

Sapogeninas de *Chenopodium quinoa* Willd como activadores potenciales de AMPK β 2 para la homeostasis independiente de insulina

Sapogenins from *Chenopodium quinoa* Willd as potential activators of AMPK β 2 for insulin-independent glucose homeostasis

Brenda Gisela Martínez- Oliva^{1a}, Dayana Pamela Bello- Kopa^{2b}, Ricardo Enrique Grados-Torrez^{2c}

Resumen

La isoforma AMPK β 2 (proteína quinasa activada por AMP) favorece la homeostasis glucémica a través de un mecanismo independiente de insulina. Muchos "importadores" de glucosa como SC4 actúan como activadores de AMPK, pero su consumo prolongado se asocia a efectos indeseables. **Objetivo:** en este trabajo se utilizó el acoplamiento molecular para analizar la posible interacción entre sapogeninas y AMPK. **Métodos:** se ha procedido a la preparación de los blancos proteicos, preparación de los ligandos y el acoplamiento molecular. **Resultados:** los resultados mostraron que ocho sapogeninas presentes en *Chenopodium quinoa* interactúan en el mismo sitio de unión que SC4 correspondiente al sitio ADaM de AMPK. Estas interacciones puntuaron valores de ΔG que oscilan entre -6,2 y -7,7 kcal/mol, siendo el ácido serjánico la sapogenina con el ΔG más bajo. La adición de grupos hidrofílicos como -OH y -COOH en la estructura química del ácido serjánico mejoró su afinidad de unión a la isoforma AMPK β 2 abriendo la posibilidad de generar fármacos semi-sintéticos a partir de compuestos naturales con mayor actividad biológica y mejor especificidad.

Palabras clave: sapogeninas, *Chenopodium quinoa*, proteína quinasa activada por AMP, cinasas, insulina.

Abstract

The AMPK β 2 (AMP-activated protein kinase) isoform promotes glycemic homeostasis through an insulin-independent mechanism. Many glucose "importers" such as SC4 act as AMPK activators, but their prolonged consumption is associated with undesirable effects. **Objective:** in this work, molecular docking was used to analyze the possible interaction between sapogenins and AMPK. **Methods:** the preparation of the protein blanks, preparation of the ligands and molecular coupling have been carried out. **Results:** the results showed that eight sapogenins present in *Chenopodium quinoa* interact at the same binding site as SC4 corresponding to the ADaM site of AMPK. These interactions scored ΔG values ranging from -6.2 to -7.7 kcal/mol, with Serjanic acid being the sapogenin with the lowest ΔG . The addition of hydrophilic groups such as -OH and -COOH in the chemical structure of Serjanic acid improved its binding affinity to the AMPK β 2 isoform opening the possibility of generating semi-synthetic drugs from natural compounds with higher biological activity and better specificity.

Keywords: sapogenins, *chenopodium quinoa*, AMP-activated protein kinase kinases, insulin.

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad progresiva caracterizada, en su etapa temprana, por la disfunción de células β pancreáticas y la resistencia a la insulina en distintos grados. Muchos "secretagogos" insulínicos como las sulfonilureas son empleados como tratamiento convencional para estimular la secreción de insulina en el resto de células β funcionales y así, compensar el déficit de producción de insulina en pacientes con DM2¹⁻³. Sin embargo, el tratamiento prolongado con sulfonilureas está relacionado con cardiotoxicidad, hipoglucemia, desensibilización, apoptosis y agotamiento de células β . Estas complicaciones,

ponen en evidencia la necesidad de promover el desarrollo de otras terapias con mecanismos de acción alternativos. Además, el mantenimiento de homeostasis de glucosa en pacientes con DM2 requiere a la larga de una terapia más combinada.

Estudios indican que el músculo esquelético consume más del 70% de la glucosa sanguínea, este proceso está favorecido por el ejercicio físico y se encuentra notablemente afectado en pacientes diabéticos. Por tanto, el músculo esquelético juega un rol preponderante en la regulación de la glucemia dando lugar, con base en estas evidencias, a una estrategia de tratamiento que apunta a la Proteína Quinasa Activada por AMP (AMPK), que es la principal enzima encargada de promover la eliminación y almacenamiento de glucosa en músculo esquelético⁴⁻⁶.

La AMPK es un heterotrímero (con subunidades α , β y γ) que realiza una importante función regulando el metabolismo celular y produciendo un balance entre el suministro de nutrientes y la demanda de energía^{7,8}. El incremento en la proporción AMP/ATP o ADP/ATP induce la activación de AMPK que desencadena una ruta de señalización que involucra la fosforilación de numerosas enzimas metabólicas,

¹Centro de Investigación de la Universidad Privada Abierta Latinoamericana (CIUPAL). Cochabamba -Bolivia. <http://orcid.org/0000-0002-5909-0245>.

²Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. ^aMSc. Bioquímica Clínica, Especialista en Inmunología, Lic. en Bioquímica y Farmacia. Universidad Mayor de San Simón.

^bEstudiante de la carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés. <http://orcid.org/0000-0002-5690-3263>.

^cPhD en Biotecnología, MSc. en Biotecnología Molecular, Lic. en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. <http://orcid.org/0000-0001-7287-2586>.

*Correspondencia a: Ricardo Enrique Grados Torrez

Correo electrónico: ric.grados@gmail.com

Recibido el 14 de noviembre de 2022. Aceptado el 12 de febrero de 2023.

resultando en la inhibición de rutas anabólicas que consumen ATP y promoviendo procesos catabólicos generadores de ATP. Existe una gran variedad de isoformas de AMPK ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$ que potencialmente dan lugar a 12 posibles combinaciones) en todo el organismo. Las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ se expresan en casi todos los tejidos y generalmente representan la mayor actividad de AMPK. Sin embargo, estudios basados en ensayos de inmunoprecipitación indican que en tejido muscular esquelético se encuentran solo tres posibles isoformas de AMPK: $\alpha 1\beta 2\gamma 1$, $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ y $\alpha 1\beta 2\gamma 3$, siendo el común denominador en todas ellas la presencia de la subunidad $\beta 2$.

En el proceso de captación de glucosa por el músculo esquelético, la activación de la AMPK juega un papel importante (aunque no exclusivo) puesto que promueve el reclutamiento de Transportadores de Glucosa tipo 4 (GLUT4) hacia la membrana plasmática de las células, de hecho, está acción desencadenada por la AMPK se produce por un mecanismo independiente al de la insulina. Además, la actividad de AMPK induce la expresión de este transportador mediante la activación del factor de transcripción MEF2 (Myocyte-specific enhancer factor 2). Por otra parte, existen evidencias de que AMPK también puede regular el transporte de glucosa a través de GLUT1. Así, el aumento de la absorción de glucosa por el tejido muscular dará como resultado al incremento en la glucólisis y la producción de ATP.

Muchas drogas estudiadas en ratones diabéticos, incrementan la captación celular de glucosa por el músculo esquelético mediante un mecanismo dependiente de la activación de AMPK, mejorando los niveles sanguíneos de glucosa. Drogas activadoras de AMPK preclínicamente validadas como PF-739⁵ y MK-8722⁶ actúan a manera de “importagogs” de glucosa. Sin embargo, su consumo prolongado está asociado con complicaciones cardiacas (acumulación de glucógeno e hipertrofia) debido a la activación crónica de la AMPK, comprometiendo así su uso terapéutico en ensayos clínicos. Otras drogas que actúan directamente sobre la AMPK como el salicilato, A769662, PF-06409577 y 991 muestran una selectividad muy marcada hacia la isoforma de AMPK- $\beta 1$ lo que representa una desventaja. Sin embargo, estudios recientes realizados con la droga SC4 señalan su capacidad activadora pero sobretodo, selectiva hacia la isoforma muscular AMPK- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ (EC50: 17 nM) uniéndose a una región conocida como sitio ADaM (Allosteric Drug and Metabolite) formada entre la Subunidad β (CBM: Carbohydrate Binding Module) y la Subunidad α (KD: Kinase Domain)⁹⁻¹¹. Estos estudios atribuyen la especificidad de SC4 al Nitrógeno en posición 4' del anillo -2(imidazopiridina) que interacciona con el residuo $\beta 2D111$ de AMPK- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$. Este residuo es característico de la Subunidad $\beta 2$ y se encuentra bastante conservado. Así, la enzima AMPK- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ constituye un potencial blanco terapéutico, puesto que es el principal encargado de dirigir la homeostasis de glucosa por el músculo esquelético a través de una ruta independiente a la Insulina.

Las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd conocido comúnmente como Quinoa, es un alimento básico en las

comunidades andinas, sus semillas contienen proteínas de alta calidad y es particularmente rica en aminoácidos esenciales, con un contenido de carbohidratos que tienen valores nutricionales más altos que los cereales como el maíz, el trigo o el arroz. Uno de los principales retos en la comercialización de productos elaborados con base en granos de quinoa, es su amargor que está relacionado con la presencia de saponinas¹².

Las saponinas son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente estudiados por sus propiedades biológicas como antimicrobianos y antivirales, con efectos reductores de colesterol y actuando como adyuvantes inmunológicos mejorando la producción de anticuerpos específicos y la respuesta inmunológica de tejidos y mucosas^{12,14}.

Las saponinas están constituidas estructuralmente por un anillo terpenoide o esteroidal conocido como sapogenina o aglicona. Este anillo puede estar unido a oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos confiriéndole carácter anfipático. Las sapogeninas más representativas de la Quinoa son el Ácido Oleanólico (A), la Hederagenina (B), el Ácido 3 β ,23,30-trihidroxi olean-12-en-28-oico (C), la Gipsogenina (D), el Ácido 3 β -hidroxi-27-oxoolean-12-en-28-oico (E), el Ácido Espergulagénico (F), El Ácido Serjánico (G) y el Ácido Fitolacagénico (H)^{15,16}.

Estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) en el área de Farmacología, evidenciaron que en pacientes con DM2 y sobrepeso, el consumo de un producto nutracéutico elaborado con harina de *Chenopodium quinoa* Willd promovió un mejor control de la homeostasis de la glucosa¹⁷. Por tanto en este trabajo se analizó mediante acoplamiento molecular, la unión de distintas Sapogeninas presentes en *Chenopodium quinoa* Willd con el sitio ADaM de la isoforma muscular de AMPK ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) y la isoforma constitutiva $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ distribuida en todo el organismo, para determinar la especificidad de las sapogeninas y su posible papel biológico como activadores de AMPK.

Material y métodos

Preparación de los blancos proteicos

La estructura de AMPK $\beta 1$ y AMPK $\beta 2$ fueron obtenidas de la base de datos PDB¹⁸.

PDB 6B1U: Estructura cristalográfica de la isoforma AMPK- $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ humana en complejo con el activador SC4 y AMP.

PDB 6B2E: Estructura cristalográfica de la isoforma AMPK- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ humana en complejo con el activador SC4 y AMP.

Para obtener la estructura de ambas proteínas con el estado energético más bajo (estado de mínima energía), se empleó una combinación del método Steepest descent (10 000) y Conjugate gradient (1 000) con el software Chimera 1.11.2.

Preparación de los ligandos

Los Ligandos de prueba corresponden a ocho Sapogeninas (Agliconas) identificadas en *Chenopodium quinoa* Willd. Sus estructuras químicas se obtuvieron de la base de datos PubChem¹⁹. El estado iónico de los átomos de los

Ligandos a pH 7 fue corregida con el software OpenBabel 3.1.1 empleando la Especificación de Introducción Lineal Molecular Simplificada o "SMILES" (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) de cada estructura química.

SMILES (pH 7) de 8 Sapogeninas (A-H) de *Chenopodium quinoa* Willd

A. Ácido Oleanólico

CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC3C4(CCC(C3(C)C)O)C)C2C1)C)C(=O)[O-])C

B. Hederagenina

CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC3C4(CCC(C3(C)CO)O)C)C2C1)C)C(=O)[O-])C

C. Ácido 3 β ,23,30-trihydroxy olean-12-en-28-oico

CC1(CO)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(CO)C5CCC34C)C2C1

D. Gipsogenina

CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC3C4(CCC(C3(C)C=O)O)C)C2C1)C)C(=O)[O-])C

E. Ácido 3 β -hydroxy-27-oxo-olean-12-en-28-oico

CC1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C=O)C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5CCC34C)C2C1

F. Ácido Espergulagénico

CC1(C2C(C(C3(C(C2(C(C(C1O)C)C)C)C)C)C)C)C(=O)[O-]C(=O)[O-]C)C

G. Ácido Serjánico

COC(=O)C1(C)CCC2(CCC3(C)C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5CCC34C)C2C1)C(=O)[O-]

H. Ácido Fitolacagénico

CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC3C4(CCC(C3(C)CO)O)C)C2C1)C)C(=O)[O-])C(=O)OC

Se introdujeron cinco modificaciones químicas en la estructura del ácido Serjánico, obteniendo un total de 17 posibles combinaciones o variantes químicas del ácido Serjánico. Estas modificaciones químicas fueron realizadas con el servidor en línea OpenBabel²⁰:

SMILES (pH 7) de 17 variantes químicas de ácido Serjánico

M1

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C5(C)[NH2+]CC(O)C(C)(C)C5CCC34C)C2C1

M2

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C3(C)CCC3C(C)(C)C(O)CC([NH3+])C43C)C2C1

M3

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5C(O)CC34C)C2C1

M4

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5C([NH3+])CC34C)C2C1

M5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5CCC34C)C2C1

M1_3

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C5(C)[NH2+]CC(O)C(C)(C)C5C(O)CC34C)C2C1

M1_4

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C3(C)CC([NH3+])C3C(C)(C)C(O)C[NH2+]C43C)C2C1

M1_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5(C)[NH2+]CC(O)C(C)(C)C5CCC34C)C2C1

M1_3_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5(C)[NH2+]CC(O)C(C)(C)C5C(O)CC34C)C2C1

M1_4_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C3(C)CC([NH3+])C3C(C)(C)C(O)C[NH2+]C43C)C2C1

M2_3

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C3(C)CC(O)C3C(C)(C)C(O)CC([NH3+])C43C)C2C1

M2_4

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C)C(=CCC4C3(C)CC([NH3+])C3C(C)(C)C(O)CC([NH3+])C43C)C2C1

M2_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C3(C)CCC3C(C)(C)C(O)CC([NH3+])C43C)C2C1

M3_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5C(O)CC34C)C2C1

M4_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5(C)CCC(O)C(C)(C)C5C([NH3+])CC34C)C2C1

M2_3_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5(C)[NH3+]CC(O)C(C)(C)C5C(O)CC34C)C2C1

M2_4_5

COC(=O)C1(C)CCC2(C(=O)[O-])CCC3(C(=O)[O-])C(=CCC4C5C([NH3+])CC(O)C(C)(C)C5C([NH3+])CC34C)C2C1

A partir de la nomenclatura de SMILES a pH 7, las 8 sapogeninas y 17 variantes químicas del ácido serjánico fueron convertidas en modelos tridimensionales con el software Chimera 1.11.2. La configuración estructural de mínima energía para cada ligando, fue obtenida empleando el software PyRx (Cojugate gradient: 200).

Acoplamiento molecular

Para el ensayo de acoplamiento molecular se utilizó el software PyRx con una exhaustividad de 8 y una rejilla de 25

Å3 que fue posicionada en el sitio ADaM de cada proteína blanco utilizando como punto de referencia el residuo de β 1N111 para AMPK β 1 y el residuo β 2D111 para AMPK β 2. Los resultados estructurales y de energía de interacción del acoplamiento molecular de cada Ligando fueron analizados con el software Phytton Molecule Viewer (PMV 1.5.6) y Chimera 1.11.2.

Resultados y Discusión

Sapogeninas de *Chenopodium quinoa* Willd interaccionan con AMPK- β 1 Y AMPK- β 2

El análisis por acoplamiento molecular realizado con cada una de las sapogeninas presentes en *Chenopodium quinoa* Willd señala que éstas tienen la capacidad estructural de interaccionar con la región de AMPK- β 1 (Figura 1 A y B) y AMPK- β 2 (Figura 2 A y B) equivalente al Sitio ADaM. La estructura del sitio ADaM de acuerdo a su densidad electrónica muestra que cada sapogenina interacciona con las regiones polares (con carga positiva o negativa) y apolares de acuerdo a su estructura química evitando impedimentos estéricos. En el Sitio ADaM, cada sapogenina adquiere distintas configuraciones de unión que corresponde a su energía de interacción más favorable (ΔG de interacción) calculado en kcal/mol (Tabla 1).

Estructuralmente, muchos activadores sintéticos como SC4, 991, PF-739, MK-8722 y PF-06409577 comparten el anillo de imidazolpiridina que actúa como una estructura núcleo del que se extienden generalmente sustituyentes con anillos aromáticos, como el ácido 2-metilbenzoico en el caso de SC4. Mientras que las Sapogeninas de *Chenopodium*

quinoa Willd presentan una estructura base denominada como β -amirina que tiene un núcleo esteroidal formado por cinco anillos hexacíclicos con un solo doble enlace y diferentes grupos funcionales constituidos principalmente por -OH, -COOH y -CHO que van variando de posición de acuerdo a la estructura de cada Sapogenina. La presencia de anillos hexacíclicos en lugar de anillos aromáticos hace posible que las sapogeninas presenten mayor flexibilidad en su estructura química haciéndolas menos rígidas y planas pero manteniendo su carácter hidrofóbico, lo que les otorga una mayor versatilidad en su configuración estructural durante la interacción con el sitio ADaM (Figura 1B y 3B). Además, la presencia de grupos funcionales polares en sitios específicos hace posible su interacción con aminoácidos hidrofílicos como α 2K51, α 2D88, β 2R82 pero sobretudo con β 2D111 que es el aminoácido conservado más característico del sitio ADaM de la isoforma muscular de AMPK (α 2 β 2 γ 1). El peso molecular de SC4 es de 471,89 g/mol que es similar al promedio del peso molecular de las Sapogeninas estudiadas (487,03 g/mol) lo que indica que tienen el tamaño adecuado para poder ajustarse adecuadamente en el Sitio ADaM evitando impedimentos estéricos (Figura 1B y 2B).

Representación esquemática de AMPK- β 1. Subunidad α (verde), Subunidad β (celeste) y Subunidad γ (amarillo). El recuadro negro señala la región de unión de las Sapogeninas que coincide con el sitio ADaM. **B.** Superposición de la estructura química de las Sapogeninas en el sitio ADaM, además, se indican los principales aminoácidos presentes en este sitio (códigos de una letra). **C.** Acoplamiento Molecular del Ácido Serjánico (púrpura) con un ΔG de Interacción de

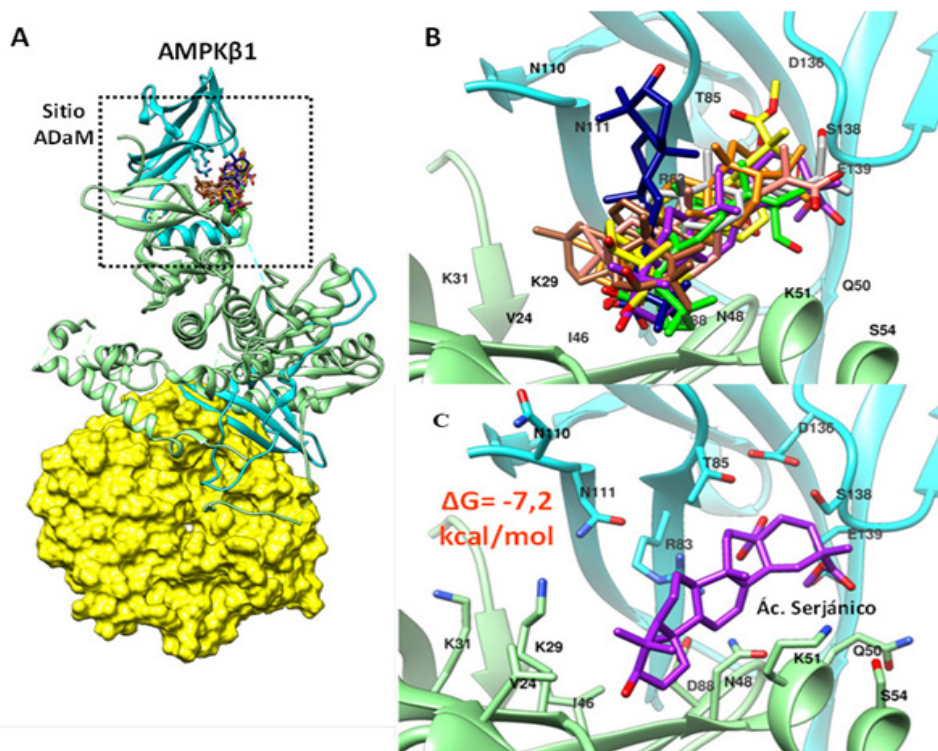


Figura 1. Unión de ocho sapogeninas de *Chenopodium quinoa* Willd con AMPK- β 1. A

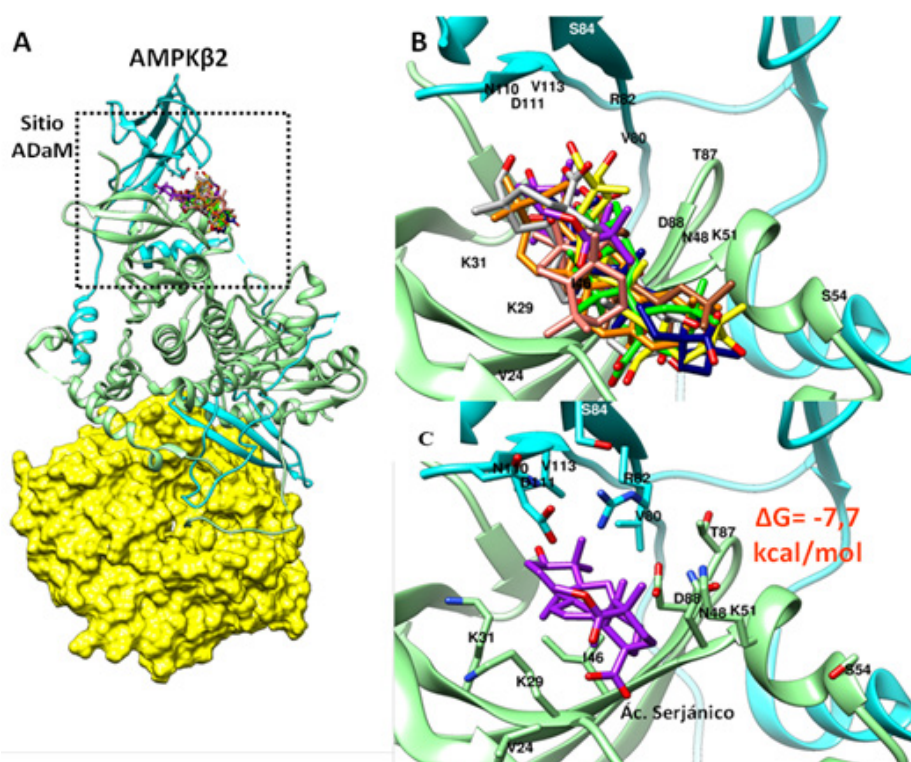


Figura 2. Unión de ocho sapogeninas de *Chenopodium quinoa* Willd con AMPK- β 2. A

-7,2 kcal/mol.

La energía de interacción (ΔG) de las diferentes sapogeninas de *Chenopodium quinoa* Willd presentan valores muy variados, desde -6,9 a -7,7 kcal/mol para la interacción con AMPK- β 1 y de -6,2 a -7,7 kcal/mol para AMPK- β 2 (Tabla 1). Esta diversidad en la energía de interacción pone en evidencia que todas las Sapogeninas evaluadas en este estudio son potencialmente capaces de unirse al sitio ADaM para activar ya sea el AMPK- α 2 β 1 γ 1 que se encuentra distribuida ampliamente en casi todo el organismo, como también activar a AMPK- α 2 β 2 γ 1 que se encuentra casi exclusivamente en tejido muscular esquelético.

Existen evidencias de que diferentes sapogeninas y saponinas como Damulin A y B, Foenumosida B, Soyasapogenol B y Dioscin, aisladas de fuentes naturales y plantas medicinales como *Gynostemma pentaphyllum*, *Lysimachia foenum-graecum*, *Platycodon grandiflorum*, tienen actividad anti-adipogénica disminuyendo la expresión de factores de transcripción adipogénicos a través de una ruta de señalización que involucra la activación de AMPK en adipocitos, además, inhiben la acumulación de lípidos en líneas celulares como HepG2 y 3T3-L1, previniendo la acumulación de grasa abdominal en ratones obesos y contribuyendo también a la inhibición de la lipasa pancreática. Yao y colaboradores (2015) evidenciaron que las saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd tienen actividad inhibitoria en la acumulación de triglicéridos en adipocitos, y además disminuyen la expresión de factores de transcripción adipogénicos clave como PPAR y C/EBP α reduciendo también los niveles de expresión del elemento regulador de esteroides

(SREBP-1c) a nivel proteico y de RNAm¹⁸. Por tanto, muchas sapogeninas y saponinas derivadas de *Chenopodium quinoa* no sólo presentan actividad hipoglucemiante y esto se debe probablemente a que muchas de estas interaccionan activando diferentes isoformas de AMPK teniendo efectos benéficos diversos en el organismo tras su consumo.

Representación esquemática de AMPK- β 2. Subunidad α (verde), Subunidad β (celeste) y Subunidad γ (amarillo). El recuadro negro señala la región de unión de las sapogeninas que coincide con el sitio ADaM. B. Superposición de la estructura química de las sapogeninas en el Sitio ADaM, además, se indican los principales aminoácidos presentes en este sitio (códigos de una letra). C. Acoplamiento Molecular del Ácido Serjánico (púrpura) con un ΔG de Interacción de -7,7 kcal/mol.

La comparación del ΔG de interacción de todas las sapogeninas evaluadas señala que, el ácido Serjánico interacciona con una mayor afinidad por AMPK- α 2 β 2 γ 1 (-7,7 kcal/mol, Figura 2C) que es la isoforma predominante del tejido muscular esquelético, sin embargo, esta sapogenina también podría interaccionar, aunque con una menor afinidad (ΔG : -7,2 kcal/mol, Figura 1C), con la isoforma AMPK- α 2 β 1 γ 1 distribuida en la mayoría de los tejidos en todo el organismo (Tabla 1).

Estudios recientes indican que los ácidos Serjánico y Oleanólico son las sapogeninas predominantes en semillas de Quinoa especialmente en variedades amargas (saponinas >0,11 %) cuya procedencia es principalmente la región andina, donde se determinaron en promedio 8,1 g de sapogeninas por kg de materia seca. Estudios recientes señalan que los ácidos

Tabla 1. ΔG de Interacción de 8 Agliconas de *Chenopodium quinoa* Willd con AMPKβ1 y AMPKβ2

AGLICONAS DE <i>Chenopodium quinoa</i> Wild	ΔG de Unión (Kcal/mol)	
	AMPKβ1	AMPKβ2
Ácido Oleanólico	-6,9	-6,9
Hederagenina	-6,9	-7,2
Ácido 3β, 23,30-trihidroxi olean-12-en-28-oico	-6,9	-6,2
Gipsogenina	-7,4	-7,3
Ácido 3β-hidroxi-27-oxo-olean-12-en-28-oico	-7,1	-6,4
Ácido Espergulagénico	-7,7	-6,9
Ácido Serjánico	-7,2	-7,7
Ácido Fitolacagénico	-7,1	-7,2

Serjánico y Oleanólico tienen un efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de colon (Caco-2) actuando como inductores de apoptosis. Otros estudios empleando fracciones alcohólicas de saponinas de semillas de quinua a diferentes concentraciones, señalan su efecto antiinflamatorio debido a su capacidad en cultivo celular de disminuir la producción de NO e inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias (como IL-6 y TNF-α), no obstante, esta actividad fue atribuida principalmente a los ácidos Serjánico y Oleanólico²². Estudios clínicos realizados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB, Bolivia) señalan la capacidad hipoglucemiante e hipolipemiante de un producto elaborado con base en harina de quinua en pacientes con DM2¹⁶, sin embargo, surge la necesidad de realizar estudios con saponinas purificadas que permitan elucidar su actividad.

Mejoramiento de la especificidad del Ácido Serjánico

Puesto que la activación de la isoforma AMPK-α2β2γ1 es de especial interés a nivel clínico debido a su localización en músculo esquelético y su función biológica relacionada con la homeostasis de glucosa por una ruta independiente de insulina, se realizaron diferentes modificaciones químicas en el Ácido Serjánico (M1-5), introduciendo algunos grupos funcionales hidrofílicos como -NH-, -NH2, -COOH y -OH en posiciones concretas que permitan una interacción más favorable y específica con el residuo β2D111 característico del sitio ADaM en la isoforma muscular de AMPK (α2β2γ1). Con las cinco diferentes modificaciones químicas se analizaron un total de 17 posibles combinaciones. La variante química del Ácido Serjánico M4_5 obtuvo un ΔG de interacción más favorable y específico (-7,6 kcal/mol) con relación al resto de moléculas ensayadas (Tabla 2). Aunque este valor se aproxima al ΔG calculado para el Ácido Serjánico sin modificar (-7,7 kcal/mol), la variante M4_5 reduce en gran medida su especificidad por la isoforma AMPK-α2β1γ1, debido a que su ΔG de interacción con esta isoforma se incrementa de -7,2 a -6,7 kcal/mol (Tabla 2).

A nivel estructural, la comparación de la interacción de la variante M4_5 con las isoformas AMPK-α2β1γ1 y AMPK-α2β2γ1, muestra que los dos grupos funcionales -NH2 (M4) y -COOH (M5) añadidos al Ácido Serjánico forman una red de puentes de hidrógeno con los residuos β2D111, β2R82 y

α2D88 en el sitio ADaM de la isoforma muscular de AMPK (α2β2γ1) (Figura 3B). Sin embargo, estos grupos funcionales añadidos se orientan hacia el exterior del sitio ADaM al interactuar con la isoforma AMPK-α2β1γ1 debido probablemente a la ausencia del residuo D111 (Figura 3A). La formación de esta red de puentes de hidrógeno permite que la interacción de la variante M4_5 sea más específica para la isoforma muscular de AMPK, debido a que no está presente con la isoforma AMPK-α2β1γ1, lo que concuerda con los

Tabla 2. ΔG de Interacción de 17 variantes de Ácido Serjánico con AMPKβ1 y AMPKβ2

Modificaciones del Ácido Serjánico	ΔG de Unión (Kcal/mol)	
	AMPKβ1	AMPKβ2
Ácido Serjánico SM	-7,2	-7,7
M1	-7,1	-7,3
M1_3	-6,8	-7,4
M1_4	-7,1	-6,8
M1_5	-7,3	-6,7
M1_3_4	-7,3	-6,6
M1_3_5	-6,9	-6,2
M2	-6,7	-6,5
M2_3	-6,9	-7
M2_4	-6,6	-6,9
M2_5	-6,2	-6,4
M2_3_5	-6,7	-6,7
M2_4_5	-6,9	-6,2
M3	-6,6	-7,3
M3_5	-6,8	-6,5
M4	-7,1	-6,1
M4_5	-6,7	-7,6
M5	-6,8	-6,6

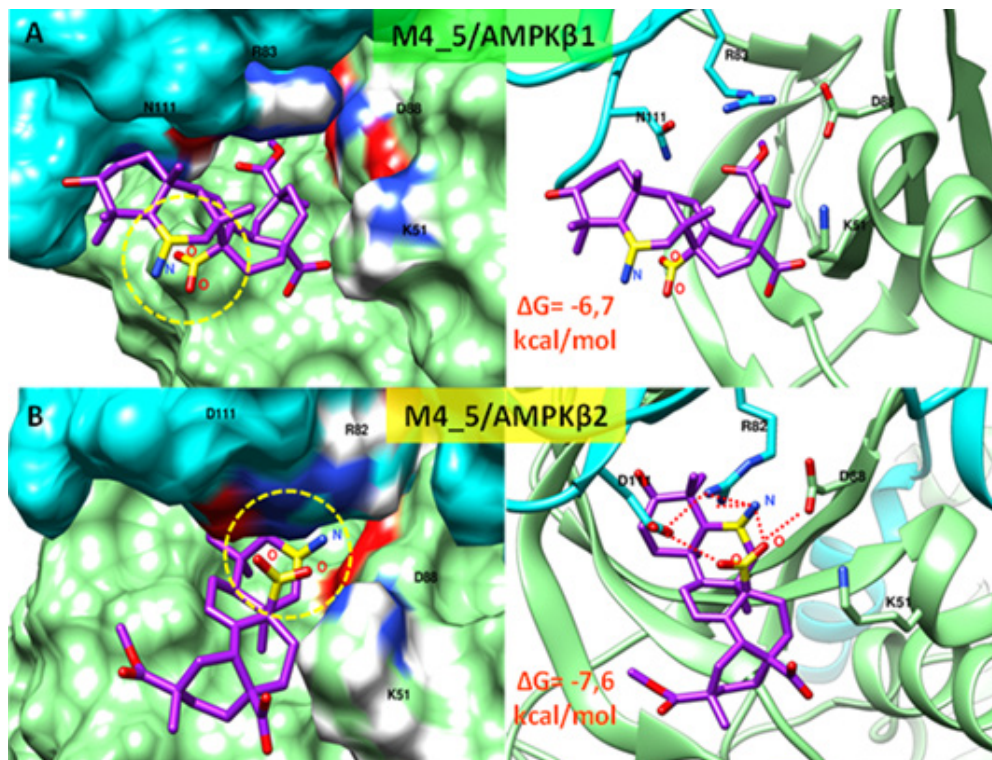


Figura 3. Interacción del Ácido Serjánico_M4_5 con el sitio ADaM de AMPKβ1 (A) y AMPKβ2 (B)

valores de ΔG calculados anteriormente.

El círculo amarillo indica la ubicación de los grupos funcionales añadidos en el Ácido Serjánico (M4: $-\text{NH}_3^+$ y M5: COO^-). En ambos casos (A y B) se muestra la densidad electrónica del sitio ADaM y el esquema de interacción con los principales aminoácidos involucrados (códigos de una letra). Los puentes de hidrógeno se observan como líneas punteadas rojas.

Por otro lado, si comparamos la configuración de

interacción del Ácido Serjánico sin modificar (SM) con la variante M4_5, se observa que la configuración de ambos ligandos en el sitio ADaM de la isoforma muscular de AMPK ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) es muy similar orientadas en la misma dirección (Figura 4B). Por el contrario, la configuración de ambos ligandos con la isoforma AMPK- $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ es muy diferente, con direcciones casi perpendiculares una respecto a la otra (Figura 4A).

Los grupos funcionales añadidos en el Ácido Serjánico_

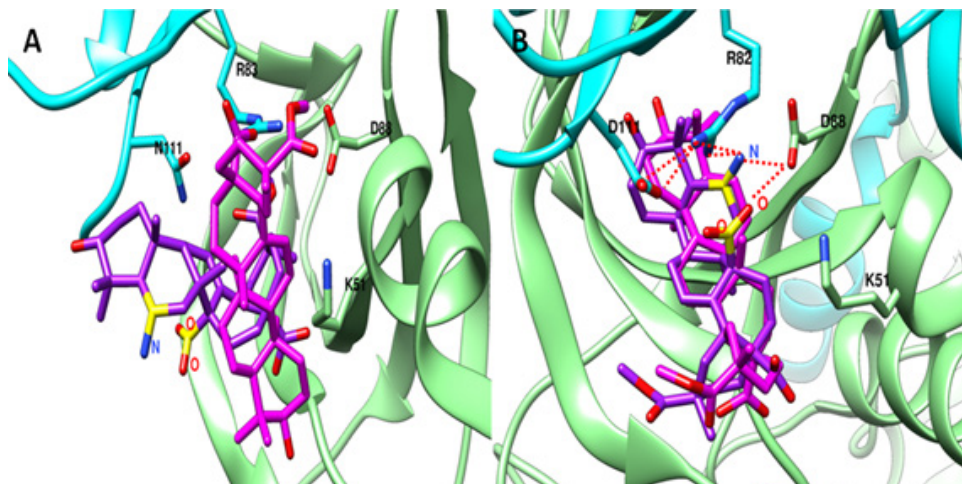


Figura 4. Superposición de la configuración del Ácido Serjánico (Sin Modificar) (rosado) y del Ácido Serjánico_M4_5 (púrpura) unidos al sitio ADaM de AMPKβ1 (A) y AMPKβ2 (B)

M4_5 se muestran en amarillo y los puentes de hidrógeno como líneas punteadas rojas. Los aminoácidos involucrados en la interacción se nombran de acuerdo al código de una letra.

Conclusiones

Las sapogeninas presentes en *Chenopodium quinoa* Willd tienen características químicas y de peso molecular similares a fármacos sintéticos como SC4, permitiendo su interacción con el sitio ADaM de las isoformas de AMPK $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ y $\alpha 2\beta 2\gamma 1$. De acuerdo a los parámetros energéticos (ΔG de interacción), el Ácido Serjánico es la sapogenina con mayor afinidad por la isoforma muscular de AMPK ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) que es la principal enzima reguladora de los niveles de glucosa sanguíneos por una ruta independiente de insulina. Las modificaciones químicas realizadas en

el Ácido Serjánico añadiendo grupos funcionales hidrofílicos y el análisis por acoplamiento molecular evidencia la importancia del residuo $\beta 2D111$ en la especificidad de las sapogeninas por el sitio ADaM de AMPK- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$. Finalmente, con base en las evidencias de varios estudios clínicos, el consumo de quinua tiene efectos beneficiosos en la regulación de la glucemia y el perfil lipídico, por tanto, las sapogeninas presentes en este alimento tendrían un efecto activador de AMPK, sin embargo se requieren muchos más ensayos moleculares de actividad biológica y de toxicidad con sapogeninas purificadas, para corroborar su efecto biológico en cultivo celular y en modelos animales.

Agradecimientos

A la Fundación Internacional para la Ciencia (International Foundation for Science: IFS) Estocolmo, Suecia.

Declaración de Conflicto de intereses

Los autores declaran la no existencia de conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Ahumada A, Ortega A, Chito D, Benitez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Rev Colomb Cienc Quím Far* 2016;45(3):438-69. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74182016000300006&script=sci_abstract&tlng=es
- Brady K, Ho CT, Rosen RT, Sang S, Karwe MV. Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. *Food Chem*. 2007;100(3):1209-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.001>
- Calabrese MF, Rajamohan F, Harris MS, Caspers, NL, Magyar R, Withka JM, et al. Structural basis for AMPK activation: natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms. *Structure*. 2014;22(8):1161-72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25066137/>
- A-Carpio GR, Fonseca VA. Update on safety issues related to antihyperglycemic therapy. *Diabetes Spectr*. 2014;27:92-100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26246765/>
- Cokorinos EC, Delmore J, Reyes AR, Albuquerque B, Kjøbsted R, Jørgensen NO, et al. Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-human primates and mice. *Cell Metab*. 2017;25(2):1147-59.e10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28467931/>
- Estrada A, Li B, Laarveld B. Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1988;21(3):225-36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9681245/>
- Gonzales E, Grados R, Trino R, Gutiérrez M, Espinoza M, Pérez J, et al. Investigaciones sobre las propiedades medicinales de productos naturales para la diabetes y/u obesidad. *IIFB - FCFB* 2016; 1: 3-30.
- Gutiérrez G, Giraldo-Dávila, D, Combariza MY, Holzgrabe U, Tabares-Guevara JH, Ramírez-Pineda JR, et al. Serjanic Acid Improves Immunometabolic Markers in a Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020;25(7):1486. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7181135/>
- Hanefeld M. Pioglitazone and sulfonylureas: effectively treating type 2 diabetes. *Int. J Clin Pract. Suppl*. 2007;61(s153):20-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1974826/#:~:text=Pioglitazone%20has%20been%20shown%20to,20%2C27%2C74.>
- Hardie DG. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:1-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25259783/>
- Kuljanabagavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry*. 2008;69(9):1919-26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.001>
- Myers RW, Guan HP, Ehrhart J, Petrov A, Prahallada S, Tozzo E, et al. Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy. *Science*. 2017;357(6350):507-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.aah5582>
- Ngoei KRW, Langendorf CG, Ling NXY, Hoque A, Varghese S, Camerino MA, et al. Structural Determinants for Small-Molecule Activation of Skeletal Muscle AMPK $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ by the Glucose Importogog SC4. *Cell Chem Biol*. 2018;25(6):728-37.e9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.03.008>
- Oakhill JS, Scott JW, Kemp BE. AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(3): 125-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.006>
- O'Neill HM. AMPK and exercise: glucose uptake and insulin sensitivity. *Diabetes Metab J*. 2013;37(1):1-21. Disponible en: <https://doi.org/10.4093/dmj.2013.37.1.1>
- Thrasher J. Pharmacologic management of type 2 diabetes mellitus: available therapies. *Am J Cardiol*. 2017;120(1):S4-S16. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.05.009>
- Woldemichael GM, Wink M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J Agric Food Chem*. 2001;49(5) 2327-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf0013499>
- RCSB Protein Data Bank. USA. Disponible en: <https://www.rcsb.org/> [Internet]
- PubChem. USA. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [Internet]
- OpenBabel. Cheminfo. Disponible en: <http://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/FormatConverter/index.html> [Internet]
- Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, et al. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun*. 2013;4:3017. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ncomms4017>
- Yao Y, Zhu Y, Gao Y, Shi Z, Hu Y, Ren G. Suppressive effects of saponin-enriched extracts from quinoa on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Food Funct*. 2015;6(10): 3282-90. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/FO/C5FO00716J>.