\text{IC}_{50}$  de la fracción 17, fracción secundaria V.A y fracción terciaria V.A.2 solas y adicionando TEA. El ensayo MTT y la lectura de la placa se realizó de la misma manera antes descrita. Como control negativo se

utilizó solamente medio, como control de vehículo se usó DMSO al 2% y además se utilizó un control de células sin tratamiento.

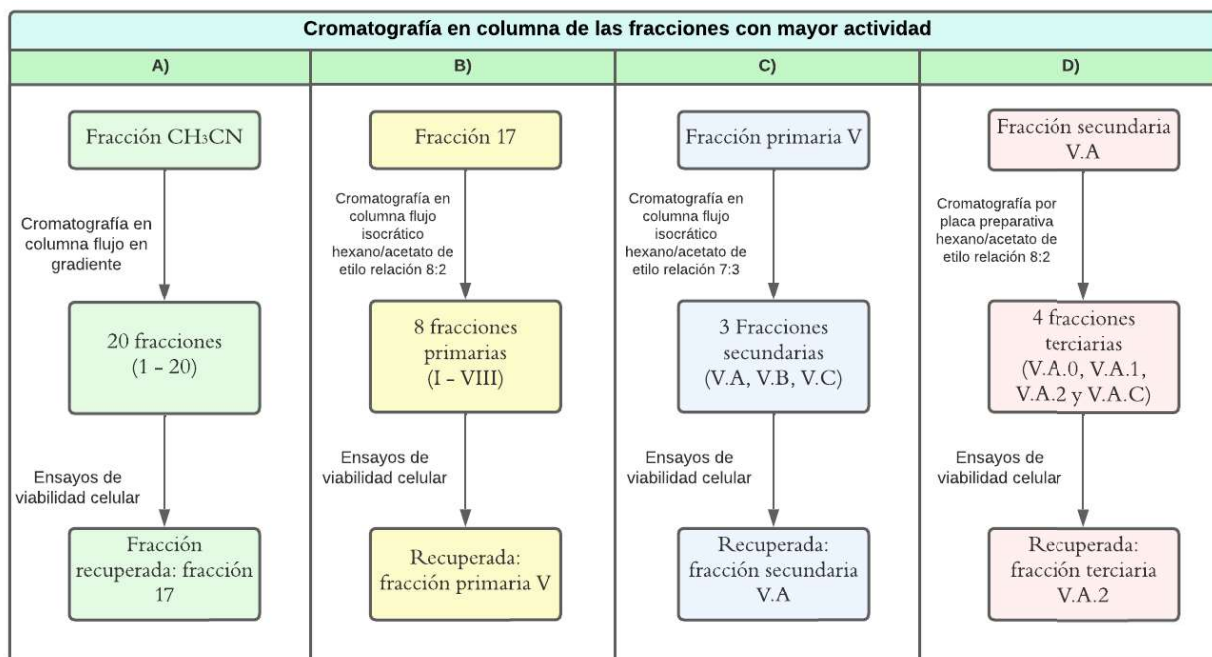
### **5.9. Cromatografía en columna de las fracciones con mayor actividad obtenidas de la fracción de CH<sub>3</sub>CN de *P. subpeltata*.**

A partir de la fracción 17 que presentó mayor inhibición de la viabilidad en ambas líneas celulares, se realizó otra cromatografía en columna (**Figura 11B**). Se separaron 4.7 g mediante cromatografía en columna (4 cm x 80 cm) empleando sílica gel (Sílica gel 60, 0.063-0.200 mm). La columna fue eluida con un sistema de disolventes conformado por hexano/acetato de etilo en una relación 8:2 en flujo isocrático. Las fracciones primarias se llevaron a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y se almacenaron a -16 °C.

Para todas fracciones primarias obtenidas, se probó la inhibición de viabilidad de las líneas celulares. Se recuperó la fracción primaria que presentó mayor porcentaje de inhibición para volver a purificarla y disminuir su complejidad (**Figura 11C**). Para esto, se separaron 476.7 mg de la fracción primaria V mediante cromatografía en columna (2 cm x 27 cm) con sílica gel (Sílica gel 60, 0.063-0.200 mm). La columna fue eluida con un sistema de disolventes conformado por hexano/acetato de etilo en una relación 7:3 en flujo isocrático. Las fracciones secundarias se llevaron a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y se almacenaron a -16 °C.

Se volvió a probar la inhibición de viabilidad de las líneas celulares en presencia de las fracciones terciarias. Se recuperó la que presentó mayor actividad y se volvió a purificar (**Figura 11D**). Se separaron 37.2 mg mediante cromatografía en placa preparativa. Se utilizaron placas UNIPLATE™ Silica gel GF UV245 20x20 cm 1500 micras. La placa fue eluida 8 veces con una fase móvil compuesta de hexano/acetato de etilo 8:2. Las fracciones terciarias se rasparon de la sílica con una espátula, se colocaron en agitación con acetato de etilo, metanol y acetona, se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5

minutos, se filtraron y se decantaron. Se llevaron a sequedad mediante un rotavapor a 40 °C y se almacenaron a -16 °C.

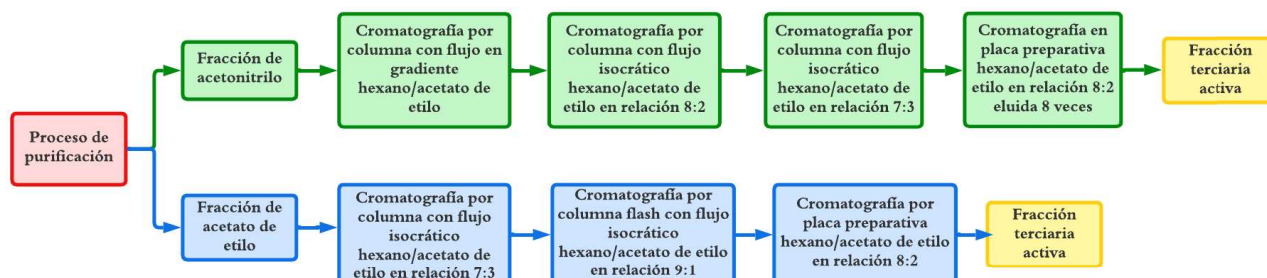


**Figura 11.** Diagrama de la metodología utilizada en el ensayo biodirigido para la purificación de las fracciones con mayor actividad. **A)** Primera cromatografía por columna, **B)** Segunda cromatografía por columna, **C)** Tercer cromatografía por columna y **D)** Cromatografía por placa preparativa.

### 5.10. Optimización de la purificación

En la primera purificación se realizaron tres cromatografías en columna y una en placa preparativa para purificar la fracción terciaria activa (**Figura 12, fracción de acetonitrilo**). Esto se realizó, ya que la fracción activa eran desconocida y se necesitaba hacer una purificación de todos los componentes hasta encontrar dicha fracción (ensayo biodirigido). Una vez que se identificó la fracción terciaria activa, se optimizó la purificación para disminuir el gasto de disolventes y de tiempo. A partir de la fracción de acetato de etilo, se realizaron tres cromatografías en columna con las condiciones que se observan en el

diagrama de purificación (**Figura 12, fracción de acetato de etilo**). Esto permitió obtener la fracción terciaria activa en aproximadamente 10 a 15 días.



**Figura 12.** Diagrama esquemático de los diferentes métodos cromatográficos empleados para obtener los compuestos activos de *P. subpeltata*.

### 5.11. Caracterización de las fracciones activas

*Espectroscopía de FT-IR:* Se utilizó un espectrómetro *FTIR Bruker Tensor-27* con el software OPUS. Los espectros se obtuvieron por reflectancia total atenuada (ATR) y en pastilla de bromuro de potasio (KBr).

*RMN:* Se obtuvo el espectro de  $H^1$ . Se utilizó un espectrómetro JEOL ECA-500. La muestra se disolvió en cloroformo deuterado ( $CDCl_3$ ) y los desplazamientos químicos se reportaron en partes por millón (ppm).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

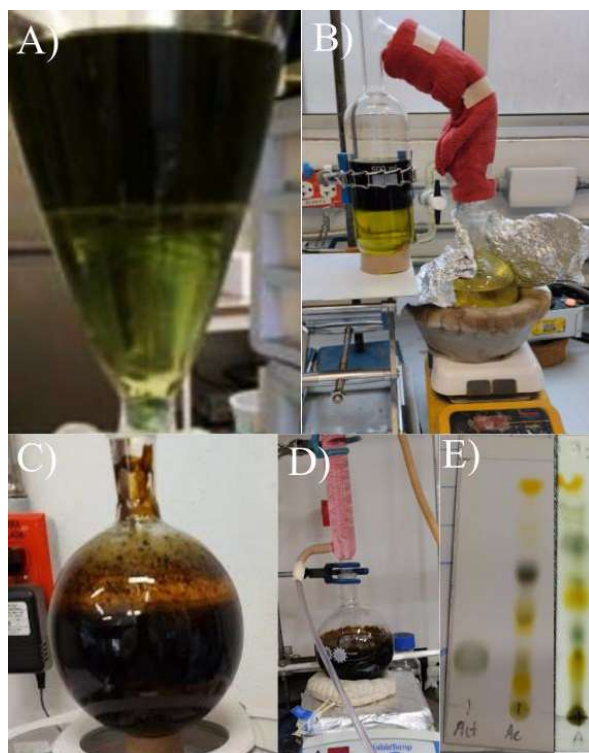
### 6.1. Optimización de la extracción

La extracción de la fracción activa se realizó mediante tres métodos diferentes, buscando optimizar el gasto de recursos. El primer método implicó el uso de un embudo de separación para realizar particiones con disolventes inmiscibles (**Figura 13A**). Debido a que las particiones se realizaron hasta que el disolvente extractor dejara de tener coloración, el proceso implicó un gasto de disolventes (tomando en cuenta que para cada partición se utilizaron aproximadamente 300 mL de cada disolvente). Además, la partición hexano/ $\text{CH}_3\text{CN}$  tendía a emulsificar lo que complicó la separación y la volvió más tardada; esta metodología duró aproximadamente 3 meses. La cantidad obtenida de cada fracción fue menor a 1 g, por lo que fue necesario optimizar el método de extracción.

En el segundo método se buscó que la extracción se realizara de manera eficiente, por lo que se hicieron extracciones líquido-líquido de flujo continuo (**Figura 13B**). A partir de la extracción sólido-líquido de 770 g de tallos, se obtuvieron 103 g del extracto metanólico crudo, con un rendimiento del 13.37%. La mayor parte del peso seco se quedó en los tallos, de los cuales se recuperaron 658 g al terminar la extracción. Del extracto metanólico (103 g), se obtuvieron 6.1 g de la fracción de hexano, con un rendimiento del 5.9%. Finalmente, de la fracción de hexano se obtuvieron 4.7 g de la fracción de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , con un rendimiento del 77%. Este método mejoró la cantidad obtenida de la fracción final, sin embargo, implicó un gasto de disolventes, recursos y de tiempo (aproximadamente 20 días), a pesar de haber logrado una mejoría en comparación con el primer método. Esto hizo explorar una nueva metodología de extracción que permitiera optimizar recursos y tiempo.

En el último método se buscó disminuir principalmente la duración de las extracciones. Al llevar a sequedad el extracto metanólico crudo, éste adquiere una consistencia muy viscosa que se vuelve fluida con el calor y al disminuir la temperatura se convierte en un sólido (**Figura 13C**). Estas características permitieron realizar una extracción sólido-líquido en reflujo con acetato de etilo (**Figura 13D**). A partir de la extracción sólido-líquido de 752 g

de tallos, se obtuvieron 85.2 g del extracto metanólico crudo, con un rendimiento del 11.33%. El extracto metanólico se sometió a una siguiente extracción con acetato de etilo, donde se obtuvieron 13.3 g con un rendimiento del 15.6%. Así, con este último método se optimizó la metodología de extracción utilizando menos disolventes y tiempo; solamente se tardó 3 días en obtener el extracto con la misma fracción activa de acuerdo con la cromatografía en capa fina. Utilizando el método 2 y el método 3 se obtiene una proporción similar de compuestos, sin embargo, en cromatografía de capa fina se aprecia que utilizando el método 2 hay un enriquecimiento de los compuestos menos polares. En contraste con la fracción de acetato de etilo contiene menos compuestos no polares, disminuyendo la complejidad y facilitando la purificación por cromatografía en columna, en comparación con la fracción de  $\text{CH}_3\text{CN}$  (**Figura 13E**).

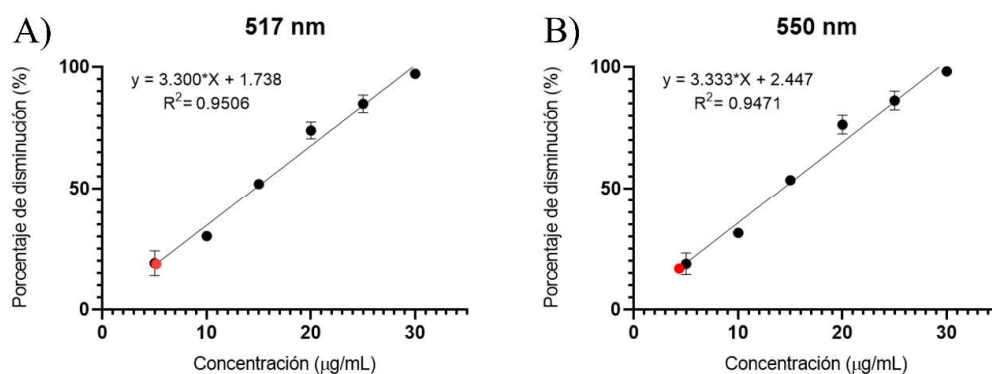


**Figura 13.** Métodos empleados para la extracción de los compuestos activos. **A)** Método 1, particiones líquido-líquido en un embudo de separación. **B)** Método 2, extracción tipo líquido-líquido de flujo continuo. **C)** Extracto metanólico de tallos. **D)** Método 3, extracción líquido-líquido directa. **E)** Cromatografía en capa fina hexano/acetato de etilo (7:3), Act es la fracción activa, Ac es la fracción de acetato de etilo (método 3) y A es la fracción de  $\text{CH}_3\text{CN}$  (método 2).

## 6.2. Actividad antioxidante de la fracción de CH<sub>3</sub>CN de tallos de *P. subpeltata*

El ensayo del DPPH se basa en medir la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para neutralizar el radical del DPPH. Este radical libre se caracteriza por ser estable debido a la deslocalización de un radical libre sobre toda la molécula (85, 86). Esta deslocalización genera un color morado que puede medirse a 517 nm, sin embargo, al mezclarse con una sustancia antioxidante que pueda donar un hidrógeno el DPPH se reduce y adquiere una coloración amarilla (86, 87). La medición también puede realizarse a 550 nm para evitar la interferencia de otros pigmentos (87). Estos cambios en la estructura y la coloración pueden ser medidos mediante espectroscopia UV-Vis para determinar la capacidad que tiene una sustancia para neutralizar radicales libres, una propiedad importante de un antioxidante.

Las mediciones mostraron que 15 µg/mL de la fracción de CH<sub>3</sub>CN presentan una actividad antioxidante de 5.15 µg de AAE/100 g de masa seca a 517 nm (**Figura 14A**) y de 4.34 µg de AAE/100 g de masa seca a 550 nm (**Figura 14B**). La fracción de CH<sub>3</sub>CN presentó un porcentaje de inhibición a 517 nm de 18.75% y de 16.92% a 550 nm con una concentración de 15 µg/mL. De acuerdo con estos resultados, la fracción de CH<sub>3</sub>CN contiene moléculas con actividad antioxidante. Sin embargo, la actividad es menor en comparación con el ácido ascórbico. La baja actividad que se observa puede deberse a que las moléculas antioxidantes se encuentren en una baja concentración, tomando en cuenta que esta fracción no está pura y contiene una gran cantidad de compuestos que podrían interferir con la actividad. Hassan y colaboradores midieron la actividad antioxidante de fracciones de diferentes disolventes provenientes del extracto etanólico de los tallos de la planta *Ficus platyphylla*. Haciendo una comparación con sus resultados, la fracción de CH<sub>3</sub>CN a una concentración de 15 µg/mL tiene una actividad similar a la actividad de 20 mg/mL de su fracción de acetato de etilo (88). Esta fue la menor concentración que ellos probaron, por lo que la fracción de CH<sub>3</sub>CN tiene una actividad similar y, probablemente, si se aumentara la concentración, se observaría un mayor efecto antioxidante. En plantas, los flavonoides e isoprenoides son parte de las moléculas que presentan actividad antioxidante. Tomando en cuenta la polaridad de los disolventes utilizados para la obtención de la fracción, no parece que haya un alto contenido de flavonoides en la fracción y la actividad podría deberse a algún isoprenoide.

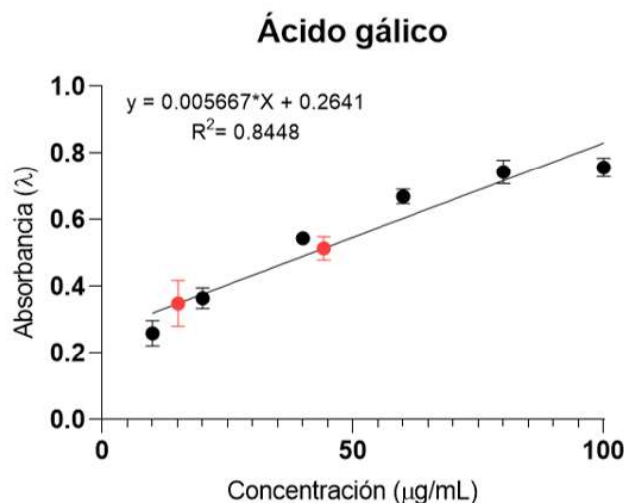


**Figura 14.** Disminución de la concentración del radical DPPH en presencia de ácido ascórbico, determinado a **A)** 517 nm y **B)** 550 nm. El punto rojo representa la actividad antioxidante de 0.5 mL de la fracción de CH<sub>3</sub>CN. Los valores son medias ± el error de cinco experimentos independientes.

### 6.3. Determinación del contenido fenólico total de la fracción de CH<sub>3</sub>CN de tallos de *P. subpeltata*

Mediante este ensayo se determinó que en una concentración de 60 µg/mL de la fracción de CH<sub>3</sub>CN hay una concentración de 15.16 µg de GAE/100 g de masa seca; mientras que en 80 µg/mL de la fracción hay 44.12 µg de GAE/100 g de masa seca (**Figura 15**). En comparación con el ácido gálico, la fracción activa de CH<sub>3</sub>CN tiene menor contenido de fenoles.





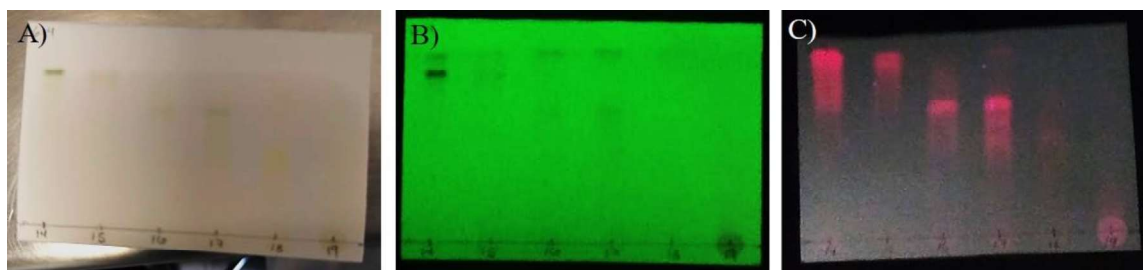
**Figura 15.** Aumento de la absorbancia resultado de la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con el ácido gálico. Los puntos rojos representan la concentración de fenoles en 60 µg/mL y 80 µg/mL de la fracción de CH<sub>3</sub>CN. Los valores son medias ± el error de cuatro experimentos independientes.

#### 6.4. Ensayo biodirigido: Purificación y viabilidad celular.

La fracción de CH<sub>3</sub>CN con un tratamiento de 200 µg/mL durante 24 horas presentó un porcentaje de inhibición de viabilidad de 3.41% en células MDA-MB-231 y de 25.77% en las MCF-7. Estos resultados concuerdan con los antecedentes donde presentó mayor actividad de inhibición de viabilidad en comparación con la fracción de hexano (obtenidos de la extracción CH<sub>3</sub>CN/hexano) (**Figura 17**). Previamente, se determinó que la IC<sub>50</sub> de la fracción de CH<sub>3</sub>CN es de 470 µg/mL (Datos no publicados), por lo que tiene sentido que, al utilizar una concentración menor, tenga menor efecto sobre la viabilidad.

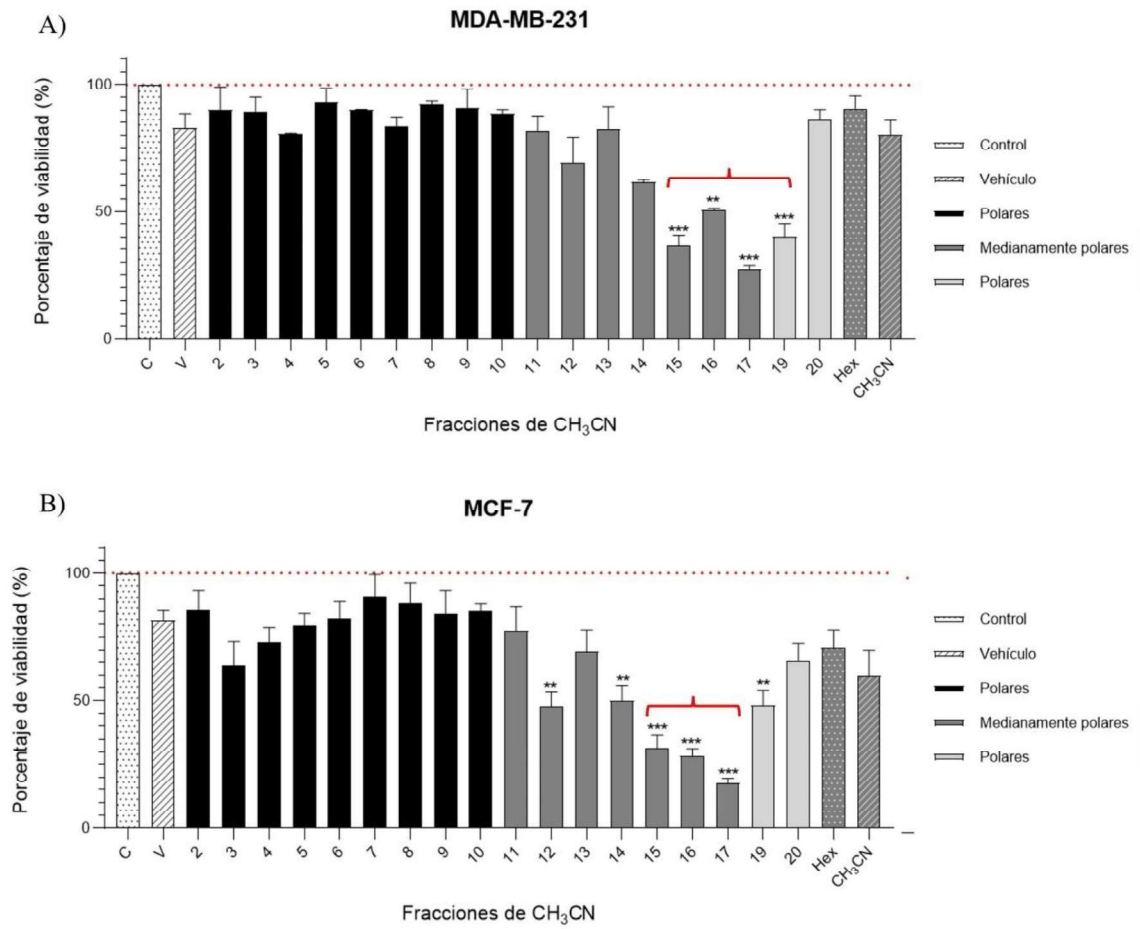
De la primera cromatografía por columna se obtuvieron 20 fracciones de diferente polaridad conformadas por diferentes compuestos. Las fracciones 1 y 18 se descartaron debido a que no solubilizaron en el vehículo. Cuando las fracciones con mayor actividad se sometieron a cromatografía en capa fina, se observaron compuestos de color verde y amarillo (**Figura 16A**), así como compuestos con fluorescencia de color rosa al observarse bajo luz UV (365 nm) (**Figura 16C**), coloración similar a la reportada por Sun y colaboradores para

compuestos fenólicos (89). La presencia de este tipo de compuestos se corroboró al ser revelados con Folin-Ciocalteu, sin embargo, estas bandas no fueron visibles al utilizar  $\text{FeCl}_3$  (**Tabla 3**).

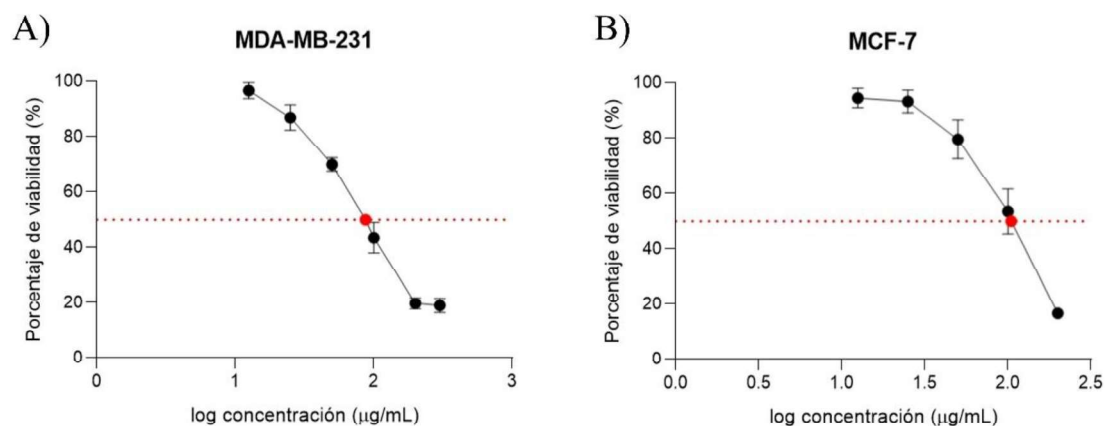


**Figura 16.** Cromatografía en capa fina de las fracciones 14 a 19 (de izquierda a derecha) con una fase móvil 6:4 hexano/acetato de etilo **A)** bajo luz visible, **B)** 245 nm, **C)** 365 nm.

En las células MDA-MB-231, el tratamiento con las fracciones 15, 16, 17 y 19 presentaron los mayores porcentajes de inhibición de viabilidad con 63.61%, 49.46%, 73.07% y 59.82% respectivamente (**Figura 17A**). Por otro lado, las células MCF-7 fueron más sensibles al tratamiento con las fracciones medianamente polares. Las fracciones 12, 14, 15, 16, 17 y 19 presentaron los mayores porcentajes de inhibición de viabilidad con 52.4%, 50.18%, 68.48%, 71.65%, 82.5% y 51.86%, respectivamente (**Figura 17B**). Estos resultados tienen sentido debido a que las líneas celulares empleadas presentan sobreexpresión del canal Kv10.1. Ambas líneas tienen una proporción similar de la proteína, pero las MCF-7 tienen una mayor expresión del ARNm (52). Por lo tanto, los compuestos dentro de la fracción podrían estar regulando el canal. Las demás fracciones presentaron una actividad menor a la del vehículo, por lo que fueron descartadas. Aquellos que presentaron una viabilidad mayor al 60%, también fueron descartados debido a la poca actividad que presentaron. Se decidió continuar purificando la fracción 17 debido a que fue la que presentó mayor actividad en ambas líneas celulares. Se obtuvieron 476.7 mg de esta fracción, con un rendimiento del 10.1%. La  $\text{IC}_{50}$  de la fracción 17 en MDA-MB-231 fue de  $87.27 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 18A**) y en MCF-7 fue de  $104.76 \pm 6.9 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 18B**).

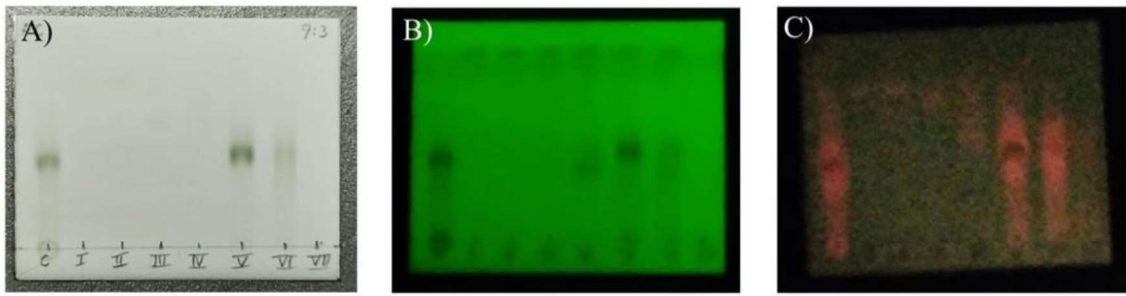


**Figura 17.** Exploración de las fracciones a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en células **A)** MDA-MB-231 y **B)** MCF-7. Los valores son medias  $\pm$  el error de dos experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando una prueba de ANOVA de una sola vía comparando contra el vehículo seguida de una prueba de *Dunnett*; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ ; (\*\*)  $p \leq 0.005$ .



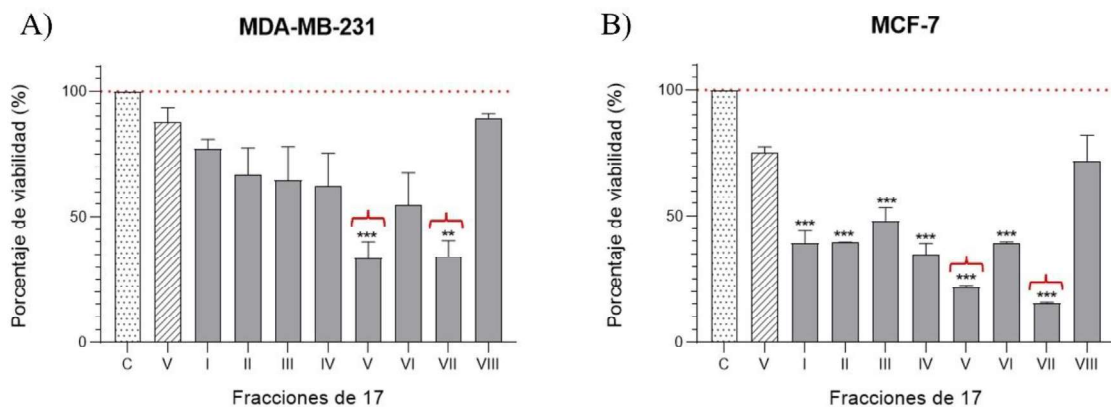
**Figura 18.** Curva dosis-respuesta de la fracción 17 de la fracción de CH<sub>3</sub>CN. Los valores son medias  $\pm$  el error de tres experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. El cálculo se realizó mediante una regresión no lineal. **A)** Células MDA-MB-231. **B)** Células MCF-7.

La fracción 17 se separó mediante cromatografía por columna obteniendo 8 fracciones primarias (I – VIII). En la cromatografía en capa fina se observó que seguían teniendo varios compuestos. Los compuestos presentes en las fracciones primarias I a IV solamente se observaron bajo la luz UV, mientras que las fracciones V a VII tenían compuestos que se observaron bajo la luz visible y otros que se observaron bajo la luz UV (**Figura 19**). La fracción primaria VIII era un compuesto polar que precipitó con hexano y se separó por filtración antes de realizar la cromatografía por columna. Estas subfracciones también presentaron fluorescencia rosa a 365 nm (**Figura 19C**). En función de la fracción 17, de la fracción primaria V se obtuvieron 71.3 mg con un rendimiento del 15% y de la fracción primaria VII se obtuvieron 88 mg con un rendimiento del 18.5%.



**Figura 19.** Cromatografía en capa fina de las fracciones primarias I a VIII (de izquierda a derecha; C es la fracción 17) con una fase móvil 7:3 hexano/acetato de etilo **A)** bajo luz visible, **B)** 245 nm, **C)** 365 nm.

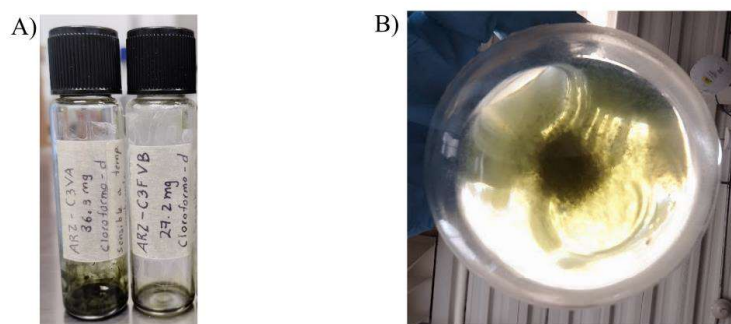
Las fracciones primarias V y VII presentaron mayor actividad en ambas líneas celulares. En las MDA-MB-231 tuvieron un porcentaje de inhibición de viabilidad de 66.5% y 65.8%, mientras que en las MCF-7 los porcentajes fueron del 78.36% y 84.42%, respectivamente (**Figura 20**). Las células MCF-7 fueron más sensibles al tratamiento en comparación con las MDA-MB-231. Las demás subfracciones presentaron una actividad menor, por lo que fueron descartadas. Se continuó purificando V y VII debido a que presentaron mayor actividad en ambas líneas celulares.



**Figura 20.** Exploración de las fracciones primarias a 200 µg/mL en células **A)** MDA-MB-231 y **B)** MCF-7.

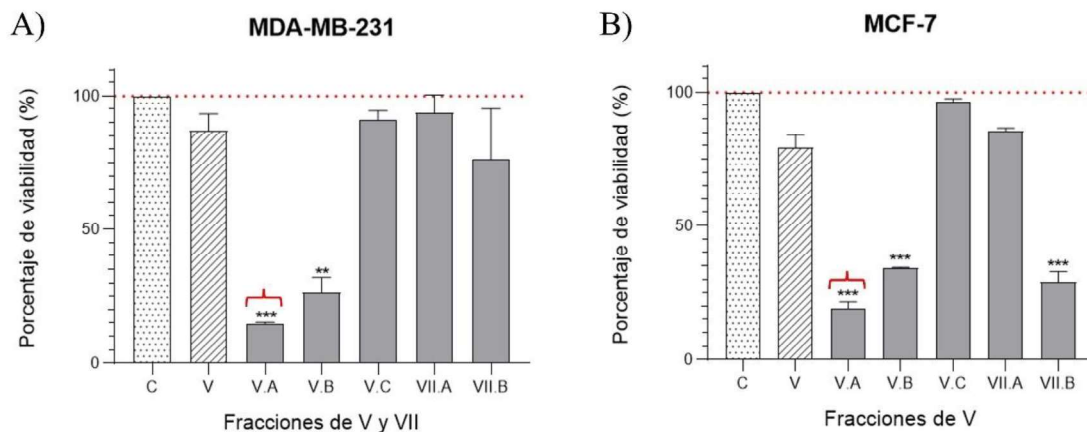
Los valores son medias  $\pm$  el error de dos experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando una prueba de ANOVA de una sola vía comparando contra el vehículo seguida de una prueba de *Dunnett*; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ ; (\*\*)  $p \leq 0.005$ .

En la cromatografía en columna de la fracción primaria V se recuperaron 3 fracciones secundarias (V.A, V.B y V.C) (**Figura 21A**). Se obtuvieron 37.2 mg de la fracción secundaria V.A para un rendimiento de 52.2% respecto a la fracción primaria V, de V.B se obtuvieron 12.4 mg para un rendimiento del 17.4% respecto a la fracción primaria V y de V.C se obtuvieron 21.7 mg con un rendimiento del 20.4% respecto a la fracción primaria V. La fracción primaria VII se separó mediante filtración debido a que uno de los compuestos precipitó al agregar hexano (**Figura 21B**), de manera que se recuperaron dos fracciones secundarias (VII.A; precipitado y VII.B). De VII.A se obtuvieron 55 mg con un rendimiento del 62.5% respecto a la fracción primaria VII y de VII.B se obtuvieron 33 mg con un rendimiento del 37.5% respecto a la fracción primaria VII.



**Figura 21.** Fracciones secundarias. **A)** Fracciones V.A y V.B llevadas a sequedad, **B)** fracción VII disuelta en hexano, se observa el precipitado de VII.A.

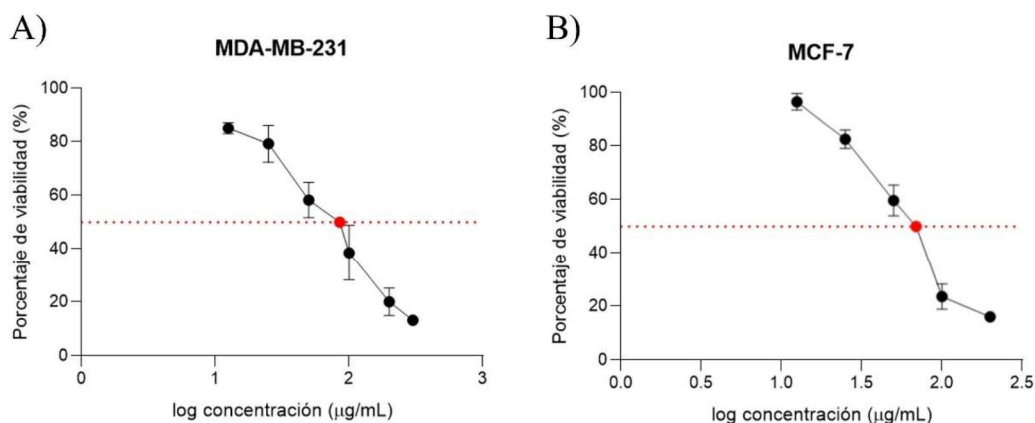
Se realizaron las pruebas de viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 donde la fracción secundaria V.A presentó mayor actividad, con porcentajes de inhibición de viabilidad de 85.1% y 80.97%, respectivamente (**Figura 22**). La fracción secundaria VII.B tuvo un porcentaje de inhibición de viabilidad de 23.72% en MDA-MB-231 y 70.93% en MCF-7. Estos resultados implican que ambas fracciones secundarias, VII.A y VII.B, tienen mayor actividad al estar juntas, probablemente debido a que algunos de los metabolitos tengan un efecto sinérgico. Teniendo en cuenta estos resultados, se continuó purificando la fracción secundaria V.A, debido a que presentó mayor actividad en ambas líneas celulares.



**Figura 22.** Exploración de las fracciones secundarias a 200  $\mu\text{g/mL}$  en células **A)** MDA-MB-231 y **B)** MCF-7.

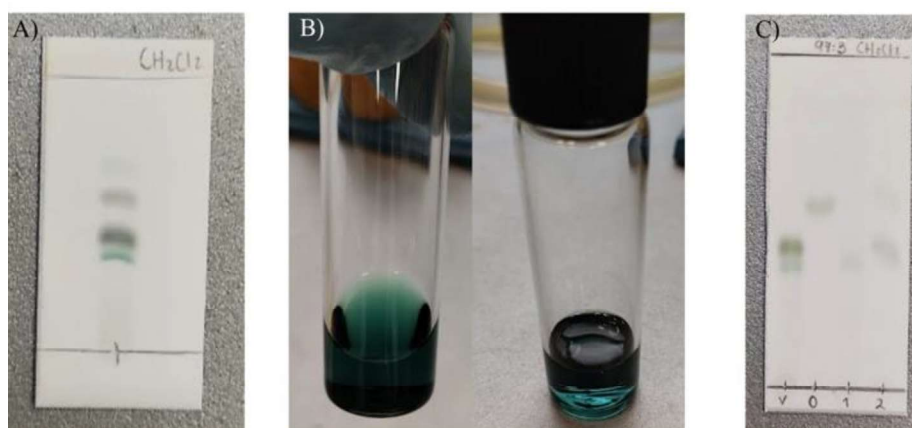
Los valores son medias  $\pm$  el error de dos experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando una prueba de ANOVA de una sola vía comparando contra el vehículo seguida de una prueba de *Dunnett*; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ ; (\*\*)  $p \leq 0.005$ .

Las fracciones que presentaron menor actividad fueron descartadas. La  $\text{IC}_{50}$  de la fracción secundaria V.A en MDA-MB-231 fue de  $86.84 \pm 11.7 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 23A**) y en MCF-7 fue de  $69.42 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 23B**).



**Figura 23.** Curva dosis-respuesta de la fracción secundaria V.A. Los valores son medias  $\pm$  el error de tres experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. El cálculo se realizó mediante una regresión no lineal. **A)** Células MDA-MB-231. **B)** Células MCF-7.

Al realizar cromatografía en capa fina de la fracción secundaria V.A usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como fase móvil, se observó la presencia de aproximadamente 4 compuestos (**Figura 24A**). Esta fracción fue disuelta en hexano y se observó que uno de los compuestos presentes comenzó a precipitar y cristalizar; esa fracción se separó mediante filtración (fracción terciaria V.A.C). El resto de las fracciones se separaron mediante cromatografía en placa preparativa, donde se obtuvieron 3 fracciones terciarias: V.A.0, V.A.1 y V.A.2; estas últimas dos presentaron coloración azul y verde, respectivamente (**Figura 24B**). Mediante capa fina se observó que las fracciones V.A.0 y V.A.1 solo mostraron una banda, mientras que V.A.2 tenía rastros de V.A.0 (**Figura 24C**). También presentaron fluorescencia a 365 nm. De la fracción V.A.0 se obtuvieron 17.6 mg con un rendimiento del 47.3%; de V.A.1 se obtuvieron 5.5 mg con un rendimiento del 14.8% y de V.A.2 se obtuvieron 11.5 mg con un rendimiento del 31%. Los rendimientos se calcularon con respecto a la fracción secundaria V.A.

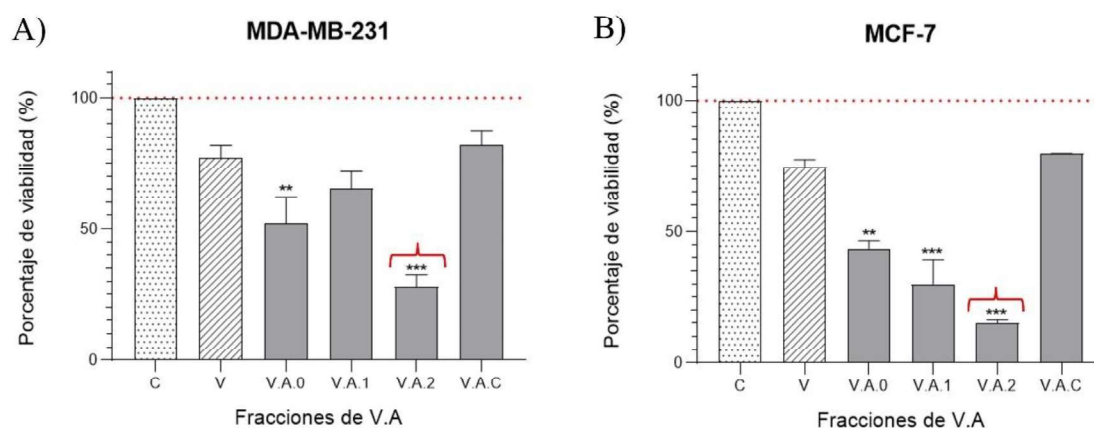


**Figura 24.** Fracciones terciarias. **A)** Cromatografía en capa fina de la fracción secundaria V.A usando como fase móvil diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). **B)** Fracciones V.A.2 y V.A.1 (de izquierda a derecha). **C)** Cromatografía en capa fina de las fracciones (izquierda a derecha) V.A.0, V.A.1 y V.A.2. V es V.A.

La fracción terciaria V.A.C no tuvo actividad en ninguna de las líneas celulares. La fracción V.A.0 tuvo un porcentaje de inhibición de viabilidad del 48% en células MDA-MB-231 y 56.47% en MCF-7. La fracción V.A.1 presentó porcentajes de 34.65% y 70.03%, respectivamente. Finalmente, V.A.2 fue la que presentó mayor actividad con un porcentaje



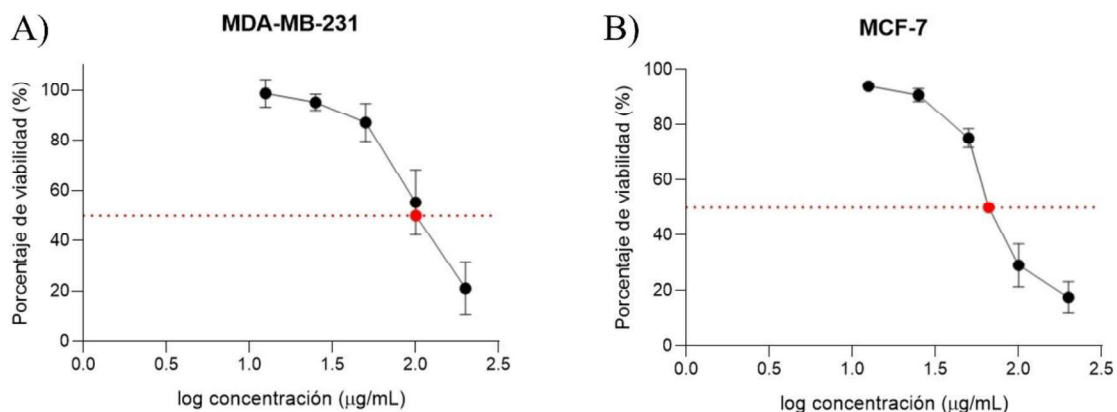
de inhibición de viabilidad en células MDA-MB-231 del 72.18% y de 84.93% en células MCF-7. Al igual que en los pasos de purificación anteriores, las células MCF-7 fueron más sensibles al tratamiento en comparación con las células MDA-MB-231 (**Figura 25**). Debido a la actividad y pureza relativa observada de la fracción terciaria V.A.2, se decidió calcular su IC<sub>50</sub> y caracterizarla.



**Figura 25.** Exploración de las fracciones terciarias a 200 µg/mL en células **A)** MDA-MB-231 y **B)** MCF-7.

Los valores son medias  $\pm$  el error de dos experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando una prueba de ANOVA de una sola vía comparando contra el vehículo seguida de una prueba de *Dunnett*; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ ; (\*\*)  $p \leq 0.005$ .

La IC<sub>50</sub> de la fracción terciaria V.A.2 en MDA-MB-231 fue de  $100.43 \pm 7.5$  µg/mL (**Figura 26A**) y en MCF-7 fue de  $66.1 \pm 4.5$  µg/mL (**Figura 26B**). En ambas líneas celulares, presentó la misma eficacia, sin embargo, fue más potente en las MCF-7.



**Figura 26.** Curva dosis-respuesta de la fracción terciaria V.A.2 en células **A)** MDA-MB-231 y **B)** MCF-7.

Los valores son medias  $\pm$  el error de cuatro experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. El cálculo se realizó mediante una regresión no lineal.

### 6.5. Comparación de las IC<sub>50</sub> de las fracciones activas

En la **Tabla 2** se muestra un resumen de los valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones activas. La fracción 17 es más potente en las células MDA-MB-231, ya que presenta un valor más bajo de IC<sub>50</sub> en comparación con las células MCF-7. Sin embargo, la fracción 17 fue más efectiva en las células MCF-7. Lo contrario pasó en la fracción secundaria V.A, que fue más potente en las células MCF-7 y más eficaz en células MDA-MB-231. Este efecto se mantuvo en la fracción terciaria V.A.2 que también fue más potente y efectiva en las células MCF-7. Se determinó que las células MCF-7 son más susceptibles a las fracciones activas, sin embargo, en ambas líneas la efectividad es similar.

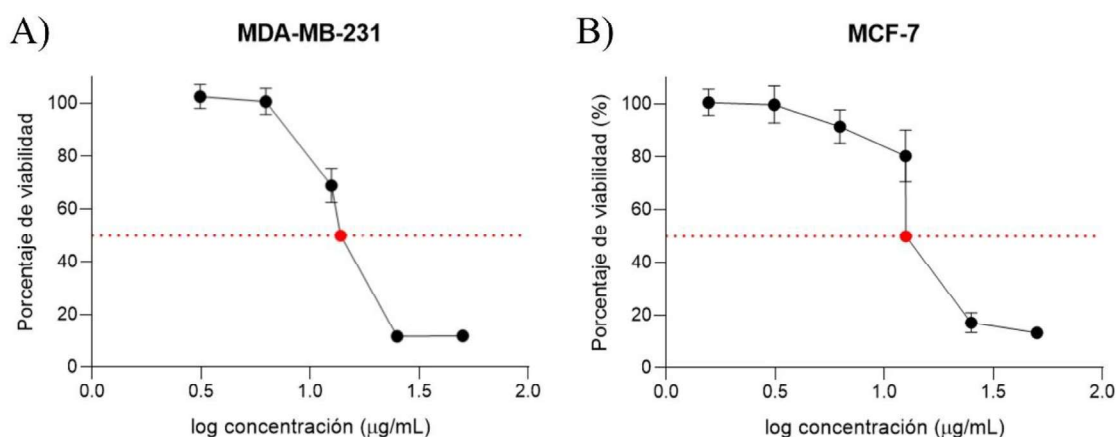
**Tabla 2.** IC<sub>50</sub> e inhibición máxima calculadas experimentalmente de las fracciones activas en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

Fracción/Compuesto	MDA-MB-231		MCF-7	
	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	Inhibición máxima (%)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	Inhibición máxima (%)
Fracción 17	87.27±2.6	73.07±2.16	104.76±6.9	82.5±2.97
Fracción V.A	86.84±11.7	85.1±0.67	69.42±1	80.97±3.74
Fracción V.A.2	100.43±7.5	72.18±10.44	66.1±4.5	84.96±2.17
Perfenazina	13.78±3.2	88.05±2.57	12.5±3.4	86.7±3.49

En ambas líneas, la perfenazina tuvo un efecto más potente que las fracciones; la efectividad en ambas líneas celulares fue similar a la de las fracciones de *P. subpeltata*. La perfenazina es un fármaco antipsicótico derivado de la fenotiazina, antagonista de receptores de dopamina y del receptor H<sub>1</sub> (90, 91). Se utilizó este fármaco como control debido a que es capaz de bloquear canales Kv11.1 (hERG) e inhibir su corriente (92). Estos canales pertenecen a la misma familia que los canales Kv10.1, de manera que tienen estructuras similares haciendo que ambos tengan afinidad por los mismos compuestos. Además, Wang y colaboradores observaron que otro fármaco perteneciente a las fenotiazinas, la clorpromazina, es capaz de unirse al dominio PAS de los canales Kv10.1 e inhibir la corriente de estos (93). Así, la perfenazina también podría regular la parte intracelular del canal Kv10.1.

Sin embargo, también se ha demostrado que los receptores H<sub>1</sub> juegan un rol importante en el cáncer de mama. En carcinomas mamarios experimentales, la histamina funciona como factor de crecimiento autocrino que al unirse al receptor H<sub>1</sub> promueve proliferación (95). La histamina también promueve invasión, migración y angiogénesis (95). Los antagonistas del receptor H<sub>1</sub> tienen efectos inhibitorios en líneas celulares de cáncer de mama. Ejemplos son la clorfenamina y la difenhidramina que reducen proliferación e inducen apoptosis en células MDA-MB-231 y MCF-7 (95). Por otro lado, los receptores de dopamina también están implicados en procesos de invasión y proliferación. Las fenotiazinas como antagonistas de receptores D2R, son capaces de inhibir viabilidad celular, inducir apoptosis y provocar el

arresto del ciclo celular (96). Otros antagonistas de D2R, el haloperidol y la pimozida reducen viabilidad celular y clonogenicidad (capacidad de células tumorales para proliferar y formar colonias) en adenocarcinoma mamario (97). Estos efectos sobre otros receptores explicarían por qué la perfenazina es más potente que las fracciones. No solamente estaría modulando la actividad del canal Kv10.1, sino también la actividad de receptores H<sub>1</sub> y receptores de dopamina, provocando un posible efecto sinérgico de potenciación que disminuya rápidamente la viabilidad de las células a bajas concentraciones. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las fracciones activas podrían no necesariamente tener efecto solamente en los canales y también podrían contener moléculas que tengan efectos en otros receptores. La IC<sub>50</sub> de la perfenazina en MDA-MB-231 fue de 13.78±3.2 µg/mL (**Figura 27A**) y en MCF-7 fue de 12.5±3.4 µg/mL (**Figura 27B**). En ambas líneas celulares, la perfenazina tuvo un efecto más potente que todas las fracciones.



**Figura 27.** Curva dosis-respuesta de la perfenazina en células **A)** MDA-MB-231 y **B)** MCF-7. Los valores son medias ± el error de tres experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. El cálculo se realizó mediante una regresión no lineal

## 6.6. Viabilidad celular en presencia de TEA-Cl

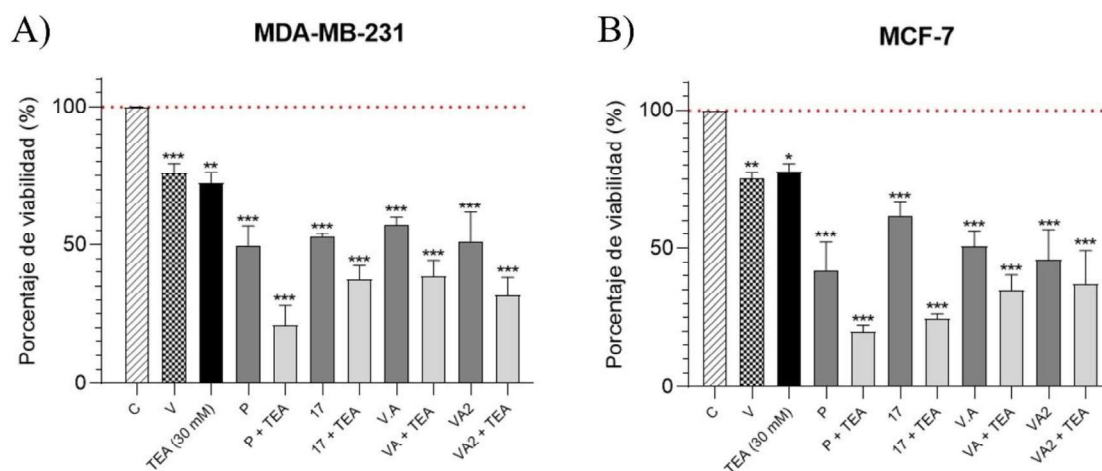
Para intentar observar un efecto más cercano al esperado en canales iónicos, se utilizó como control TEA-Cl. El TEA-Cl es una sal cuaternaria de amonio que se utiliza para bloquear

canales de  $K^+$ . Dada su naturaleza iónica, es impermeable a membranas biológicas y actúa en la parte externa de las células (98). Bloquea los canales de  $K^+$  al actuar como análogo de  $K^+$  durante la deshidratación del ion, uniéndose cerca del filtro de selectividad (99). De acuerdo con Choi y colaboradores, el TEA-Cl a una concentración 30 mM (3.29 mg/mL) bloquea la corriente de cola de los canales Kv11.1 un  $36\pm 4\%$  (100). Dado que los canales Kv11.1 son homólogos a los Kv10.1, se utilizó esa concentración.

Los resultados muestran que el TEA-Cl 30 mM inhibe un 28% la viabilidad en células MDA-MB-231 (**Figura 28A**) y 23% las células MCF-7 (**Figura 28B**). En las células MDA-MB-231, la perfenazina tuvo un porcentaje de inhibición de viabilidad de 50.26% y al probarlo en combinación con el TEA-Cl, aumentó hasta 79%. En las células MCF-7 hubo un efecto similar donde la perfenazina tuvo un porcentaje de 58% y en combinación con el TEA-Cl del 80.2%. Esto muestra un posible efecto sinérgico entre ambos. Como se mencionó previamente, la perfenazina podría regular los dominios intracelulares del canal Kv10.1; sin embargo, el efecto no es selectivo por lo que se necesitan los estudios de electrofisiología para concluir que la inhibición de la viabilidad es debido a la regulación intra y extracelular.

En la línea MDA-MB-231, la fracción 17 tuvo un porcentaje de inhibición de viabilidad del 47.3 y al agregar TEA-Cl el porcentaje fue de 78.97; la fracción V.A tuvo un porcentaje de 42.78 y 61.58 junto con el TEA-Cl. La fracción terciaria V.A.2 tuvo un porcentaje de 49.06, el cual aumentó hasta 68.38 al estar en combinación con el TEA-Cl (**Figura 28A**). En las células MCF-7, las fracciones 17 y V.A tuvieron un porcentaje de inhibición de viabilidad de 38.18 y 49.15, respectivamente; al agregar el TEA-Cl, los porcentajes fueron de 75.46 y 65.26. La fracción terciaria V.A.2 presentó un porcentaje de 54.06 y de 62.72 al agregar el compuesto junto con el TEA-Cl (**Figura 28B**). En ambas líneas celulares se observa que el tratamiento con las fracciones más el TEA-Cl reduce la viabilidad en comparación con el tratamiento solamente con las fracciones, mostrando un efecto similar al de la perfenazina. Las fracciones podrían estar regulando la actividad de los canales, sin embargo, el TEA-Cl es un bloqueador general de Kv, por lo que podría haber regulación en otros canales y no

específicamente en Kv10.1. De igual forma, las fracciones activas podrían tener algún efecto en otras vías de señalización, provocando un efecto sinérgico con el TEA-Cl. Sería necesario elucidar los compuestos presentes en las fracciones y su mecanismo de acción para poder concluir de qué forma están provocando el efecto citotóxico.



**Figura 28.** Viabilidad celular de la fracción 17, la fracción secundaria V.A y la fracción terciaria V.A.2 con y sin presencia de TEA-Cl en células A) MDA-MB-231 y B) MCF-7. Los valores son medias  $\pm$  el error de tres experimentos independientes. Cada medición se realizó por cuadruplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando una prueba de ANOVA de una sola vía comparando contra el vehículo seguida de una prueba de *Dunnett*; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ . C: control.

### 6.7. Análisis fitoquímico cualitativo de las fracciones activas de la fracción CH<sub>3</sub>CN de tallos de *P. subpeltata*

Mediante el uso de diferentes reveladores químicos se realizó un análisis cualitativo de los posibles compuestos presentes en cada fracción o los grupos funcionales presentes en los compuestos (**Tabla 3**). Solamente las fracciones terciarias no revelaron con yodo (Y), el cual indica la presencia de compuestos insaturados o compuestos aromáticos (101). Prácticamente todos revelaron con ácido fosfomolibdico (AF), revelador que indica la presencia de ácidos grasos insaturados y compuestos con carbonilos (102). El extracto de metanol, las fracciones de la primera extracción líquido-líquido de flujo continuo, la fracción de CH<sub>3</sub>CN, la fracción

17 y la fracción terciaria V.A.2 revelaron con  $\text{FeCl}_3$ , compuesto que reacciona con fenoles (103). Ninguno reveló con verde de bromocresol, indicando la ausencia de ácidos carboxílicos (104). Solamente el extracto de metanol y las fracciones obtenidas durante el proceso de extracción revelaron con ninhidrina (NH), que indica la presencia de aminoácidos o aminas en los extractos (102). El extracto y las fracciones 14 a 19 dieron un resultado positivo para el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), el cual también indica la presencia de fenoles (104). Todos revelaron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 20% (104). Todos excepto la fracción de metanol revelaron con vainillina (V), indicando la presencia de alcoholes o fenoles (104). Finalmente, ninguno reveló con el reactivo de Dragendorff (D), de manera que no hay alcaloides (102). Con estos resultados se puede determinar que la fracción terciaria V.A.2 contiene moléculas como ácidos grasos y compuestos con grupos funcionales como alcoholes, fenoles, aminas, grupos sensibles a oxidación y carbonilos.

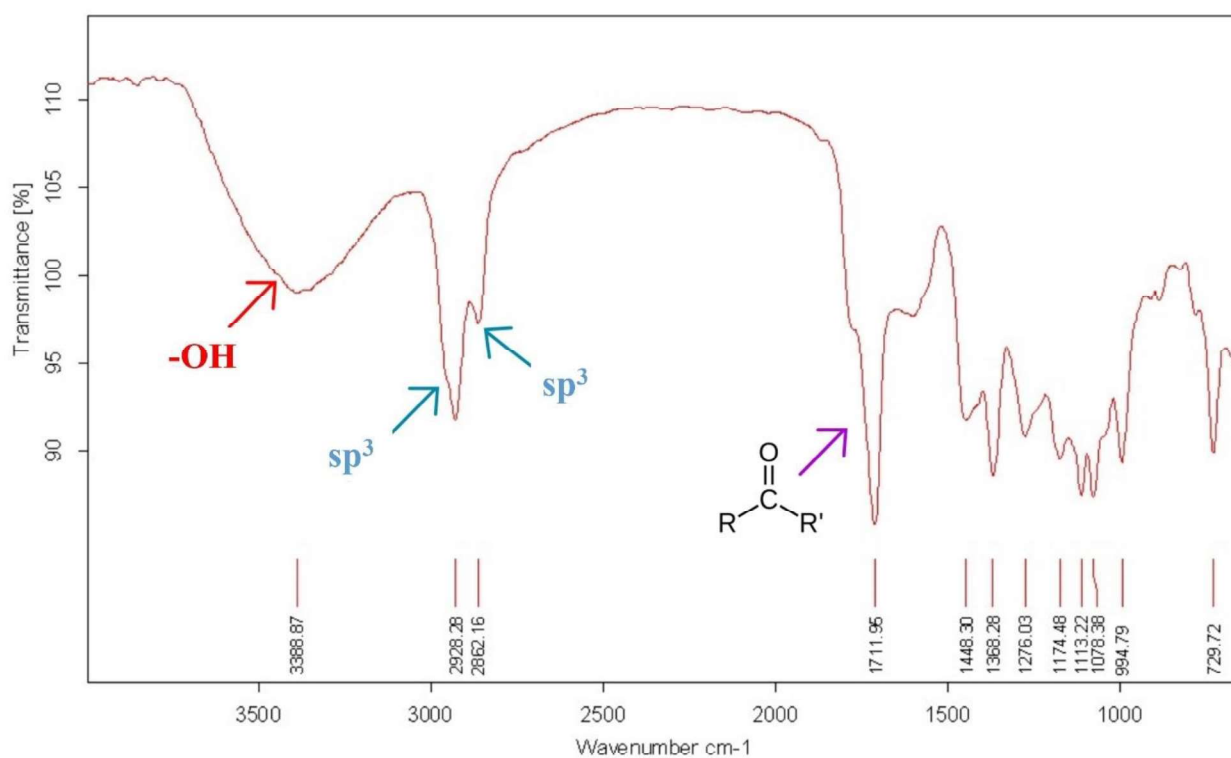
**Tabla 3.** Análisis cualitativo mediante cromatografía de capa fina de las fracciones activas, utilizando diferentes reveladores químicos.

		Y	AF	$\text{FeCl}_3$	VB	NH	FC	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 20%	V	D
Extracto y fracciones del proceso de extracción	Extracto metanol	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗
	Fracción metanol <sup>a</sup>	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗
	Fracción hexano <sup>a</sup>	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗
	Fracción hexano <sup>b</sup>	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✗
	Fracción $\text{CH}_3\text{CN}$ <sup>b</sup>	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✗
Fracciones de cromatografía	Fracción 14	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗
	Fracción 15	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗
	Fracción 16	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗
	Fracción 17	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✗
	Fracción 19	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗
Fracciones terciarias	V.A.0	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗
	V.A.1	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗
	V.A.2	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✗

a: extracción líquido-líquido de flujo continuo hexano/metanol; b: extracción líquido-líquido de flujo continuo hexano/ $\text{CH}_3\text{CN}$ .

## 6.8. Espectroscopía de FT-IR

La espectroscopía de infrarrojo permitió identificar los grupos funcionales presentes en las moléculas activas analizando las vibraciones características de los enlaces covalentes presentes en ella. En el espectro de la fracción terciaria V.A.2 se observa una señal ancha y fuerte de un alcohol en  $3388.87\text{ cm}^{-1}$ ; dos señales de carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  entre  $2800$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$ ; y una señal intensa de un carbonilo de cetona en  $1711.95\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 29**). No se observaron sobretonos característicos de anillos aromáticos.

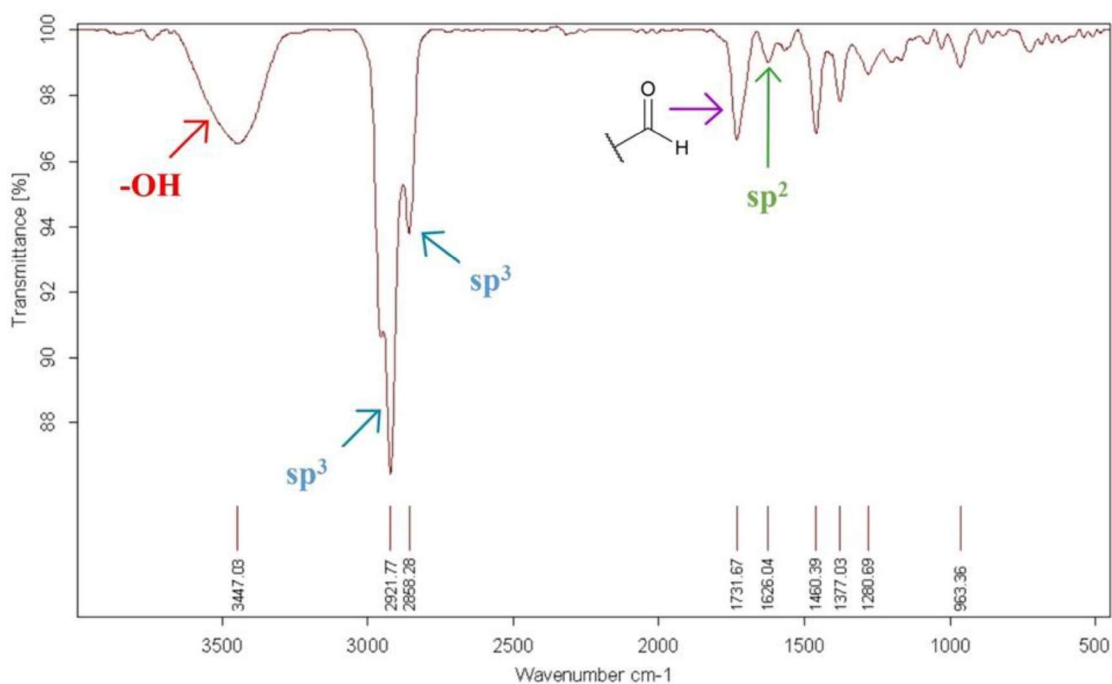


**Figura 29.** Espectro de infrarrojo de la fracción terciaria V.A.2, obtenido mediante ATR

Analizando la fracción terciaria V.A.2, se observó que contenía una impureza proveniente de los disolventes utilizados en la extracción. Después de que se purificó la muestra utilizando disolventes destilados, se obtuvo otro espectro de infrarrojo con KBr. En el espectro se observa una señal ancha y fuerte de alcohol en  $3447.03\text{ cm}^{-1}$ ; dos señales de carbonos con



hibridación  $sp^3$  en 2921 y 2858  $cm^{-1}$ . Cerca de la señal de 2858  $cm^{-1}$  se observa una banda de mediana intensidad que podría corresponder a la absorción C-H del grupo aldehído (105). La señal del carbonilo intensa se perdió y se ve una señal débil en 1731.67  $cm^{-1}$ , la cual podría ser de una cetona o un aldehído. Al igual que en los otros espectros, no hay señales de sobretonos de anillos aromáticos; esto es interesante porque en los resultados de RMN  $^1H$ , se observan posibles señales de carbonos aromáticos alrededor de 7 ppm. Comparando con los resultados de RMN  $^1H$ , la banda en 1731  $cm^{-1}$  podría pertenecer a un carbonilo de aldehído ya que se observa una señal aproximadamente en 9.5 ppm, a pesar de que en el IR la señal es débil podría corresponder. La señal pequeña aproximadamente en 1626  $cm^{-1}$  podría indicar la presencia de carbonos  $sp^2$  (**Figura 30**).



**Figura 30.** Espectro de FT-IR de la fracción terciaria V.A.2, obtenido con KBr.

## 6.9. Resonancia magnética nuclear de $^1H$

Este tipo de técnica indica el tipo y número de hidrógenos presentes en una molécula. Los valores de desplazamiento químico brindan información del entorno químico de los núcleos, de manera que se puede correlacionar con los grupos funcionales. En el espectro de RMN de

<sup>1</sup>H se observó que la fracción terciaria V.A.2 es una mezcla de diferentes compuestos, a pesar de verse solo uno en la cromatografía de capa fina (**Figura 31**). En 9.39 y 9.52 ppm se observan dos señales que podrían ser atribuidas a aldehídos. Se observan señales de un posible protón correspondiente a un anillo aromático disustituido en para entre 7.53 y 7.69 ppm. Las señales entre 6.17 y 6.27 ppm podrían deberse a un sistema alílico o vinílico. Las señales entre 5.1 y 5.3 ppm podrían indicar la presencia de un -CH<sub>2</sub> con hidrógenos diastereotópicos. Entre 3 y 4.5 ppm hay varias señales de las cuales alguna podría indicar la presencia de grupos metilenos unidos a grupos hidroxilo o aminas. Finalmente, entre 0.8 y 2.5 ppm hay una gran cantidad de señales pertenecientes a carbonos saturados. Dentro de estas señales podría haber algunas que correspondan a algún residuo que haya quedado de la impureza de los disolventes. Las señales de algunos grupos funcionales concuerdan con las observadas en el espectro de infrarrojo.

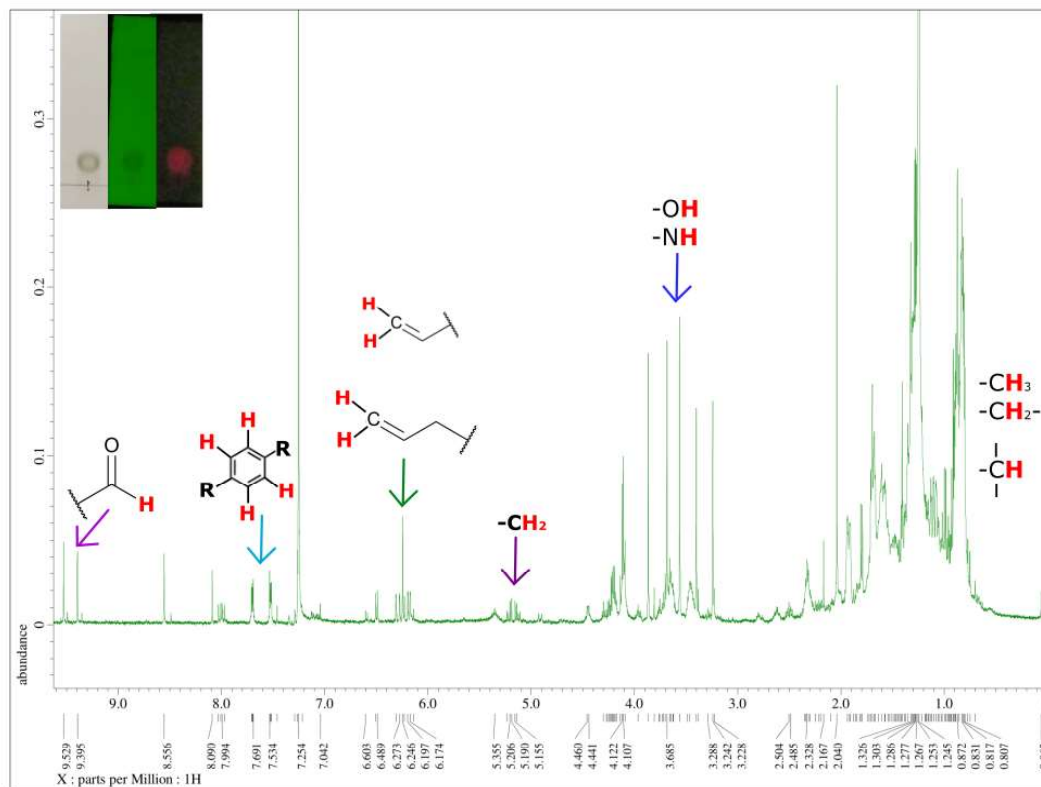


Figura 31. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción terciaria V.A.2, en  $\text{CDCl}_3$ .

## 7. CONCLUSIONES

Se optimizó el tiempo y recursos en la obtención de la fracción activa de CH<sub>3</sub>CN a partir del extracto metanólico de *P. subpeltata*. El método de extracción se redujo de 3 meses a una semana.

La fracción de CH<sub>3</sub>CN contiene moléculas con actividad antioxidante, sin embargo, no es alta en comparación con el ácido ascórbico. Esta actividad posiblemente sea atribuida a la presencia de isoprenoides.

Se determinó que la fracción de CH<sub>3</sub>CN contiene compuestos fenólicos mediante la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu, los cuales son responsables de la actividad antioxidante.

Con el ensayo biodirigido se logró identificar una fracción terciaria (V.A.2) con una actividad citotóxica alta. El método de purificación de esa fracción se estandarizó, disminuyendo tiempo y recursos.

En ambas líneas celulares, la fracción terciaria V.A.2 presentó la mayor disminución de viabilidad celular. Esta fracción fue más efectiva y potente en las células MCF-7 en comparación con las MDA-MB-231. La perfenazina presentó mayor potencia en comparación con las fracciones activas. Esto puede ser debido a que la molécula está pura y ejerce efectos citotóxicos en otros receptores celulares. Tomando esto en cuenta y que la fracción V.A.2 es una mezcla de diferentes compuestos, necesariamente podría tener un efecto solamente en canales, sino que podría activar otras vías de señalización.

Utilizando el bloqueador de Kv, TEA-Cl en un ensayo de viabilidad se observó que el tratamiento combinado con las fracciones activas, comprometen más la viabilidad de las células en comparación con el tratamiento solo con las fracciones. Esto probablemente se deba a que algún compuesto en las fracciones posiblemente interactúe con algún canal Kv (no necesariamente Kv10.1). Sin embargo, se necesitarían estudios de *Patch Clamp* para corroborarlo.

El análisis fitoquímico y la caracterización espectroscópica permitió identificar que dentro de la fracción terciaria hay presencia de ácidos grasos, compuestos con carbonilos, fenoles, alcoholes, grupos susceptibles a oxidación y posiblemente aminas; así como la ausencia de ácidos carboxílicos, aminoácidos y alcaloides. Tomando en cuenta la polaridad de los disolventes utilizados para la purificación de la fracción V.A.2, probablemente contenga isoprenoides como carotenoides.

Se cumplieron los objetivos establecidos, sin embargo, no se logró la caracterización estructural de los componentes que conformaron la fracción activa, pero se identificó y optimizó la extracción y purificación de los componentes activos. Cabe mencionar que este es uno de los primeros trabajos que relaciona los metabolitos pertenecientes al género *Passiflora* con actividad anticancerígena y a los canales iónicos como posibles blancos farmacológicos para el tratamiento de esta afección.

## **8. PERSPECTIVAS**

Es necesario hacer otros estudios para cotejar los resultados obtenidos en este trabajo. En cuanto a la actividad antioxidante, será necesario probar la fracción de CH<sub>3</sub>CN a concentraciones más altas (entre 10 y 120 mg/mL) para poder observar mejor el efecto de reducción del DPPH. Este experimento junto con la determinación del contenido fenólico total también se podría realizar con las fracciones y subfracciones activas.

Las fracciones poseen actividad de inhibición de viabilidad en células de cáncer de mama de dos tipos diferentes (triple negativo y luminal A); sin embargo, es necesario realizar estudios de viabilidad en una línea celular de mama que no sea tumoral, como MCF10A y determinar el efecto citotóxico en células no tumorales.

Tomando en cuenta que los canales Kv relacionados con cáncer se expresan en otros tipos como hígado, retinoblastoma, leucemia mieloide aguda (106), cervical, colon, pulmón, próstata y glioblastoma; también se podrían probar las fracciones en otras líneas celulares de otros tipos de cáncer (47).

El ensayo con el TEA-Cl se podría realizar en otras líneas celulares de mama que no tengan una sobreexpresión de Kv10.1, como MCF10A (107), HMEC o hTERT (52). Si el mecanismo fuera mediante la regulación de estos canales, el tratamiento con TEA-Cl y la fracción terciaria activa no tendría efecto o tendría un efecto menor en estas células en comparación con las MCF-7 y MDA-MB-231 que tienen mayor expresión del canal.

En cuanto a los canales, es necesario hacer experimentos de *Patch Clamp* para comprobar que el efecto citotóxico esté relacionado con la modulación de la corriente de canales Kv y en particular Kv10.1. Con estos ensayos se podría ver si las subfracciones tienen algún efecto regulatorio en la cinética de apertura o de cierre del canal.

Mediante citometría de flujo o fluorescencia utilizando anexina V y yoduro de propidio, se podría determinar si las células entran en apoptosis, necrosis o si se mantienen en un estado senescente. Este último se podría medir con una tinción para  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 (108). Otras opciones para medir apoptosis podrían ser utilizar un kit de ELISA para cuantificar bromodesoxiuridina o un ensayo para observar la fragmentación del ADN en un gel de agarosa (109).

En la parte de caracterización, sería ideal realizar un análisis mediante HPLC para determinar cuántos compuestos conforman la fracción terciaria V.A.2. También se podría analizar la fracción activa mediante cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas, para poder identificar los metabolitos que conforman mezcla de compuestos.

## 9. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]. 2022. [Consultado 29 Sep 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, *et al.* Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):21087.
3. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 2021;9:205031212110343
4. Sung H, Ferlay F, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
5. Organización Mundial de la Salud. Mexico [Internet]. 2020. [Consultado 5 Oct 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>
6. Nounou MI, El Amrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9:17.
7. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(12):3855–64.
8. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers.* 2021;13(17).
9. Ko JH, Ko EA, Gu W, Lim I, Bang H, Zhou T. Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Mol Cancer.* 2013;12(1):1–17.
10. Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018;13(3):339.
11. Iyer R, Ring A. Breast cancer survivorship: key issues and priorities of care. *Br J Gen Pract.* 2017;67(656):140.
12. Nakamura H, Maeda H. Cancer Chemotherapy. *Fundam Pharm Nanosci.* 2022;401–27.

13. Majeed H, Gupta V. Adverse Effects of Radiation Therapy. StatPearls [Internet]. 2021. [Consultado 5 Oct 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563259/>
14. Newhauser WD, Gonzalez AB de, Schulte R, Lee C. A Review of Radiotherapy-Induced Late Effects Research after Advanced Technology Treatments. *Front Oncol*. 2016;6:1.
15. Senkus-Konefka E, Jassem J. Complications of breast-cancer radiotherapy. *Clin Oncol*. 2006;18(3):229–35.
16. Lacouture M, Sibaud V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19:31.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
18. Alberts B, Johnson AD, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 6ta ed. Garland Science; 2015.
19. Thu KL, Soria-Bretones I, Mak TW, Cescon DW. Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase. *Cell Cycle*. 2018;17(15):1871-1885.
20. Yang M, Brackenbury WJ. Membrane potential and cancer progression. *Front Physiol*. 2013;4.
21. Cone CD. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J Theor Biol*. 1971;30(1):151–81.
22. Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: Ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle*. 2009;8(21):3519.
23. Brüggemann A, Stühmer W, Pardo LA. Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(2):537–42.
24. Warren EAK, Payne CK. Cellular binding of nanoparticles disrupts the membrane potential. *RSC Adv*. 2015 Jan;5(18):13660–6.
25. Marino AA, Morris DM, Schwalke MA, Iliev IG, Rogers S. Electrical potential measurements in human breast cancer and benign lesions. *Tumour Biol*. 1994;15(3):147–52.



26. Binggeli R, Weinstein RC. Membrane Potentials and Sodium Channels: Hypotheses for Growth Regulation and Cancer Formation Based on changes in Sodium Channels and Gap Junctions. *J theor Biol.* 1986;123: 377-401
27. Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends Cell Biol.* 207;17(6): 261-271
28. Lobikin M, Chernet B, Lobo D, Levin M. Resting Potential, Oncogene-induced Tumorigenesis, and Metastasis: The Bioelectric Basis of Cancer in vivo. *Phys Biol.* 2012;9(6):065002.
29. Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A. K<sup>+</sup> channels and cell cycle progression in tumor cells. *Front Physiol.* 2013;4:220.
30. Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol.* 2005;205(3):115-124.
31. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1638):20130094.
32. Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol.* 2014;206(2):151.
33. Huang X, Dubuc AM, Hashizume R, Berg J, He Y, Wang J, et al. Voltage-gated potassium channel EAG2 controls mitotic entry and tumor growth in medulloblastoma via regulating cell volume dynamics. *Genes Dev.* 2012;26(16):1780–96.
34. Rubaiy HN. A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels. *J Pharm Pharm Sci.* 2017;20(1):48–67.
35. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):473–508.
36. Bachmann M, Li W, Edwards MJ, Ahmad SA, Patel S, Szabo I, et al. Voltage-Gated Potassium Channels as Regulators of Cell Death. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:1571.
37. Coddling SJ, Johnson AA, Trudeau MC. Gating and regulation of KCNH (ERG, EAG, and ELK) channels by intracellular domains. *Channels.* 2020;14(1):294.
38. Robertson GA, Warmke JW, Ganetzky B. Potassium currents expressed from Drosophila and mouse eag cDNAs in Xenopus oocytes. *Neuropharmacology.*

1996;35(7):841–50.

39. Ludwig J, Weseloh R, Karschin C, Liu Q, Netzer R, Engeland B, *et al.* Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-à-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol Cell Neurosci.* 2000;16(1):59–70.
40. Liu JH, Bijlenga P, Fischer-Lougheed J, Occhiodoro T, Kaelin A, Bader CR, *et al.* Role of an inward rectifier K<sup>+</sup> current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J Physiol.* 1998;510:467.
41. Camacho J. Ether à go-go potassium channels and cancer. *Cancer Lett.* 2006;233(1):1–9.
42. Han B, Tokay T, Zhang G, Sun P, Hou S. Eag1 K<sup>+</sup> Channel: Endogenous Regulation and Functions in Nervous System. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7371010.
43. Barriga-Montoya C, Huanosta-Gutiérrez A, Reyes-Vaca A, Hernández-Cruz A, Picones A, Gómez-Lagunas F. Correction to: Inhibition of the K(+) conductance and Cole-Moore shift of the oncogenic Kv10.1 channel by amiodarone. *Pflugers Archiv.* 2018;470(6):981–93.
44. Pardo LA, Sühmer W. Eag1 as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(7):837–43.
45. Pardo LA, Del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, *et al.* Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *EMBO J.* 1999;18(20):5540–7.
46. Urrego D, Sánchez A, Tomczak AP, Pardo LA. The electric fence to cell-cycle progression: Do local changes in membrane potential facilitate disassembly of the primary cilium?: Timely and localized expression of a potassium channel may set the conditions that allow retraction of the primary cilium. *Bioessays.* 2017;39(6).
47. Luis E, Anaya-Hernández A, León-Sánchez P, Durán-Pastén ML. The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15).
48. Tang A, Gao K, Chu L, Zhang R, Yang J, Zheng J. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. *Oncotarget.* 2017;8(14):23937.
49. Badaoui M, Mimsy-Julienne C, Saby C, Van Gulick L, Peretti M, Jeannesson P, *et al.* Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orail calcium channels through DDR1-dependent pathway.

*Oncotarget*. 2018;9(37):24653

50. Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C, et al. Eag1 Expression Interferes with Hypoxia Homeostasis and Induces Angiogenesis in Tumors. *J Biol Chem*. 2008;283(52):36234.
51. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11).
52. Hammadi M, Chopin V, Matifat F, Dhennin-Duthille I, Chasseraud M, Sevestre H, et al. Human ether à-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orail-dependent calcium entry. *J Cell Physiol*. 2012;227(12):3837–46.
53. Ziechner U, Schönherr R, Born AK, Gavrilova-Ruch O, Glaser RW, Malesevic M, et al. Inhibition of human ether à go-go potassium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binding to the cytosolic N- and C-termini. *FEBS J*. 2006;273(5):1074–86.
54. Piros ET, Shen L, Huang XY. Purification of an EH domain-binding protein from rat brain that modulates the gating of the rat ether-à-go-go channel. *J Biol Chem*. 1999;274(47):33677–83.
55. Carlson AE, Brelidze TI, Zagotta WN. Flavonoid regulation of EAG1 channels. *J Gen Physiol*. 2013;141(3):347–58.
56. Ramaiya SD, Bujang JS, Zakaria MH. Genetic diversity in Passiflora species assessed by morphological and ITS sequence analysis. *Sci World J*. 2014;2014.
57. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. Passiflora: a review update. *J Ethnopharmacol*. 2004;94(1):1–23.
58. Patel S, Soni H, Mishra K, Singhai A. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. *Int J Res Phytochem Pharmacol*. 2011;1.
59. Hernández F. Historia de las plantas de la Nueva España [Internet]. Imprenta Universitaria México; 1943. [Consultado 15 Oct 2022] Disponible en: [http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaspana/pdf/historia\\_de\\_las\\_plantas\\_II\\_4\\_3.pdf](http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaspana/pdf/historia_de_las_plantas_II_4_3.pdf)
60. Fonseca LR da, Rodrigues R de A, Ramos A de S, Cruz JD da, Ferreira JLP, Silva JR de A, et al. Herbal Medicinal Products from Passiflora for Anxiety: An Unexploited

Potential. *Sci World J.* 2020;2020.

61. Janda K, Wojtkowska K, Jakubczyk K, Antoniewicz J, Skonieczna-Żydecka K. *Passiflora incarnata* in Neuropsychiatric Disorders—A Systematic Review. *Nutrients.* 2020;12(12):1–17.
62. Yuan TZ, Kao CL, Li WJ, Li HT, Chen CY. Chemical Constituents of Leaves of *Passiflora edulis*. *Chem Nat Compd.* 2017;53(6):1165–6.
63. da Silva ICV, Kaluđerović GN, de Oliveira PF, Guimarães DO, Quaresma CH, Porzel A, *et al.* Apoptosis Caused by Triterpenes and Phytosterols and Antioxidant Activity of an Enriched Flavonoid Extract from *Passiflora mucronata*. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018;18(10):1405–16.
64. Liskova A, Koklesova L, Samec M, Smejkal K, Samuel SM, Varghese E, *et al.* Flavonoids in Cancer Metastasis. *Cancers.* 2020;12(6):1–29.
65. Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans.* 1996;24(3):785–9.
66. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients.* 2020;12(2).
67. Talebi M, Talebi M, Farkhondeh T, Simal-Gandara J, Kopustinskiene DM, Bernatoniene J, *et al.* Emerging cellular and molecular mechanisms underlying anticancer indications of chrysin. *Cancer Cell Int 2021 211.* 2021;21(1):1–20.
68. Khoo BY, Chua SL, Balam P. Apoptotic Effects of Chrysin in Human Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2010;11(5):2188.
69. Jiang M, Zhu M, Wang L, Yu S. Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomed Pharmacother.* 2019;120:109506
70. Cook MT. Mechanism of metastasis suppression by luteolin in breast cancer. *Breast Cancer (London).* 2018;10:89.
71. Sun DW, Zhang H Da, Mao L, Mao CF, Chen W, Cui M, *et al.* Luteolin Inhibits Breast Cancer Development and Progression In Vitro and In Vivo by Suppressing Notch Signaling and Regulating MiRNAs. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(5):1693–711.
72. Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, *et al.* Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108612.

73. Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, Gondal TA, Saeed F, Imran A, *et al.* Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules*. 2019;24(12).
74. Choi EJ, Ahn WS. Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutr Res Pract*. 2008;2(4):322.
75. Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother*. 2020;121:109604.
76. He X, Luan F, Yang Y, Wang Z, Zhao Z, Fang J, *et al.* *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Front Pharmacol*. 2020;11.
77. Orning P, Lien E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2021;109(1):121.
78. Saravanan S, Arunachalam K, Parimelazhagan T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. *Ind Crops Prod*. 2014;54:272–80.
79. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. *Passiflora subpeltata* - ficha informativa [Internet]. [Consultado 11 May 2023]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/passifloraceae/passiflora-subpeltata/fichas/ficha.htm>
80. Thamkaew G, Sjöholm I, Gómez Galindo F. A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021;61(11); 1763-1786.
81. Nithya P, Madhavi C. Antioxidant activity of 3-arylidene-4-piperidones in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging assay. *J Taibah Univ Sci*. 2017;11(1):40–5.
82. Kamtekar S, Keer V, Patil V. Estimation of Phenolic content, Flavonoid content, Antioxidant and Alpha amylase Inhibitory Activity of Marketed Polyherbal Formulation. *J Appl Pharm Sci*. 2014;4(09):61–065.
83. Al-Zharani M, Nasr FA, Abutaha N, Alqahtani AS, Noman OM, Mubarak M, *et al.* Apoptotic Induction and Anti-Migratory Effects of *Rhazya stricta* Fruit Extracts on a Human Breast Cancer Cell Line. *Molecules*. 2019;24(21).
84. Lee JJ, Yazan LS, Kassim NK, Abdullah CAC, Esa N, Lim PC, *et al.* Cytotoxic Activity of *Christia vespertilionis* Root and Leaf Extracts and Fractions against Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2020;25(11).

85. Contreras-Guzmán ES, Strong FC. Determination of Tocopherols (Vitamin E) by Reduction of Cupric Ion. *JAOAC Int.* 1982;65(5):1215–21.
86. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48(4):412.
87. Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Ruser A, Hansen UP. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors (Basel).* 2007;7(10):2080.
88. Hassan M, Bala SZ, Bashir M, Waziri PM, Musa Adam R, Umar MA, *et al.* LC-MS and GC-MS Profiling of Different Fractions of *Ficus platyphylla* Stem Bark Ethanolic Extract. *J Anal Methods Chem.* 2022;2022.
89. Sun X, Jia P, Bu T, Zhang H, Dong M, Wang J, *et al.* Conversional fluorescent kiwi peel phenolic extracts: Sensing of Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, imaging of HeLa cells and their antioxidant activity. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2021;244:118857.
90. Ozdemir E, Bagcivan I, Gursoy S. Role of D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> dopamin receptors antagonist perphenazine in morphine analgesia and tolerance in rats. *Bosn J basic Med Sci.* 2013;13(2):119–25.
91. Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, *et al.* H<sub>1</sub>-Histamine Receptor Affinity Predicts Short-Term Weight Gain for Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(3):519–26.
92. Kim K-S, Kim E-J. The phenothiazine drugs inhibit hERG potassium channels. *Drug Chem Toxicol.* 2005;28(3):303–13.
93. Wang Z-J, Soohoo SM, Tiwari PB, Piszczek G, Brelidze TI. Chlorpromazine binding to the PAS domains uncovers the effect of ligand modulation on EAG channel activity. *J Biol Chem.* 2020;295(13):4114–23.
94. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2010;161(4):755–67.
95. Nguyen PL, Cho J. Pathophysiological Roles of Histamine Receptors in Cancer Progression: Implications and Perspectives as Potential Molecular Targets. *Biomolecules.* 2021;11(8).
96. Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, Hohl RJ. Cancer and the Dopamine D(2)

- Receptor: A Pharmacological Perspective. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370(1):111–26.
97. Rosas-Cruz A, Salinas-Jazmín N, Velázquez MAV. Dopamine Receptors in Cancer: Are They Valid Therapeutic Targets? *Technol Cancer Res Treat.* 2021;20.
  98. Furman B. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2018. Tetraethylammonium.
  99. Lenaeus MJ, Vamvouka M, Focia PJ, Gross A. Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(5):454–9.
  100. Choi KH, Song C, Shin D, Park S. hERG channel blockade by externally applied quaternary ammonium derivatives. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2011;1808(6):1560–6.
  101. Kerr E, West C, Kradtap Hartwell S. Quantitative TLC-Image Analysis of Urinary Creatinine Using Iodine Staining and RGB Values. *J Chromatogr Sci.* 2016;54(4):639.
  102. Flores-Morales V, Castañeda Hernández O, Montiel Santillán T, Patricia G, Delgadillo H, Morales V, *et al.* Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investig y Cienc la Univ Autónoma Aguascalientes.* 2014;63(63):18–23.
  103. Jeremiah C, Katsayal UA, Nuhu A, Anafi SB, Ibrahim MA, Nuhu HD. Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Studies of *Tapinanthus globiferus* (A. Rich) Teigh. Leaves Three Extracts. *Pharm Sci.* 2019;25(2):124–31.
  104. College of Chemistry University of California Berkeley. Dyeing Reagents for Thin-Layer and Paper Chromatography [Internet]. [Consultado 22 Oct 2022]. Disponible en: <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.cchem.berkeley.edu/rsgrp/TLCStainGeneralReference.pdf>
  105. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7a ed. *John Wiley & Sons.* 2005.
  106. Li M, Tian P, Zhao Q, Ma X, Zhang Y. Potassium channels: Novel targets for tumor diagnosis and chemoresistance. *Front Oncol.* 2023;12:1074469.
  107. Boldrini-França J, Pinheiro-Junior EL, Peigneur S, Pucca MB, Cerni FA, Borges RJ, *et al.* Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. *Sci Rep.* 2020;10(1):4476.

108. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung, Kimberly Goodwin EC, Kleijer WJ, *et al.* Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187–95.
109. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*. 2017;22(2):306–23.



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo “Aislamiento biodirigido y caracterización química de los metabolitos secundarios de la partición de acetonitrilo de tallos de *Passiflora subpeltata* responsables de la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas de mama humano” (experimental) fue realizado del mes de agosto del 2021 al mes de agosto del 2023 en el Laboratorio de Química, Farmacia Molecular y Materiales de la DCNI.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 30 del mes de octubre del año 2023, el (la) que suscribe Andrea Rodríguez Zamora alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; “Aislamiento biodirigido y caracterización química de los metabolitos secundarios de la partición de acetonitrilo de tallos de *Passiflora subpeltata* responsables de la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas de mama humano” realizada bajo la dirección del Dr. Ernesto Rivera Becerril y la Dra. Erika Iris Puente Guzmán, cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del (la) director (a) del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [erneztorb@gmail.com](mailto:erneztorb@gmail.com) o [puentegu@gmail.com](mailto:puentegu@gmail.com)

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



---

Andrea Rodríguez Zamora

Nombre y firma del alumno

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Andrea Rodríguez Zamora alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



Andrea Rodríguez Zamora

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Andrea Rodríguez Zamora alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Andrea Rodríguez Zamora.



Andrea Rodríguez Zamora

Nombre y firma del alumno