



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Maestría Titulado:

**“ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* E *IN SILICO* DE ACEITES ESENCIALES DE
MYRCIANTHES HALLII, *SCHIMUS MOLLE* & *ORIGARUM MAJORANA*, CONTRA
LEISHMANIA SPP.”**

Autor:

Ing. DAVID ANDRE BÁEZ CEVALLOS

Tutor de Proyecto:

LINO ARISQUETA HERRANZ, PhD.

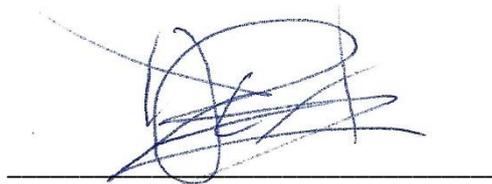
Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 30 de julio de 2022

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, David Andre Báez Cevallos, con cédula de identidad Nro. 171634661-2, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



David Andre Báez Cevallos

CC. 1716346612

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* E *IN SILICO* DE ACEITES ESENCIALES DE
MYRCIANTHES HALLII, *SCHIMUS MOLLE* & *ORIGARUM MAJORANA*, CONTRA
LEISHMANIA SPP.”**

Realizado por:

DAVID ANDRE BÁEZ CEVALLOS

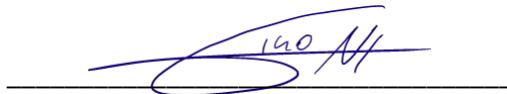
como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA HERRANZ, PhD.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

Andrés López-Cortés, PhD

MSc. Jaime F. Gía

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante el
tribunal examinador



Andrés López-Cortés, PhD



MSc. Jaime F. Gía

Quito, 30 de julio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por todo el apoyo brindado a lo largo de la maestría, y permitirme alcanzar esta tan anhelada meta profesional.

Al Doctor Lino Arisqueta Herranz por toda su sabiduría, perspectiva y conocimientos brindados.

Al Grupo de Investigación de Biomedicina de la Universidad Internacional SEK y el apoyo de todos los profesores que sí llegaron a encaminarme hasta este punto de mi vida profesional.

DEDICATORIA

A mis padres Gustavo y Ana por siempre guiarme y ser mi mejor ejemplo de perseverancia e integridad. A mi tutor Lino por haberme brindado esta oportunidad y todos sus consejos, a su única y singular manera. A Matt, Luck, Mary y Candy por su compañía durante muchas noches de desvelo. A Dayanara y Paola por estar ahí, por soportarme y por las risas, a Hipatia y Antonella por su ayuda y consejos dentro del laboratorio, a José Ruben, Damaris, Marbel y el resto de mis amigos y profesores, por encaminarme a quien soy hoy en día.

To be submitted:

Para ser enviado:

Actividad Antiparasitaria *in vitro* e *in silico* de aceites esenciales de *Myrcianthes hallii*, *Schimus molle* & *Origanum majorana*, contra *Leishmania spp.*

David Andre Báez Cevallos^{1*}, Lino Arisqueta^{1*}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud,
Quito, Ecuador

²Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", Departamento de Ciencias de la Vida y
Agricultura, Laboratorio de Inmunología y Virología, Guayabamba, Ecuador
Ecuador. 30/07/2022

***AUTOR DE CORRESPONDENCIA:** Lino Arisqueta Herranz, PhD.

Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-983104230; email: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

CIENCIAS DE LA SALUD

Y con el financiamiento de
(colocar el que aplique)

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-UISEK-PXXXXX_X.X

RESUMEN

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades parasitarias causadas por más de 20 especies de protozoos del género *Leishmania*, familia Trypanosomatidae, afectando principalmente a poblaciones de escasos recursos y en situación de vulnerabilidad social y económica. Esta enfermedad es endémica y/o frecuente en 98 países de Medio Oriente, Latinoamérica y África; dentro de Ecuador, el primer caso de Leishmaniasis documentado fue en 1920, y desde entonces, el país ha notificado muchos brotes de esta enfermedad. Existen algunos fármacos para tratar esta enfermedad (Anfotericina B, Pentamidina y Paromomicina), sin embargo, tiene muchas limitantes: efectos secundarios tóxicos, alto costo y la necesidad de un tratamiento prolongado. De este modo, las plantas y los productos derivados de ellas suponen una buena fuente de principios activos para la industria farmacéutica, o una alternativa natural a los tratamientos convencionales cuando éstos no son efectivos o accesibles. Es por ello que se analizó el efecto de los aceites esenciales de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle* sobre *L. infantum* y *L. mexicana*, mediante ensayos *in silico* e *in vitro*. Se determinó la composición química y varias propiedades físicas y organolépticas de los 3 extractos, posteriormente, como ensayo *in vitro*, se evaluó la viabilidad celular, la actividad leishmanicida y se determinó la concentración citotóxica media (CC₅₀) de los aceites esenciales en promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* por medio del ensayo colorimétrico MTT. Los resultados mostraron que los aceites esenciales de *M. hallii*, y *S. molle* presentan un CC₅₀ sobre *L. mexicana* de 222.88µg/mL y 546.06µg/mL respectivamente; mientras que para *L. infantum* el CC₅₀ fue de 420.99µg/mL y 546.06µg/mL para *M. hallii*, y *S. molle* respectivamente. A partir de estos resultados se procedió a un análisis bioinformático de la lista de compuestos mayoritarios del aceite esencial de *S. molle*, obteniendo una predicción de 452 dianas que interactúan con dichos compuestos. De estas dianas predichas se identificaron varios procesos biológicos y rutas metabólicas relacionados con la apoptosis. Por lo que se concluyó que los aceites esenciales de estas 3 plantas endémicas inhiben el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* mediante análisis *in vitro* e *in silico*.

Palabras clave: leishmaniasis, apoptosis, autofagia, normalización, enriquecimiento, *M. hallii*, *O. majorana*, *S. molle*.

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a set of parasitic diseases caused by more than 20 species of protozoa of the genus *Leishmania*, family Trypanosomatidae, mainly affecting populations with limited resources and in situations of social and economic vulnerability. This disease is endemic and/or frequent in 98 countries in the Middle East, Latin America and Africa; in site of Ecuador, the first documented case of Leishmaniasis was in 1920, and since then, the country has reported many outbreaks of this disease. There are some drugs to treat this disease (Amphotericin B, Pentamidine and Paromomycin), however, it has many limitations: toxic side effects, high cost and the need for prolonged treatment. In this way, plants and products derived from them are a good source of active ingredients for the pharmaceutical industry, or a natural alternative to conventional treatments when they are not effective or accessible. For this reason, the effect of the essential oils of *M. hallii*, *O. majorana* and *S. molle* on *L. infantum* and *L. mexicana* was analyzed through *in silico* and *in vitro* tests. The chemical composition and several physical and organoleptic properties of the 3 extracts were determined, subsequently, as an *in vitro* assay, cell viability, leishmanicidal activity were evaluated and the mean cytotoxic concentration (CC_{50}) of the essential oils in promastigotes of *L. mexicana* and *L. infantum* by means of the MTT colorimetric assay. The results showed that the essential oils of *M. hallii* and *S. molle* have a CC_{50} on *L. mexicana* of 222.88 μ g/mL and 546.06 μ g/mL, respectively; while for *L. infantum* the CC_{50} was 420.99 μ g/mL and 546.06 μ g/mL for *M. hallii* and *S. molle* respectively. From these results, a bioinformatic analysis of the list of major compounds of the essential oil of *S. molle* was carried out, obtaining a prediction of 452 targets that interact with said compounds. From these predicted targets, several biological processes and metabolic pathways related to apoptosis were identified. Therefore, it was concluded that the essential oils of these 3 endemic plants inhibit the growth of promastigotes of *L. mexicana* and *L. infantum* through *in vitro* and *in silico* analysis.

Keywords: leishmaniasis apoptosis, autophagy, normalice, enrichment, *M. hallii*, *O. majorana*, *S. molle*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades parasitarias causadas por más de 20 especies de protozoos del género *Leishmania*, familia Trypanosomatidae, afectando principalmente a poblaciones de escasos recursos y en situación de vulnerabilidad social y económica. Las manifestaciones clínicas son diversas y pueden ir desde lesiones cutáneas ulcerativas hasta la forma visceral, la forma más grave de leishmaniasis, asociada a infección generalizada y alta mortalidad (1,2). Suele transmitirse por la picadura de una mosca hembra (familia: Phlebotominae), infectada al chupar sangre de un animal o humano infectado con el parásito (3).

Esta enfermedad es endémica y/o frecuente en 98 países de Medio Oriente, Latinoamérica y África, entre ellos Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, China, Costa Rica, Etiopía, Irán, India, Siria, Somalia Sudán del Norte, y Perú registran el mayor número de casos, representando el 90% de nuevos casos en el mundo; en el año 2018 se reportaron un aproximado de 220 mil casos de Leishmaniasis. Actualmente se estima que 350 millones de personas están en riesgo de infección, con una prevalencia de 12 millones con 0,2 a 0,4 millones de casos de Leishmaniasis Visceral y 0,7 a 1,2 millones de casos de Leishmaniasis Cutánea (4,5).

En Ecuador, el primer caso de Leishmaniasis documentado fue en 1920 en la provincia de Esmeraldas, cerca de la frontera con Colombia. Desde entonces, el país ha notificado muchos brotes de esta enfermedad; durante la década de 2001 a 2011, se registraron más de 20 mil casos en humanos en 22 de las 25 provincias. En el 2014 se reportaron un total de 1183 casos al Ministerio de Salud Pública (MSP) del Ecuador, del cual el 22,1% se encontraba en la provincia de Pichincha, 12,5% en Santo Domingo de los Tsachilas y 11,5% en Esmeraldas; mientras que en el año 2018 fueron 1071 casos registrados, pero manteniendo las mismas 3 provincias como las más afectadas. Actualmente el diagnóstico clínico de Leishmaniasis en el país sigue siendo un método únicamente para confirmar casos que estén muy desarrollados y notificarlos de manera oficial. Por lo tanto, es probable que estas últimas cifras subestimen la incidencia real (4,6).

Los perros son el reservorio doméstico más relevante de *Leishmania infantum* (*L. infantum*), el agente causante de la leishmaniasis canina, y también la principal fuente de infección del vector. Mientras que *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) se encuentra mayormente en los roedores. Por tanto, la presencia de ambos en zonas endémicas representa un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad humana (7).

El desarrollo de los primeros fármacos leishmanicidas se produjo hace varias décadas. Los llamados medicamentos de primera línea son ahora antiguos y perjudiciales, pero aún se usan. Estos fármacos de primera línea en la lucha contra las infecciones por *Leishmania* son los denominados antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam). Sin embargo, se han generado mecanismos de resistencia contra los mismos y por ello están los fármacos de segunda línea (Anfotericina B, Pentamidina y Paromomicina), que siguen teniendo limitaciones importantes: efectos secundarios tóxicos, alto costo y la necesidad de un tratamiento prolongado (6,8). Incluso, ya hay estudios recientes donde se observa una creciente resistencia de *Leishmanias spp.* hacia esta línea de fármacos (9,10). Por lo que el tratamiento de la leishmaniasis sigue siendo un desafío y existe una necesidad urgente de descubrir nuevas terapias contra dicha enfermedad.

Los procesos a los que afectan algunos de estos medicamentos parecen ser la formación de esteroides en la membrana, la biosíntesis de lípidos, el ciclo celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inhibición de la topoisomerasa, activación de macrófagos y la muerte celular programada o apoptosis (2,8,11–13).

1.2. Problemática

La limitación de los fármacos para tratar la leishmaniasis se debe a su alta toxicidad, costo elevado y sus efectos secundarios graves, especialmente efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos y teratogénicos (14); dadas estas limitaciones, existe una necesidad urgente de descubrir nuevas terapias contra la leishmaniasis (2). Por eso, en muchas regiones donde no se dispone de estos medicamentos comerciales, se utilizan plantas medicinales para el tratamiento. Se sabe que las plantas se utilizan en la producción de productos farmacéuticos debido a sus propiedades químicas y diversidad de componentes bioactivos. De este modo, las plantas y los productos derivados de ellas suponen una buena fuente de principios activos para la industria farmacéutica, o una alternativa natural a los tratamientos convencionales cuando éstos no son efectivos o accesibles (14).

1.3. Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (AE), también conocidos como aceites volátiles, son productos naturales formados por una mezcla de compuestos volátiles producidos por muchas plantas. Se sabe que son biológicamente activos y que poseen principalmente propiedades antibacterianas,

antifúngicas y antioxidantes. Cada vez hay más estudios sobre la actividad biológica de los AE porque, por lo general, carecen de riesgos genotóxicos a largo plazo (15).

Los AE son mezclas complejas de varios compuestos y sus composiciones varían según muchos factores, como el entorno de la planta y las condiciones de crecimiento, los métodos de recolección, extracción y almacenamiento. Además, el componente principal de un AE también puede variar en diferentes quimiotipos (plantas del mismo género y especie que varían en la composición química de sus AE debido a las diferentes condiciones de crecimiento). Esta variabilidad química puede influir en sus actividades o efectos adversos (14,16,17).

Por todo lo anteriormente expuesto, se han creado iniciativas para obtener nuevos compuestos eficaces contra *Leishmania spp.* Varios productos naturales con diversos tipos de compuestos, incluidos monoterpenos, sesquiterpenos y otros componentes de los aceites esenciales, mostraron propiedades leishmanicidas (α -pineno, p-cimeno y 1,8-cineol), lo que demuestra que tales sustancias pueden ser opciones de investigación prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos que sirvan como una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad (2,18).

1.3.1. *Myrcianthes hallii* (M. hallii)

Myrcianthes es un género de plantas nativas de América Central y del Sur, así como del oeste de la India. Se ha demostrado que las especies de *Myrcianthes* tienen propiedades antimicrobianas, antivirales e insecticidas; además son eficaces contra los piojos (19). Otro estudio llevado por Monzote et al. (20), identificó su capacidad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *L. amazonensis*.

1.3.2. *Origanum majorana* (O. majorana)

El orégano o mejorana (*O. majorana*) es la especie más variable del género *Origanum*, caracterizada por su diversidad morfológica y química. Utilizado en todo el mundo desde la antigüedad en la medicina tradicional y popular, el orégano se extiende por todo el mundo y es particularmente abundante en el área mediterránea, euroasiática y norteafricana. Varios estudios han demostrado que la planta tiene una amplia variedad de metabolitos secundarios, la mayoría de ellos compuestos fenólicos como flavonoides, terpenoides, ácidos y alcaloides fenólicos y ácidos grasos, entre otros, que son los principales componentes responsables de su acción (21). Ensayos de actividad antiparasitaria mostraron que el aceite esencial de *O. vulgare* poseía un bajo IC₅₀ (14,21).

1.3.3. *Schinus molle* (*S. molle*)

El AE de *Schinus molle* se ha empleado dentro de la población brasileña como alternativa terapéutica contra bacterias y virus en el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias (22). También ha sido empleado para el alivio del reumatismo y como antidepresivo. A pesar de su uso generalizado en la medicina popular, no existen estudios en la literatura que reporten los posibles efectos tóxicos de su aceite esencial (23). Otro estudio llevado a cabo por Pérez-treviño et al. (24) registró una alta actividad antiparasitaria por parte de *S. molle* contra epimastigotes de una cepa de *T. cruzi*.

1.4. Hipótesis del estudio

Los aceites esenciales de las plantas endémicas del Ecuador, afectan la viabilidad de *L. mexicana* y *L. infantum*. Este efecto en la viabilidad puede estar asociado a la apoptosis u otros mecanismos de muerte celular programada.

1.5. Objetivos

General

Analizar el efecto de los aceites esenciales de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle* sobre *L. infantum* y *L. mexicana*, mediante ensayos *in silico* e *in vitro*, para la búsqueda de alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis

Específicos

- Obtener aceites esenciales de composición definida con actividad leishmanicida por arrastre de vapor
- Analizar la potencia y la eficacia leishmanicida de los aceites esenciales sobre *L. mexicana* y *L. infantum*.
- Identificar posibles dianas moleculares que interactúan con los compuestos bioactivos del aceite esencial con mayor potencia y eficacia leishmanicida, mediante herramienta de predicción ligando-proteínas.
- A partir de las dianas predichas, identificar las rutas metabólicas y de señalización, o procesos celulares, implicados en la apoptosis o muerte celular programada mediante análisis de enriquecimiento.

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, reactivos y equipos fueron suministrados por el laboratorio de investigación de

la Universidad Internacional SEK (UISEK): Tablas 1,2.

Tabla 1. Reactivos empleados

Nombre	Casa comercial
Medio de cultivo de insectos Schneider's Drosophila	Sigma Aldrich, S9895
Hidróxido de sodio 100% (NaOH)	Merck
Ácido clorhídrico 1% (HCL)	Merck
Cloruro de sodio 10% (NaCL)	J. T. Baker
Bicarbonato de sodio 99.7% (NaHCO ₃)	--
Cloruro de calcio dihidratado 99% (CaCl ₂ -2H ₂ O)	--
Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9% ((CH ₃) ₂ SO)	--
Suero fetal bovino inactivado	Eurobio scientific
Anfotericina B	Sigma-Aldrich (A2942)
Penicilina / Estreptomina	--
MTT	Sigma-Aldrich
Azul de tripán	--
SDS-HCL	--

Tabla 2. Equipos empleados

Equipo	Modelo	Marca
Cabina de flujo laminar	Miniflow 120	Instrulab Q
Incubadora 26°C	--	Memmert
Agitador magnético	--	--
Autoclave	25X-1	All American
Balanza analítica	BAS31PLUS	BOECO

PHmetro	ORION STAR A111	ThermoScientific
Bomba al vacío	R-300	BOECO
Microscopio binocular	CX-21	Olympus
Centrífuga	XC-2450	Premiere
Lector de microplacas	Multiskan Sky / Go	ThermoScientific
Refrigeradora	2015KLXB	Durex
Destilador industrial	--	--
Analizador de Humedad	BMAI50	BOECO
Refractómetro digital	BOE 32195	BOECO
Cromatógrafo de gases	7890	Agilent

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de las especies *M. hallii*, *S. molle* y *O. majorana* fueron proporcionados por la empresa Aromavida S.A. ubicada en Guayllabamba, en el norte Quito-Pichincha-Ecuador. A continuación, se explica la metodología empleada para la obtención de los extractos.

2.2.2. Preparación del material vegetal

Se realizó un proceso de selección de la materia vegetal en estado fresco, en donde se eliminaron las impurezas como tierra e insectos, dejándola apta para la extracción del aceite esencial.

2.2.3. Determinación de la humedad

Para determinar la humedad del material vegetal se empleó un Analizador de Humedad marca Boeco BMAI50. El equipo definió el peso exacto de la muestra del material vegetal que fue colocada en el plato, sometió la muestra a altas temperaturas y comprobó constantemente la pérdida de su masa. Los datos que arrojó el equipo corresponden al contenido de humedad de la muestra analizada.

2.2.4. Obtención de los aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales se llevó a cabo empleando un equipo de destilación. Se colocó agua en el tanque de cocción, que contenía una malla perforada sobre la cual se ubicó el material vegetal, a este método se le denomina destilación por arrastre de vapor de agua.

El vapor atraviesa el material vegetal, rompiendo las células oleíferas de las plantas y permitiendo así la volatilización de los componentes del aceite esencial hacia el serpentín del condensador, para posteriormente recolectar el condensado en un embudo de separación.

El proceso de destilación se realizó por aproximadamente tres horas, al finalizar este período el aceite esencial se separó del agua por decantación.

2.2.5. Rendimiento

Para calcular el porcentaje del rendimiento del aceite esencial, se correlacionó el volumen de aceite esencial obtenido en la destilación con la cantidad de materia vegetal procesada (Ecuación 1).

$$\%R = \frac{V \text{ (mL)}}{P \text{ (g)}} * 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Dónde: %R es el porcentaje de rendimiento, V es el volumen del aceite esencial extraído, P es el peso de la materia vegetal antes del proceso de destilación.

2.2.6. Densidad relativa

La densidad relativa del aceite esencial se determinó empleando la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998).

Se procedió a pesar un picnómetro vacío en una balanza analítica, en segundo lugar, se pesó el picnómetro conteniendo agua destilada a 20°C, por último, se realizó el mismo procedimiento con el aceite esencial en lugar del agua destilada. Con los valores resultantes se puede calcular la media y la desviación estándar de las muestras de los aceites esenciales.

La densidad relativa se obtiene con la Ecuación 2:

$$\rho = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde: ρ es la densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C, m_0 es la masa en gramos del picnómetro vacío, m_1 es masa en gramos del picnómetro con agua, m_2 es masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

2.2.7. Índice de refracción

El índice de refracción se realizó según la norma AFNOR NF T 75-112 (ISO 280: 1998); Para ello se empleó un refractómetro de mano, marca BOECO 32195. Primero se llevó a cabo la calibración del instrumento, constatando el valor del índice de refracción del agua destilada (1,3330). Después se colocó una gota de aceite esencial y se efectuó la lectura correspondiente. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 20°C.

2.2.8. Determinación de la composición química del aceite esencial por Cromatografía de gases

Este análisis se realizó en los Laboratorios Sarl Pyrenessences Analysis (Belcaire, Francia). La identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos de los aceites esenciales se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases Agilent serie 7890, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 (GC/MS).

Por otro lado, también se realizó una identificación cuantitativa de los compuestos de los aceites esenciales empleando un detector de ionización de llama Agilent serie 6890 (GC/FID).

En ambos casos se utilizó la columna de polietilenglicol de alta polaridad, VF WAX (60m × 0,25mm × 0,25 μ m). Las condiciones con las que se operó el programa de temperatura del horno del equipo fueron de 60 °C durante 5 min, con una rampa de 2°C/min hasta aumentar a 250°C. Se mantuvo a 250°C durante 15 min.

2.2.9. Preparación de la muestra

En el cromatógrafo de gases se inyectó 1 μ l de una solución de aceite esencial al 10% en hexano. Para contrastar los datos de retención en la cromatografía de gases, se emplearon hidrocarburos (alcanos de C8 a C29).

Se utilizó un sistema de inyección modo split con un radio de partición para aceite de 1:25 y radio de partición de hidrocarburos 1:1. La temperatura de la inyección en el cromatógrafo fue de 250°C. Se empleó el He como gas portador con una presión inicial nominal de 23 psi/MS y 30 psi/FID.

2.2.10. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos de los aceites esenciales mediante espectrometría de masas y en el detector de ionización de llama (FID)

En espectrometría de masas, los compuestos de los aceites esenciales se identificaron mediante el cálculo de sus índices de retención y se compararon los datos arrojados por la biblioteca interna del laboratorio Pyrenessences con la base de datos electrónica National Institute of Standards and Technology (NIST). También se usaron los espectros de masa de los compuestos del aceite esencial identificados por la base de datos NKS, los mismos que proporcionaron información sobre la estructura de las moléculas.

En el detector de ionización de llama, los porcentajes de cada uno de los compuestos se calcularon a partir de las áreas de los picos de los compuestos proporcionadas por el detector, no se utilizó un factor de corrección.

2.3. Métodos Bioinformáticos

2.3.1. Predicción de interacciones ligando-proteínas (Target Fishing)

Se realizó a partir de la lista de compuestos bioactivos de los aceites esenciales de las especies *M. hallii*, *S. molle* y *O. majorana*, previamente identificados por la cromatografía de gases. Se llevó a cabo una predicción ligando-proteínas para determinar las dianas relacionadas con cada uno de los compuestos por medio de las siguientes herramientas bioinformáticas: Similarity Ensemble Approach (25), MoltraPred (26), Swiss Target Prediction (27), TargetNet (28), Random Forest QSAR (29) y Polypharmacology Browser 2 (PPB2), PPB2-MQN (30), PPB2-Xfp (31), PPB2-ECfp4 (32). Así, se obtuvieron listas de dianas con sus respectivos valores de significancia estadística.

2.3.2. Agrupamiento de moléculas químicas (Clusterización)

Se llevó a cabo un agrupamiento de moléculas químicas por medio de la herramienta ChemMine (33) generando 2 diferentes grupos o clústeres de compuestos basados en agrupamiento jerárquico, el cual está basado en una construcción aglomerativamente jerárquica de grupos, basado en similitudes compuestas (estructurales y fisicoquímicas), usando descriptores de pares de átomos (Atom Pair) y el coeficiente de Tanimoto (34,35).

2.3.3. Normalización

Como cada herramienta bioinformática de target fishing usa diferentes métodos y ordenamientos en sus predicciones, llevamos a cabo una normalización para ajustar estos valores estadísticos medidos en diferentes escalas, respecto a una escala común. Se le asignó a cada proteína “i” en cada método de predicción “j” y para el compuesto “k” un número de ordenamiento ($ranking_{i,j}$) en función a su valor de significancia estadística. Con estos valores se calculó el puntaje de cada proteína “i” en el método “j” ($Score_{i,j,k}$) (Ecuación 3).

$$Score_{i,j,k} = \frac{(\max ranking_{j,k}) - ranking_{i,j,k}}{(\max ranking_{j,k}) - (\min ranking_{j,k})} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Posteriormente se realizó un consenso del puntaje final de cada proteína predicha “i” para cada compuesto “k” ($Final Score_{i,k}$) se calculó de acuerdo a la Ecuación 4:

$$Final Score_{i,k} = \sqrt{\frac{n_i}{N} \sum_{j=1}^N Score_{i,j,k}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde N es el número de métodos empleados (8) y n es el número de métodos que identificaron a la proteína “i”. Estas ecuaciones y el método empleado se encuentra detallado por López-Cortés y Tejera (36,37). Obteniendo finalmente una lista de proteínas predichas por todas las herramientas de *target fishing*, de cada compuesto bioactivo con la misma escala de puntaje estadístico.

A continuación, se llevó a cabo un segundo puntaje de todas las listas de proteínas predichas, esta vez teniendo en cuenta el número de clústeres y el número de compuestos por cada clúster, donde se reposicionaron aquellas proteínas que se encontraban en varias listas de predicción de cada compuesto que pertenecían al mismo clúster; obteniendo una lista final de posibles proteínas implicadas en el mecanismo de cada clúster de compuestos, en base a un mismo puntaje de significancia ($Final Score$).

Esta segunda puntuación de cada proteína “i” en cada clúster “m” ($Score_{F_{i,m}}$) se realizó mediante la Ecuación 5.

$$Score_{F_{i,m}} = \sqrt{\frac{nc}{nc_m} \sum_{k=1}^{nc_m} Final Score_{i,k}} \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde: n_c es el número de moléculas en el grupo “m” que interactúan con la proteína “i” y n_{c_m} es el número de moléculas en el grupo “m”.

2.3.4. Análisis de Enriquecimiento

Por medio de la plataforma David Bioinformatics (38), se realizó un análisis de enriquecimiento para identificar las dianas que se encuentran agrupadas o relacionadas entre sí en 2 tipos de enriquecimientos:

- Enriquecimiento biológico, de gene ontology (GO).
- Enriquecimiento biológico, de rutas metabólicas de la base de datos Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG).

De cada análisis se tomó en cuenta los valores de:

- Significación estadística (p-valor) del enriquecimiento.
- Enriquecimiento de pliegues (Fold Enrichment), el cual indica cuantas veces fue enriquecido el proceso biológico o ruta metabólica, en contraste con una selección aleatoria.
- Tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate, FDR), la cual indica la probabilidad de error tipo II en el análisis (39).
- Peso de los enriquecimientos (WP_x), ponderado de las rutas metabólicas y procesos biológicos enriquecidos (Ecuación 6) en función de las dianas que estaban presentes en cada proceso/ruta utilizando los valores ($Score_{F_{i,m}}$) obtenidos de cada diana en la normalización.

$$WP_x = \frac{\sum \text{score de diana presente en el proceso/ruta}}{\sum \text{score de diana humana del cluster}} \quad \text{Ecuación 6.}$$

En conjunto estos análisis nos permitieron determinar posibles mecanismos de acción involucrados con los compuestos bioactivos de *M. hallii*, *S. molle* y *O. majorana*.

2.4. Métodos de Cultivo Celular

2.4.1. Crecimiento de parásitos

L. mexicana y *L. infantum* fueron donados por la Universidad Central del Ecuador. Los promastigotes se mantuvieron en *flasks* para cultivo celular conteniendo 5mL de medio Schneider's Drosophila (Sigma-Aldrich, S9895), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS), más 1µg/mL de penicilina-estreptomicina como antibiótico(41–43). La temperatura de incubación de cultivo fue de 26°C (43). Los promastigotes se subcultivaron cada 3 o 4 días de cultivo, con una dosis de 300µL en 5mL de medio Schneider completo para *L. mexicana*; y 500µL en 5mL de medio Schneider completo para *L. infantum*.

2.4.2. Conteo de parásitos

Se realizaron alícuotas de 10µL de *L. mexicana* y *L. infantum* para posteriores diluciones. En *L. mexicana* las diluciones fueron 1/100 con PBS 1x, y se fijaron con formalina al 1%; mientras que en *L. infantum* las diluciones fueron 1/80 con PBS 1x. La tinción utilizada para el conteo de los parásitos fue 25µL de azul de tripán más 75µL de las diluciones señaladas anteriormente.

El número de promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* se determinaron mediante cámara de Neubauer bajo observación en un microscopio óptico. Los cálculos posteriores y elaboración de placa fue mediante la ecuación 7:

$$\text{Concentración de parásitos /mL} = \frac{NP \times 10000 \times fd \times VF}{4} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Donde: NP es el promedio de parásitos contados en los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer, fd es el factor de dilución, VF es el volumen final.

2.4.3. Ensayo de viabilidad celular MTT

Los promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* se cultivaron en *flasks* de cultivo celular con 5mL de medio Schneider's *Drosophila* completo (10% de suero fetal bovino y 1µg/mL de penicilina - estreptomycin) e incubados a 26°C. Los parásitos utilizados para conteo y plaqueo deben estar en fase estacionaria, es decir después del tercer o cuarto día.

La placa de 96 pocillos estéril contenía 1x10⁶ promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* en un volumen de 80µL por pocillo. Los extractos de los AE, *M. hallii*, *S. molle* y *O. majorana* en concentraciones crecientes fueron añadidos a los pocillos en un volumen de 20µL. Por lo tanto, el volumen final por pocillo fue de 100µL.

La distribución de la placa de 96 pocillos se realizó tal y como se describe en la figura 1. En cada placa se analizaron dos AE para una especie de *Leishmania*. Se incluyó un blanco (DMSO más medio de cultivo), un control negativo (*Leishmania* y DMSO más medio de cultivo), un control positivo (*Leishmania*, DMSO más medio de cultivo y anfotericina B en concentración de 250ug/mL) y los AE disueltos en DMSO en concentraciones crecientes (Figura 1). Todos los pocillos contenían la misma concentración de DMSO.

La placa se llevó a incubación a 26°C por 72h (42,44). Luego se añadió 10µL de solución MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5mg/mL) en cada pocillo y se incubó a 26°C por 3h (45). Después de este tiempo, se disolvieron los cristales de formazán creados por las células viables con 100µL de solución SDS-HCL (46) y se incubó a 26°C por 24h. Se realizó la lectura en un lector de placas a 570nm y 630nm.

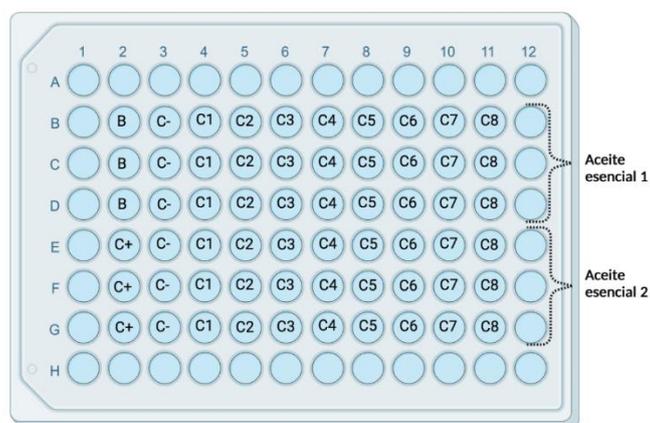


Figura 1. Diseño de placa para evaluar el efecto leishmanicida de los aceites esenciales en *L. mexicana* y *L. infantum* con concentraciones crecientes. B: blanco (DMSO más medio $1/100$). C+: control positivo (*Leishmania*, DMSO más medio $1/100$ y anfotericina B). C-: control negativo (*Leishmania*, DMSO más medio $1/100$). C1-C8: concentraciones crecientes de aceites esenciales y *Leishmania*.

2.5. Análisis Estadístico

De los resultados obtenidos de las placas, se calculó la media aritmética \pm desviación estándar. Para proceder con las comparaciones entre las diferentes concentraciones de aceites esenciales y el control negativo se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Dunnet comparando cada punto de concentración con el control negativo. En estos test estadísticos, se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la probabilidad de la hipótesis nula (P) fue menor o igual a 0.05. Los valores de P para las ANOVAs se reflejan numéricamente en las tablas o figuras. Para la elaboración de los gráficos y el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 9.

3. RESULTADOS

3.1. Composición y Características de las Plantas *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle*

3.1.1. Determinación de la humedad

El porcentaje de humedad de las hojas de la planta *M. hallii* fue de 61.52%, *O. majorana* de 68.26% y *S. molle* de 71.45%.

3.1.2. Propiedades físicas y organolépticas de los extractos de aceites esenciales

La tabla 3 nos permite observar todas las propiedades físicas y organolépticas de los AE de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle*, que pudieron ser identificadas.

Tabla3. Propiedades físicas de los AE de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle*

Características	<i>M. hallii</i>	<i>O. majorana</i>	<i>S. molle</i>
Rendimiento (%)	0.070	0.269	0.862
Aspecto	Fluido	Fluido	Fluido y
	límpido	límpido	límpido
Color	Verde	Amarillo	Amarillo
		claro	claro
Olor	Floral	Herbal y	Dulce y
		alcanforado	floral
Densidad (g/mL)	0.862	0.899	0.862
Índice de refracción	1.468	1.472	1.470

3.1.3. Composición química de los extractos de aceites esenciales

Mediante GC/MS se identificaron y reportaron los compuestos presentes en los aceites esenciales en concentraciones >0,01%. En el AE de *M. hallii* se identificaron 23 compuestos que representan el 83.09%, mientras que en el AE de *O. majorana* se encontraron 27 compuestos, que forman un total de 93.63%, y finalmente en el AE de *S. molle* se identificaron 19 compuestos que cubren un 91.70% de su composición.

En las tablas 4-6 se observan todos los compuestos de los AE mencionados previamente.

Tabla 4. Lista de compuestos de AE de *M. hallii*

Compuesto	%	TR (min)	Compuesto	%	TR (min)
α -PINENE	8,10	7,1	β -PINENE	5,79	9,3
β -MYRCENE	4,06	11,1	α -TERPINENE	0,92	11,7
LIMONENE	37,8 3	12,7	1,8-CINEOLE	3,10	13,0
β - PHELLANDRENE	1,02	13,1	γ -TERPINENE	3,07	14,4
TERPINOLENE	0,88	15,9	LINALOL	1,23	27,5

TERPINENE-4-OL	1,48	30,0	β -CARYOPHYLLENE	1,16	30,1
AROMADENDRENE	2,03	30,6	ALLO- AROMADENDRENE	0,92	32,1
ZONARENE	0,91	32,7	LEDENE	2,24	34,2
GERMACRENE D	0,72	34,7	δ -CADINENE	3,67	36,6
NEROLIDOL	1,13	46,8	GLOBULOL	1,38	48,2
ROSIFOLIOL	0,67	49,5	FARNESOL	0,52	56,9
PHYTOL	0,26	64,8			

Lista de compuestos del AE de *M. hallii* identificados por GC/MS. % indica el porcentaje de dicho compuesto presente en el AE; TR indica el tiempo de retención de cada compuesto, en minutos, dentro de los perfiles del cromatograma.

Tabla5. Lista de compuestos de AE de *O. majorana*

Compuesto	%	TR (min)	Compuesto	%	TR (min)
α -PINENE	0,67	6,0	ACETATE DE LINALYLE	4,42	20,3
SABINENE	6,67	7,9	Trans-p-MENTH-2- EN-1-OL	1,25	20,6
β -MYRCENE	1,91	8,9	TERPINENE-4-OL	20,19	21,7
α -TERPINENE	5,80	9,5	β -CARYOPHYLLENE	2,91	21,8
LIMONENE	1,86	10,0	Cis-p-MENTH-2-EN-1- OL	0,63	22,3
β -PHELLANDRENE	1,67	10,3	Cis-PIPERITOL	0,40	23,5
Cis- β -OCIMENE	0,54	10,9	α -TERPINEOL	3,07	24,1
γ -TERPINENE	10,35	11,3	BICYCLOGERMACREN E + Trans-PIPERITOL	2,51	25,2
p-CYMENE	0,66	12,0	ACETATE DE GERANYLE	0,42	25,4
TERPINOLENE	2,20	12,4	δ -CADINENE	0,47	25,6
Trans-THUYANOL	3,51	17,8	ELEMOL	0,90	32,8
E-SOLANONE	1,02	19,6	Epi-GLOBULOL	0,48	34,7
LINALOL	3,45	20,0	α -CADINOL	0,58	35,9
Cis-THUYANOL	15,09	20,2			

Lista de compuestos del AE de *O. majorana* identificados por GC/MS, % indica el porcentaje de dicho compuesto presente en el AE, TR indica el tiempo de retención de cada compuesto, en minutos, dentro de los perfiles del cromatograma.

Tabla6. Lista de compuestos de AE de *S. molle*

Compuesto	%	TR (min)	Compuesto	%	TR (min)
α -PINENE	5,39	9,8	GERMACRENE D	0,58	52,4
CAMPHENE	5,47	11,7	α -MUUROLENE	0,70	53,2
β -PINENE	2,15	13,7	BICYCLOGERMACRENE	1,04	53,9
β -MYRCENE	3,20	16,4	δ -CADINENE	2,75	55,1
α -PHELLANDRENE	39,38	16,8	GERMACRA-1,5-DIEN- 4-OL	0,67	71,4
LIMONENE	12,43	19,0	ELEMOL	1,57	72,7
β -PHELLANDRENE	11,03	19,7	T-CADINOL	0,88	77,4
PARACYMENE	0,80	23,3	α -MUUROLOL	0,54	78,3
β -CARYOPHYLLENE	1,71	45,5	α -CADINOL	1,03	80,5
α -HUMULENE	0,38	50,0			

Lista de compuestos del AE de *S. molle* identificados por GC/MS, % indica el porcentaje de dicho compuesto presente en el AE, TR indica el tiempo de retención de cada compuesto, en minutos, dentro de los perfiles del cromatograma.

3.2. Viabilidad Celular

Para analizar el efecto de los aceites esenciales de *M. hallii*, *S. molle* y *O. majorana* sobre el crecimiento de *Leishmania spp. in vitro* se realizó un ensayo MTT en el que se testaron concentraciones crecientes de los aceites y su efecto sobre la viabilidad celular de los promastigotes tras 72h.

El apartado A de las Figuras 2-7 nos muestra los valores de absorbancia promedio de cada ensayo MTT, realizados por triplicado. En el apartado B de las Figuras 2-7 observamos los valores medios \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm SD$) de la viabilidad de *L. infantum* y *L. mexicana* frente a diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle*, expresados en función del 100% de viabilidad correspondiente al control negativo. El rango de concentraciones de los aceites esenciales utilizados fue de 30 μ g/mL a 800 μ g/mL; excepto en el caso de los aceites esenciales de *O. majorana* y *S. molle* en *L. infantum*, cuyo rango de concentraciones fue de 200 μ g/mL a 800 μ g/mL.

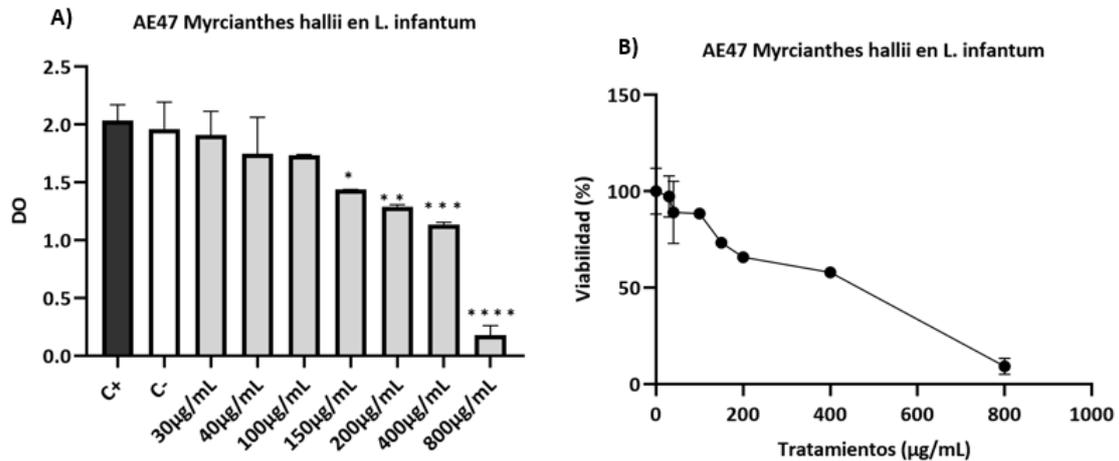


Figura 2. A) **Efecto del AE de *M. hallii* sobre la viabilidad de *L. infantum*.** Tras 72h de cultivo y ensayo de MTT. ANOVA p-value <0.0001. Comparaciones entre C- y Tratamientos: * = p-value 0.0346, ** = p-value 0.0066, *** = p-value 0.0005, ****=p-value < 0.0001. B) **Actividad leishmanicida del AE *M. hallii* en *L. infantum*.** Gráfica de porcentaje de supervivencia de los promastigotes en función de las diferentes concentraciones del aceite.

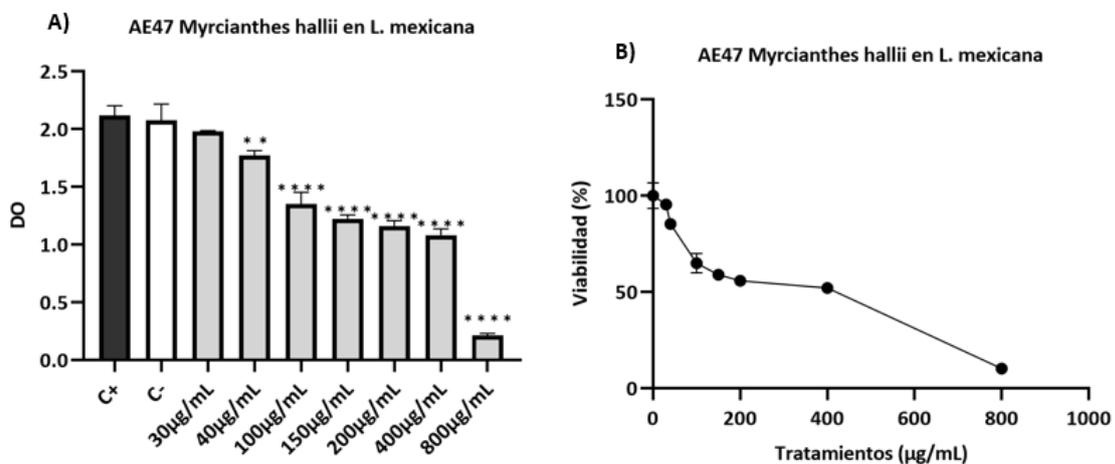


Figura 3. A) **Efecto del AE de *M. hallii* sobre la viabilidad de *L. mexicana*.** Tras 72h de cultivo y ensayo de MTT. ANOVA p-value <0.0001. Comparaciones entre C- y Tratamientos: ** = p-value 0.0048, ****=p-value < 0.0001. B) **Actividad leishmanicida del AE de *M. hallii* en *L. mexicana*.** Gráfica de porcentaje de supervivencia de los promastigotes en función de las diferentes concentraciones del aceite.

Como puede observarse en las Figuras 2A y 3A, el aceite de *M. hallii* redujo de manera significativa (ANOVA $P < 0.0001$) el crecimiento de ambas especies de parásitos. En el caso de *L. infantum*, los efectos fueron significativos a partir de 150µg/mL, mientras que en *L. mexicana*, los efectos fueron significativos a partir de 40µg/mL. Los efectos alcanzaron y superaron los del control positivo (anfotericina B) en ambas especies. A partir de estos valores de absorbancia, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad, en relación al control negativo, en función de las

mismas concentraciones y se representaron en las Figuras 2B Y 3B. La viabilidad se redujo hasta el 90.87% y 89.82% para *L. infantum* y *L. mexicana* respectivamente.

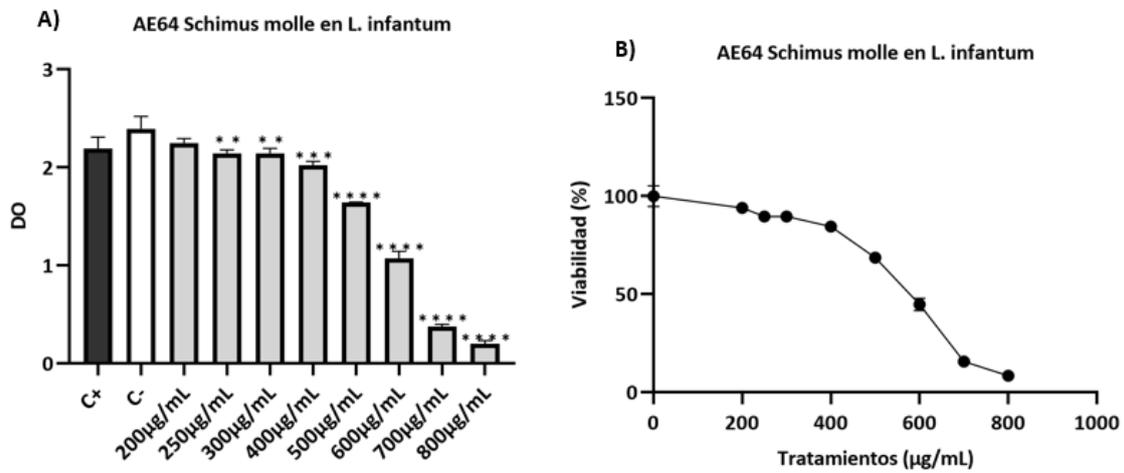


Figura 4. A) **Efecto del AE de *S. molle* sobre la viabilidad de *L. infantum*.** Tras 72h de cultivo y ensayo de MTT. ANOVA p-value <0.0001. Comparaciones entre C- y Tratamientos: ** = p-value 0.0033, *** = p-value 0.0001, ****=p-value < 0.0001. B) **Actividad leishmanicida del AE de *M. hallii* en *L. infantum*.**

Gráfica de porcentaje de supervivencia de los promastigotes en función de las diferentes concentraciones del aceite.

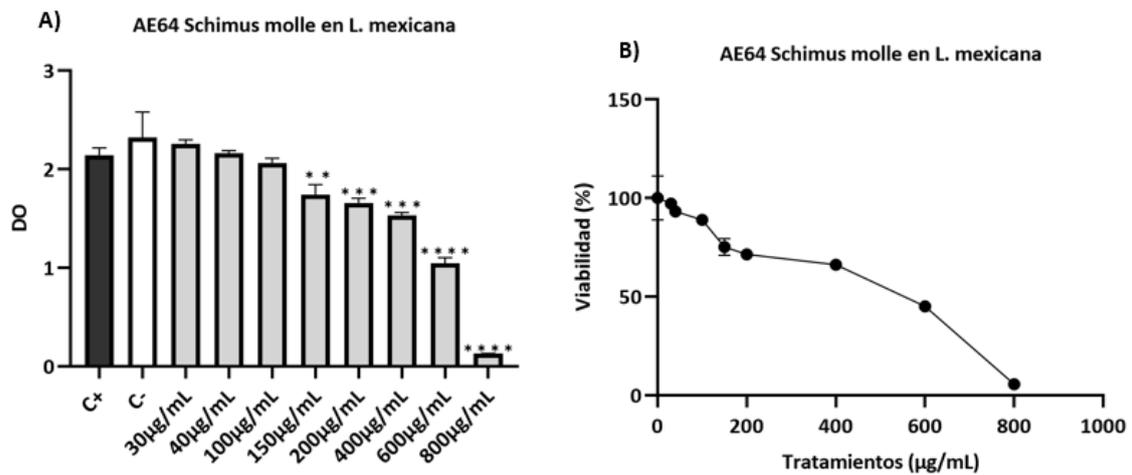


Figura 5. A) **Efecto del AE de *S. molle* sobre la viabilidad de *L. mexicana*.** Tras 72h de cultivo y ensayo de MTT. ANOVA p-value <0.0001. Comparaciones entre C- y Tratamientos: ** = p-value 0.0016, *** = p-value 0.0005, ****=p-value < 0.0001. B) **Actividad leishmanicida del AE de *M. hallii* en *L. mexicana*.**

Gráfica de porcentaje de supervivencia de los promastigotes en función de las diferentes concentraciones del aceite.

De igual manera, observamos en las Figuras 4A y 5A, que el aceite de *S. molle* redujo de manera significativa (ANOVA P < 0.0001) el crecimiento de ambas especies de parásitos. En el caso de *L.*

infantum, los efectos fueron significativos a partir de 250µg/mL, mientras que en *L. mexicana*, los efectos fueron significativos a partir de 150µg/mL. Los efectos alcanzaron y superaron los del control positivo (anfotericina B) en ambas especies. A partir de estos valores de absorbancia, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad, en relación al control negativo, en función de las mismas concentraciones y se representaron en las Figuras 4B Y 5B. La viabilidad se redujo hasta el 91.65% y 94.47% para *L. infantum* y *L. mexicana* respectivamente.

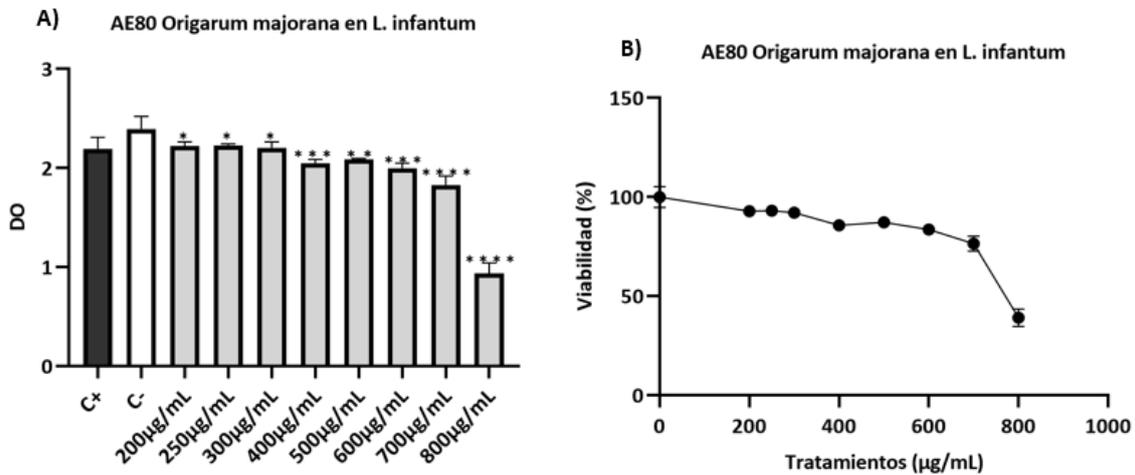


Figura 6. A) Efecto del AE de *O. majorana* sobre la viabilidad de *L. infantum*. Tras 72h de cultivo y ensayo de MTT. ANOVA p-value 0.0006. Comparaciones entre C- y Tratamientos: * = p-value 0.0398, ** = p-value 0.0018, *** = p-value 0.0002, ****=p-value < 0.0001. B) Actividad leishmanicida del AE de *M. hallii* en *L. infantum*. Gráfica de porcentaje de supervivencia de los promastigotes en función de las diferentes concentraciones del aceite.

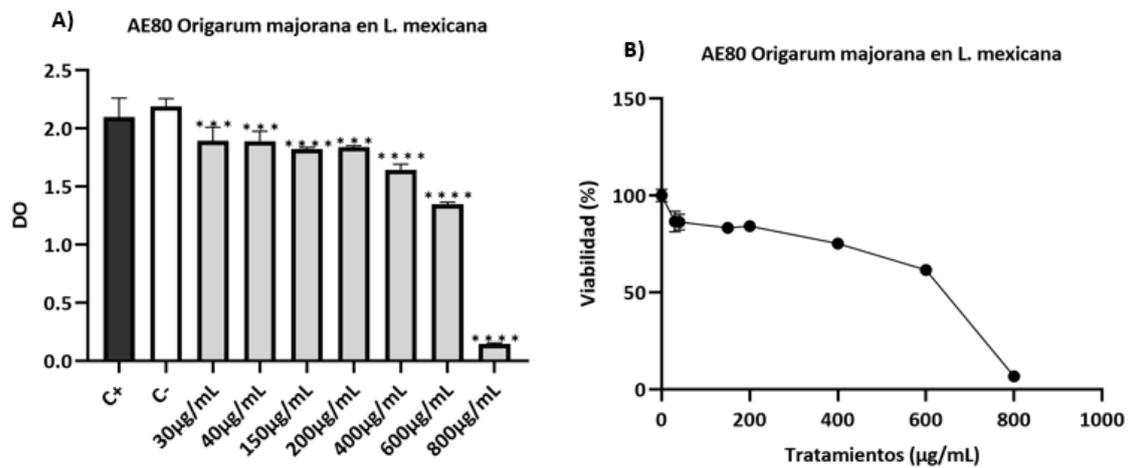


Figura 7. A) Efecto del AE de *O. majorana* sobre la viabilidad de *L. mexicana*. Tras 72h de cultivo y ensayo de MTT. ANOVA p-value <0.0001. Comparaciones entre C- y Tratamientos: *** = p-value 0.0001, ****=p-value < 0.0001. B) Actividad leishmanicida del AE de *M. hallii* en *L. mexicana*. Gráfica de

porcentaje de supervivencia de los promastigotes en función de las diferentes concentraciones del aceite.

En el caso de las Figuras 6A y 7A, observamos que el aceite de *O. majorana* redujo de manera significativa (ANOVA $P < 0.0001$) el crecimiento de ambas especies de parásitos. En el caso de *L. infantum*, los efectos fueron significativos a partir de $200\mu\text{g/mL}$, mientras que en *L. mexicana*, los efectos fueron significativos a partir de $30\mu\text{g/mL}$. Los efectos alcanzaron y superaron los del control positivo (anfotericina B) en ambas especies. A partir de estos valores de absorbancia, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad, en relación al control negativo, en función de las mismas concentraciones y se representaron en las Figuras 6B Y 7B. La viabilidad se redujo hasta el 73.98% y 93.28% para *L. infantum* y *L. mexicana* respectivamente.

De todas estas curvas obtenidas en los apartados B de las Figuras 2-7, solo las curvas de viabilidad de *M. hallii* (Figuras 4B y 5B) y las de *S. molle* (Figuras 2B y 5B) se pudo calcular los valores de CC50 (concentración citotóxica que causa el 50% de muerte celular, mediante regresiones lineales y no lineales con un coeficiente de determinación aceptable ($R^2 > 0.9$)).

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos a partir de las curvas de viabilidad

Ensayo	CC50 ($\mu\text{g/mL}$)	R ² del CC ₅₀	Tipo de Regresión
<i>M. Hallii</i> en <i>L. infantum</i>	420.99	0.9668	Lineal
<i>M. Hallii</i> en <i>L. mexicana</i>	222.88	0.9081	Logarítmica
<i>S. molle</i> en <i>L. infantum</i>	461.84	0.9433	Lineal
<i>S. molle</i> en <i>L. mexicana</i>	546.06	0.9368	Lineal

Como se observa en la Tabla 7, la potencia de los aceites es similar en casi todos los ensayos, a excepción de *M. hallii* siendo superior para *L. mexicana* ya que se alcanzó un CC₅₀ de la mitad de concentración que el resto de ensayos. Sin embargo, para este ensayo los datos no se ajustaron a una regresión lineal, sino logarítmica con un ajuste peor que en el resto de casos. Por eso, para realizar los análisis bioinformáticos se optó por el aceite esencial de *S. molle*.

3.3. Predicción de Posibles Dianas

A partir de la lista de compuestos de AE de *S. molle* obtenida por medio de GC/MS (Tabla 6), se seleccionaron los compuestos mayoritarios, mayores al 1% (Tabla 8), con los cuales, mediante diferentes servicios web, se predijeron largas listas de dianas que estarían vinculadas con uno o más de los compuestos bioactivos del AE de *S. molle* (ver Tabla 17, en Anexos). Estos resultados mostraron un total de 452 dianas predichas, normalizadas, en los 12 compuestos por medio de los 8 servicios web.

Tabla 8. Lista de compuestos mayoritarios del aceite esencial de *S. molle*

Código	Compuesto	Extracto (%)	Smile
AE64-1	α -PINENE	5,39	<chem>CC1=CCC2CC1C2(C)C</chem>
AE64-2	CAMPHENE	5,47	<chem>CC1(C2CCC(C2)C1=C)C</chem>
AE64-3	β -PINENE	2,15	<chem>CC1(C2CCC(=C)C1C2)C</chem>
AE64-4	β -MYRCENE	3,20	<chem>CC(=CCCC(=C)C=C)C</chem>
AE64-5	α -PHELLANDRENE	39,38	<chem>CC1=CCC(C=C1)C(C)C</chem>
AE64-6	LIMONENE	12,43	<chem>CC1=CCC(CC1)C(=C)C</chem>
AE64-7	β -PHELLANDRENE	11,03	<chem>CC(C)C1CCC(=C)C=C1</chem>
AE64-8	β -CARYOPHYLLENE	1,71	<chem>C/C/1=C\CCC(=C)[C@H]2 CC([C@@H]2CC1)(C)C</chem>
AE64-9	BICYCLOGERMACRENE	1,04	<chem>C/C/1=C\CC/C(=C/[C@H] 2[C@H](C2(C)C)CC1)/C</chem>
AE64-10	δ -CADINENE	2,75	<chem>CC1=C[C@H]2[C@@H](C CC(=C2CC1)C)C(C)C CC(=C)[C@@H]1C[C@@</chem>
AE64-11	ELEMOL	1,57	<chem>H](CC[C@@]1(C)C=C)C(C) (C)O CC1=C[C@H]2[C@@H](C</chem>
AE64-12	α -CADINOL	1,03	<chem>C[C@@]([C@@H]2CC1)(C)O)C(C)C</chem>

Lista de compuestos mayoritarios identificados por cromatografía de gases, códigos generados a partir de la numeración de las aceites proporcionadas por AROMAVIDA, formato SMILES utilizado como notación para la descripción de estructuras químicas bidimensionales(47).

3.4. Clusterización

A fin de realizar análisis de enriquecimiento más precisos se llevó a cabo una clusterización

jerárquica de moléculas químicas, obteniendo 2 clusters (grupos o conjuntos) de moléculas, el clúster 1 (tonos azules) formado por 7 moléculas y el clúster 2 (tonos rojo - anaranjados) formado por 5 moléculas como se observa en la Figura 8.

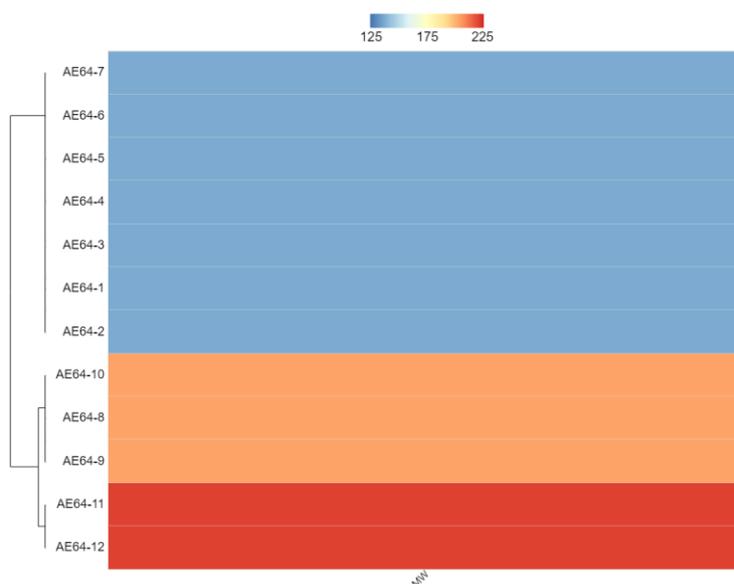


Figura 8. Resultados obtenidos de la clusterización llevada a cabo con la herramienta ChemMine.

En base a los ScoreF (puntajes) obtenidos por medio de la normalización y los grupos obtenidos por la clusterización, se obtuvo un total de 408 proteínas predichas en el clúster 1 y 292 proteínas predichas en el clúster 2.

Dado que casi todos los mecanismos de muerte celular son similares en las células eucariotas humanas y los protozoos (1), podemos inferir que los resultados a partir de proteínas humanas predichas, tendrán un efecto similar en *Leishmania spp.*, enfocándonos en efectos apoptóticos.

3.5. Análisis de Enriquecimiento

A partir del análisis de enriquecimiento de las dianas predichas (Tablas 9 y 10) observamos casi los mismos procesos biológicos en los clústeres 1 y 2, reforzando de esta manera la alta interacción entre los compuestos de los 2 clústeres del aceite esencial, y las proteínas de dichos procesos biológicos.

Tabla 9. Procesos biológicos enriquecidos a partir de las dianas predichas del clúster 1.

Código	Procesos Biológicos	Fold Enrichment	WPx	P Value	FDR
--------	---------------------	-----------------	-----	---------	-----

	Regulación negativa				
GO:0043066	del proceso apoptótico	2.98	6.49E-02	2.43E-06	9.25E-05
GO:0006915	Proceso apoptótico	2.78	6.98E-02	3.31E-06	1.19E-04
	Regulación positiva				
GO:0043065	del proceso apoptótico	3.31	5.62E-02	3.49E-05	9.00E-04
	Regulación negativa				
GO:0043524	del proceso apoptótico de la neurona	4.58	2.22E-02	6.54E-05	1.49E-03
	Regulación positiva				
GO:0043525	del proceso apoptótico de la neurona	7.67	2.26E-02	7.85E-05	1.77E-03
	Vía de señalización				
GO:0097191	apoptótica extrínseca	8.13	1.28E-02	2.08E-04	3.70E-03

Lista de procesos biológicos asociados a la apoptosis, pertenecientes al clúster 1, con FDR<0,01 y P value altamente significativo.

Tabla 10. Procesos biológicos enriquecidos a partir de las dianas predichas del clúster 2.

Código	Proceso Biológico	Fold Enrichment	WPx	P Value	FDR
GO:0043065	Regulación positiva del proceso apoptótico	4.0	6.25E-02	6.24E-07	3.76E-05
	Regulación negativa				
GO:0043066	del proceso apoptótico	2.9	6.78E-02	1.70E-05	5.24E-04
	Regulación positiva del				
GO:0043525	proceso apoptótico de la neurona	8.4	2.40E-02	4.40E-05	1.20E-03
GO:0006915	Proceso apoptótico	2.6	6.81E-02	5.10E-05	1.34E-03

Lista de procesos biológicos asociados a la apoptosis, pertenecientes al clúster 2, con FDR<0,01 y P value altamente significativo.

De la misma manera, a partir del análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas (Tablas 11 y 12) observamos casi las mismas rutas metabólicas en los clústeres 1 y 2, reforzando de esta manera la alta interacción entre los compuestos de los 2 clústeres del aceite esencial, y las proteínas de dichos procesos biológicos.

Tabla 11. Rutas metabólicas enriquecidas de la base de datos KEGG a partir de las dianas predichas del clúster 1.

Código	Ruta Metabólica	Fold Enrichment	WPx	P Value	FDR
hsa04020	Vía de señalización de calcio	3.9	1.16E-01	2.33E-11	1.52E-09
hsa04024	Vía de señalización de AMPc	3.7	9.17E-02	1.27E-09	4.16E-08
hsa00590	Metabolismo del ácido araquidónico	5.9	4.85E-02	1.43E-06	3.11E-05
hsa04750	Regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP	3.7	3.08E-02	2.01E-04	2.19E-03
hsa04659	Diferenciación de células Th17	3.3	3.45E-02	5.00E-04	3.92E-03
hsa00591	Metabolismo del ácido linoleico	6.7	2.30E-02	5.00E-04	3.92E-03
hsa04540	Unión gap	3.4	2.70E-02	1.22E-03	7.73E-03

Lista de rutas metabólicas asociadas a la apoptosis, pertenecientes al clúster 1, con FDR<0,01 y Pvalue altamente significativo.

Tabla 12. Rutas metabólicas enriquecidas de la base de datos KEGG a partir de las dianas predichas del clúster 2.

Código	Ruta Metabólica	Fold Enrichment	WPx	P Value	FDR
hsa04024	Vía de señalización de AMPc	4.2	9.32E-02	7.32E-11	4.36E-09
hsa04020	Vía de señalización de calcio	3.9	1.13E-01	5.45E-10	2.16E-08

hsa00590	Metabolismo del ácido araquidónico	6.6	4.84E-02	4.03E-07	1.20E-05
hsa04750	Regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP	4.1	3.47E-02	6.52E-05	1.11E-03
hsa04659	Diferenciación de células Th17	3.7	3.85E-02	1.68E-04	2.36E-03

Lista de rutas metabólicas asociadas a la apoptosis, pertenecientes al clúster 2, con FDR<0,01 y P value altamente significativo.

4. DISCUSIÓN

4.1. Análisis *in vitro*

En la presente investigación evidenciamos cómo los AE de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle* provocan una notable inhibición en el crecimiento de promastigotes de *L. infantum* y *L. mexicana*. La actividad anti-parasitaria de estos aceites se ha observado en especies de como *T. cruzi* y *Leishmania spp.* (14,20,21,23,24). Sin embargo, la información acerca de este tipo de extractos sigue siendo limitada, ya que en la mayoría de estudios se centran en moléculas individuales, e incluso en alcaloides obtenidos a partir de síntesis o modificación química.

4.2. Análisis *in silico*

Los resultados del análisis de enriquecimiento (Tablas 9-12) mostraron una alta similitud de dianas predichas entre ambos clústeres, por lo que, tanto los datos enriquecidos, como los datos integrados fueron casi similares, dándonos a entender que el proceso de clusterización no fue significativo ni necesario con estos 12 compuestos que conforman el AE de *S. molle*.

El análisis de enriquecimiento identificó 3 procesos biológicos que están directamente relacionados con la apoptosis (Tablas 9 y 10): Proceso apoptótico (GO:0006915), Regulación positiva del proceso apoptótico (GO:0043065) y Regulación negativa del proceso apoptótico (GO:0043524).

En Gene Ontology (GO), el proceso apoptótico (GO:0006915) se define como un proceso de muerte celular programada que comienza cuando una célula recibe una señal interna o externa, luego, seguido de una serie de eventos bioquímicos, en las que participan múltiples fases de señalización, se activa una fase de ejecución. Cuando se completa la fase de ejecución, la célula muere (48). A pesar de que observamos un mismo número de proteínas predichas según el valor WPx, que están dentro de los procesos de regulación positiva y negativa de apoptosis, varios

estudios mencionan el efecto citotóxico, a través de la inducción de la apoptosis de *Schinus spp.* frente a parásitos y otras enfermedades (22,49–51); sin embargo, en estos estudios solo se confirma una regulación positiva (inducción), pero no algún efecto inhibitorio de la apoptosis.

Por otro lado, las tablas 11 y 12 indican las 4 mismas rutas metabólicas con valores significativos de enriquecimiento que se relacionan con la apoptosis: vía de señalización de calcio, vía de señalización de AMPc, metabolismo del ácido araquidónico y regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP.

En el caso de la vía de señalización de calcio, este juega un papel importante durante la apoptosis intrínseca, ya que el exceso de calcio (Ca^{+2}) mitocondrial puede desencadenar la apoptosis. Mientras que en la vía extrínseca de la apoptosis, la liberación de Ca^{+2} del retículo endoplasmático es el principal mecanismo que regula la apoptosis (52). Mientras que en la vía de señalización de AMPc, los agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico), inducen la apoptosis en células inmunológicas y cancerígenas; además se obtienen altos niveles de apoptosis al exponer células humanas a compuestos análogos de AMPc (53). Del metabolismo del ácido araquidónico, se sabe que el ácido éste induce la apoptosis en las células epiteliales, células endoteliales e implica la activación de la caspasa 3 (54). En lo que respecta a los canales TRP (Potencial de Receptor Transitorio), se ha demostrado que el dominio del canal TRPM7 está involucrado en procesos apoptóticos, mientras que, los canales TRPM2 están involucrados en la proliferación y apoptosis de neutrófilos aislados de pacientes con enfermedades no transmisibles (55,56).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Los aceites esenciales de *M. hallii*, *O. majorana* y *S. molle* poseen actividad leishmanicida sobre *L. infantum* y *L. mexicana*.
 - El aceite esencial de *S. molle* es el aceite con mayor potencia y eficacia sobre ambas especies.
 - La especie más susceptible a los aceites esenciales de a los aceites de *O. majorana* y *S. molle* es *L. mexicana*, mientras que para el aceite *M. hallii* es *L. infantum*.
- De los estudios *in silico* inferimos que los efectos observados podrían deberse a una inducción de la muerte celular programada a partir de la interacción de los compuestos del aceite *S. molle* con los siguientes procesos biológicos y rutas metabólicas:
 - Proceso apoptótico.

- Regulación positiva del proceso apoptótico.
- Regulación negativa del proceso apoptótico.
- Vía de señalización de calcio.
- Vía de señalización de AMPc.
- Metabolismo del ácido araquidónico.
- Regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP.

5.2. Recomendaciones

- Estudios *in vivo* en ratones para testear la efectividad leishmanicida de los aceites esenciales:
 - Ratones Balbc infectados en las almohadillas de las patas tratados con fármacos de referencia, sin tratar y tratados con aceites esenciales.
 - Observación de la lesión.
 - Determinación de marcadores proinflamatorios
- Análisis *in silico* del resto de aceites para conocer los mecanismos moleculares y celulares tras los efectos.
- Llevar a cabo estudios de dinámica molecular para la interacción entre las dianas específicas.
- Validación *in vitro* de las dianas predichas *in silico*:
 - Análisis de la expresión genética de las proteínas diana que intervienen en los procesos biológicos o rutas metabólicas obtenidas en los análisis *in silico*.
 - Uso de inhibidores específicos para los procesos biológicos o rutas metabólicas obtenidas *in silico* para verificar que los efectos se deben a la activación de los mismos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Mondêgo-Oliveira R, de Sá Sousa JC, Moragas-Tellis CJ, de Souza PVR, dos Santos Chagas M do S, Behrens MD, et al. Vernonia brasiliiana (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of Leishmania infantum promastigotes. Biomed Pharmacother [Internet]. 2021 Jan;133:111025. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220312178>
2. Rodrigues KADF, Amorim LV, Dias CN, Moraes DFC, Carneiro SMP, Carvalho FADA. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. J Ethnopharmacol [Internet]. 2015 Feb;160:32–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>
3. Martín-Sánchez J, Rodríguez-Granger J, Morillas-Márquez F, Merino-Espinosa G, Sampedro A, Aliaga L, et al. Leishmaniasis due to Leishmania infantum: Integration of

- human, animal and environmental data through a One Health approach. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2020 Nov 29;67(6):2423–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.13580>
4. Castro Jalca JE, Ávila-Leal A, Bracho-Mora A. Estudio preliminar de leishmaniasis cutánea en áreas no endémicas de la zona sur de Manabí, Ecuador. *Kasmera* [Internet]. 2019;47(2):144–7. Available from: <http://produccioncientificaluz.org/index.php/kasmera/article/view/27380/html>
 5. Yimer M, Nibret E, Yismaw G. Updates on Prevalence and Trend Status of Visceral Leishmaniasis at Two Health Facilities in Amhara Regional State, Northwest Ethiopia: A Retrospective Study. Aziz A ur R, editor. *Biochem Res Int* [Internet]. 2022 Apr 15;2022(January):1–7. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2022/3603892/>
 6. Morales D, Paredes M, Morales-Butler EJ, Cruz-Aponte M, Arriola L, Cevallos V, et al. Data scarcity and ecological complexity: the cutaneous leishmaniasis dynamics in Ecuador. *J R Soc Interface* [Internet]. 2019 Aug 28;16(157):20190141. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2019.0141>
 7. Muñoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SGP, Gsell P-S, Riveros-Balta AX, Albrecht RA, et al. Animal models for COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020 Oct 22;586(7830):509–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2787-6>
 8. Pinto-Martinez AK, Rodriguez-Durán J, Serrano-Martin X, Hernandez-Rodriguez V, Benaim G. Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca²⁺ Channel. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 Jan;62(1):1–10. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01614-17>
 9. Gonçalves G, Campos MP, Gonçalves AS, Medeiros LCS, Figueiredo FB. Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. *Parasit Vectors* [Internet]. 2021 Dec 9;14(1):599. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05100-x>
 10. Alpizar-Sosa EA, Ithnin NRB, Wei W, Pountain AW, Weidt SK, Donachie AM, et al. Amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*: Alterations to sterol metabolism, lipid transport and oxidative stress response. *bioRxiv* [Internet]. 2021;12.08.471712. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05100-x>
 11. Dalton GD, Xie J, An S-W, Huang C-L. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2017 Nov 17;8(NOV):1–19.

- Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00323/full>
12. Kumar Saha A, Mukherjee T, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1986 Jun;19(3):195–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166685186900010>
 13. Basmacıyan L, Azas N, Casanova M. A potential acetyltransferase involved in *Leishmania* major metacaspase-dependent cell death. *Parasit Vectors* [Internet]. 2019 Dec 27;12(1):266. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3526-4>
 14. Güler E, Özbilgin A, Çavuş İ, Baddal B, Etikan İ, Başer KHC, et al. *In vitro* Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Growing in Northern Cyprus Against *Leishmania tropica*. *Turkish J Parasitol* [Internet]. 2021 Jun 7;45(2):101–7. Available from: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_47625/TPD-45-101-En.pdf
 15. Da Silva BJM, Hage AAP, Silva EO, Rodrigues APD. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. *J Integr Med* [Internet]. 2018 Jul;16(4):211–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.04.004>
 16. Fiseha A, Tadesse M, Bekele T, Bedemo B. Phytochemical investigations of *Vernonia galamensis* seeds. *Chem Nat Compd* [Internet]. 2010 Nov 6;46(5):692–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10600-010-9717-z>
 17. Zouari N. Essential Oils Chemotypes: A Less Known Side. *Med Aromat Plants* [Internet]. 2013;02(02). Available from: <https://www.omicsgroup.org/journals/essential-oils-chemotypes-a-less-known-side-2167-0412.1000e145.php?aid=10944>
 18. Santana RC, Rosa A dos S, Mateus MH da S, Soares DC, Atella G, Guimarães AC, et al. *In vitro* leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of Protium (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2020 Sep;259:112981. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112981>
 19. Candy K, Akhoundi M, Andriantsoanirina V, Durand R, Bruel C, Izri A. Essential Oils as a Potential Treatment Option for Pediculosis. *Planta Med* [Internet]. 2020 Jun 4;86(09):619–30. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1161-9189>
 20. Monzote L, Piñón A, Setzer W. Antileishmanial Potential of Tropical Rainforest Plant Extracts. *Medicines* [Internet]. 2014 Nov 19;1(1):32–55. Available from: <http://www.mdpi.com/2305-6320/1/1/32>
 21. Teles AM, Rosa TDDS, Mouchrek AN, Abreu-Silva AL, Da Silva Calabrese K, Almeida-Souza F. *Cinnamomum zeylanicum*, *origanum vulgare*, and *curcuma longa* essential oils: Chemical composition, antimicrobial and antileishmanial activity. Evidence-based

- Complement Altern Med. 2019;2019.
22. Martins MDR, Arantes S, Candeias F, Tinoco MT, Cruz-Morais J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2014 Jan;151(1):485–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.063>
 23. Duarte JA, Zambrano LA de B, Quintana LD, Rocha MB, Schmitt EG, Boligon AA, et al. Immunotoxicological Evaluation of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) Essential Oil in Lymphocytes and Macrophages. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2018 Oct 16;2018:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/6541583/>
 24. Pérez-treviño KC, Molina-Garza Z, Galaviz-Silva L. Evaluación de la actividad anti-trypanosomal de extractos metanólicos de plantas con uso medicinal. In: *Entomologia mexicana* [Internet]. 2017. p. 557–60. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/7/1368>
 25. Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2007;25(2):197–206. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt1284>
 26. Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester PJ. Predicting the Reliability of Drug-target Interaction Predictions with Maximum Coverage of Target Space. 2017;
 27. Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(W1):32–8.
 28. Yao Z-J, Dong J, Che Y-J, Zhu M-F, Wen M, Wang N-N, et al. TargetNet: a web service for predicting potential drug–target interaction profiling via multi-target SAR models. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2016 May 11;30(5):413–24. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10822-016-9915-2>
 29. Lee K, Lee M, Kim D. Utilizing random Forest QSAR models with optimized parameters for target identification and its application to target-fishing server. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2017 Dec 28;18(S16):567. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-017-1960-x>
 30. Nguyen KT, Blum LC, van Deursen R, Reymond J-L. Classification of Organic Molecules by Molecular Quantum Numbers. *ChemMedChem* [Internet]. 2009 Nov 2;4(11):1803–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.200900317>
 31. Awale M, Reymond J-L. Atom Pair 2D-Fingerprints Perceive 3D-Molecular Shape and Pharmacophores for Very Fast Virtual Screening of ZINC and GDB-17. *J Chem Inf Model*

- [Internet]. 2014 Jul 28;54(7):1892–907. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci500232g>
32. Rogers D, Hahn M. Extended-Connectivity Fingerprints. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2010 May 24;50(5):742–54. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci100050t>
 33. Backman TWH, Cao Y, Girke T. ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011 Jul 1;39(suppl):W486–91. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr320>
 34. Cao Y, Jiang T, Girke T. A maximum common substructure-based algorithm for searching and predicting drug-like compounds. *Bioinformatics*. 2008;24(13):366–74.
 35. Chen X, Reynolds CH. Performance of Similarity Measures in 2D Fragment-Based Similarity Searching: Comparison of Structural Descriptors and Similarity Coefficients. *J Chem Inf Comput Sci* [Internet]. 2002 Nov 1;42(6):1407–14. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci025531g>
 36. Tejera E, Cruz-Monteagudo M, Burgos G, Sánchez ME, Sánchez-Rodríguez A, Pérez-Castillo Y, et al. Consensus strategy in genes prioritization and combined bioinformatics analysis for preeclampsia pathogenesis. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2017;10(1):1–19. Available from: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-017-0286-x>
 37. López-Cortés A, Paz-y-Miño C, Cabrera-Andrade A, Barigye SJ, Munteanu CR, González-Díaz H, et al. Gene prioritization, communality analysis, networking and metabolic integrated pathway to better understand breast cancer pathogenesis. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-35149-1>
 38. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA, Lempicki RA. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat Protoc*. 2009;(301):1–43.
 39. Chen X, Robinson DG, Storey JD. The functional false discovery rate with applications to genomics. *Biostatistics* [Internet]. 2019;1–14. Available from: <https://academic.oup.com/biostatistics/advance-article/doi/10.1093/biostatistics/kxz010/5499195>
 40. Antonov A V. BioProfiling.de: Analytical web portal for high-throughput cell biology. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011;39(SUPPL. 2):323–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125774/#B17>
 41. Andrade MA, Azevedo C dos S, Motta FN, Santos ML dos, Silva CL, Santana JM de, et al. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2016 Dec 8;16(1):444. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>

42. Machado M, Santoro G, Sousa MC, Salgueiro L, Cavaleiro C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour Fragr J*. 2010;25(3):156–60.
43. Montalvo A, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2012;64(2):108–31. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v64n2/mtr02212.pdf>
44. Monzote L, Herrera I, Satyal P, Setzer W. In-Vitro Evaluation of 52 Commercially-Available Essential Oils Against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* [Internet]. 2019 Mar 30;24(7):1248. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/7/1248>
45. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int* [Internet]. 2005 Jun;54(2):119–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576905000243>
46. Buranaamnuay K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols. *Open Vet J* [Internet]. 2021;11(2):251. Available from: <https://www.ejmanager.com/fulltextpdf.php?mno=50208>
47. Weininger D. SMILES, a Chemical Language and Information System. 1. Introduction to Methodology and Encoding Rules. *J Chem Inf Comput Sci* [Internet]. 1988;28:31–6. Available from: <http://organica1.org/seminario/smile1988.pdf>
48. Feuermann M, Gaudet P, Mi H, Lewis SE, Thomas PD. Large-scale inference of gene function through phylogenetic annotation of Gene Ontology terms: case study of the apoptosis and autophagy cellular processes. *Database* [Internet]. 2016 Dec 26;2016:baw155. Available from: <https://academic.oup.com/database/article-lookup/doi/10.1093/database/baw155>
49. Hailan WA, Al-Anazi KM, Farah MA, Ali MA, Al-Kawmani AA, Abou-Tarboush FM. Reactive Oxygen Species-Mediated Cytotoxicity in Liver Carcinoma Cells Induced by Silver Nanoparticles Biosynthesized Using *Schinus molle* Extract. *Nanomaterials* [Internet]. 2022 Jan 3;12(1):161. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/1/161>
50. Delgado-Altamirano R, Monzote L, Piñón-Tápanes A, Vibrans H, Rivero-Cruz JF, Ibarra-Alvarado C, et al. In vitro antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. *Heliyon* [Internet]. 2017 Sep;3(9):e00394. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00394>
51. Morais T, da Costa-Silva T, Tempone A, Borborema S, Scotti M, de Sousa R, et al. Antiparasitic Activity of Natural and Semi-Synthetic Tirucallane Triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. *Molecules*

- [Internet]. 2014 May 5;19(5):5761–76. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/5/5761>
52. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, et al. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 6;21(21):8323. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8323>
 53. Myklebust JH, Josefsen D, Blomhoff HK, Levy FO, Naderi S, Reed JC, et al. Activation of the CAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. *J Cell Physiol* [Internet]. 1999 Jul;180(1):71–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4652%28199907%29180%3A1%3C71%3A%3AAID-JCP8%3E3.3.CO%3B2-E>
 54. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021 Dec 26;6(1):94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
 55. Parenti A, De Logu F, Geppetti P, Benemei S. What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Mar;173(6):953–69. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5341240/>
 56. Zhong T, Zhang W, Guo H, Pan X, Chen X, He Q, et al. The regulatory and modulatory roles of TRP family channels in malignant tumors and relevant therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2022 Apr;12(4):1761–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.001>
 57. Waddell HMM, Zhang JZ, Hoeksema KJ, McLachlan JJ, McLay JC, Jones PP. Oxidation of RyR2 Has a Biphasic Effect on the Threshold for Store Overload-Induced Calcium Release. *Biophys J* [Internet]. 2016 Jun;110(11):2386–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.036>
 58. Zhu J, Langer P, Ulrich C, Eberle J. Crucial Role of Reactive Oxygen Species (ROS) for the Proapoptotic Effects of Indirubin Derivatives in Cutaneous SCC Cells. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Sep 24;10(10):1514. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/10/1514>

7. ANEXOS

Materials

Materiales	Descripción
Flasks con ventilación	25mL
Tubos falcon	15mL & 50mL
Tubos eppendorf	1,5mL & 2mL
Placas de 96 pocillos	--
Puntas	10µL, 100µL & 1000µL
Frasco tarado	500mL
Placas Petri de vidrio	--
Espátulas	--
Vaso de precipitación	25mL, 100mL, 250mL 500mL & 1000mL
Parafilm	--
Probetas de plástico	5mL
Filtros	0.45 microns
Agua destilada	--
Equipo de Kitasato	pinzas, pinzas, Kitasato, embudo

Tabla 13. Lista de materiales utilizados para los ensayos in vitro dentro de laboratorio.

Dianas Predichas por Predicción de Interacciones ligando-proteínas			
UNIPROT ID	UNIPROT ID	UNIPROT ID	UNIPROT ID
5HT1A_HUMAN	CDK9_HUMAN	HRH3_HUMAN	PE2R2_HUMAN
5HT1A_RAT	CDKL2_HUMAN	HRH3_RAT	PE2R2_MOUSE
5HT1B_HUMAN	CHLE_HORSE	HRH4_HUMAN	PE2R3_MOUSE
5HT1B_RAT	CILK1_HUMAN	HS90A_HUMAN	PE2R4_HUMAN
5HT1D_HUMAN	CLK1_HUMAN	HS90B_HUMAN	PE2R4_MOUSE
5HT1E_HUMAN	CLK4_HUMAN	HYEP_HUMAN	PEN2_HUMAN
5HT1F_HUMAN	CNR1_HUMAN	HYES_HUMAN	PF2R_HUMAN
5HT2A_HUMAN	CNR1_RAT	I23O1_HUMAN	PGDH_HUMAN
5HT2A_RAT	CNR2_HUMAN	ICAM1_HUMAN	PGFRB_MOUSE
5HT2B_HUMAN	CNR2_MOUSE	ICMT_HUMAN	PGH1_HUMAN
5HT2C_HUMAN	CNR2_RAT	IL6_HUMAN	PGH1_SHEEP
5HT2C_RAT	COT2_HUMAN	IMDH2_HUMAN	PGH2_HUMAN
5HT3A_HUMAN	CP17A_HUMAN	INMT_HUMAN	PGH2_MOUSE
5HT3A_RAT	CP19A_HUMAN	IRAK4_HUMAN	PGH2_SHEEP
5HT4R_RAT	CP1A2_HUMAN	ITA2B_HUMAN	PIM1_HUMAN

5HT5A_HUMAN	CP2A6_HUMAN	JAK1_HUMAN	PIN1_HUMAN
5HT6R_HUMAN	CP2B6_HUMAN	JAK2_HUMAN	PLIN1_HUMAN
5HT6R_RAT	CP2C9_HUMAN	KCNA3_HUMAN	PLIN5_HUMAN
5HT7R_HUMAN	CP2CJ_HUMAN	KCNA5_HUMAN	PLK1_HUMAN
5HT7R_RAT	CP2D6_HUMAN	KCNH2_HUMAN	PNMT_HUMAN
A4_HUMAN	CP3A4_HUMAN	KDM1A_HUMAN	PPARA_HUMAN
AA1R_BOVIN	CRFM7_HUMAN	KDM4A_HUMAN	PPBT_HUMAN
ABC3A_HUMAN	CRFR1_HUMAN	KIF11_HUMAN	PPCE_HUMAN
ABC3G_HUMAN	CRFR1_RAT	KIT_HUMAN	PPO2_AGABI
ABCC9_HUMAN	CSK21_HUMAN	KKCC2_HUMAN	PRGR_HUMAN
ABCG2_HUMAN	CTDS1_HUMAN	KPCB_HUMAN	PSB1_HUMAN
ACE_HUMAN	CTRC_HUMAN	KPCD_HUMAN	PSN1_HUMAN
ACE_RABIT	CXCR3_HUMAN	KPCE_HUMAN	PTAFR_HUMAN
ACES_BOVIN	CYSP_TRYCR	KPCG_HUMAN	PTGES_HUMAN
ACES_ELEEL	DCMC_HUMAN	KS6A1_HUMAN	PTN1_HUMAN
ACES_HUMAN	DHB1_HUMAN	KS6A3_HUMAN	PTN2_HUMAN
ACES_MOUSE	DHB2_HUMAN	KS6B1_HUMAN	PTN5_HUMAN
ACES_RAT	DHB3_HUMAN	KSYK_HUMAN	PTN7_HUMAN
ACES_TETCF	DHI1_HUMAN	LEF_BACAN	PYGM_HUMAN
ACHA4_HUMAN	DHI1_MOUSE	LIPS_HUMAN	RAC1_HUMAN
ACHA4_RAT	DHI2_HUMAN	LKHA4_HUMAN	RAC1_MOUSE
ACHA7_HUMAN	DNMT1_HUMAN	LMNA_HUMAN	RARA_HUMAN
ACHA7_RAT	DPOLA_HUMAN	LOX15_HUMAN	RARB_HUMAN
ACM1_HUMAN	DPP2_HUMAN	LOX5_HUMAN	RARG_HUMAN
ACM1_RAT	DPP4_HUMAN	LOX5_RAT	RET_HUMAN
ACM2_HUMAN	DPP8_HUMAN	LSS_HUMAN	RIPK2_HUMAN
ACM2_RAT	DPP9_HUMAN	LT4R1_HUMAN	ROCK1_HUMAN
ACM3_HUMAN	DRD1_BOVIN	M3K10_HUMAN	ROCK2_HUMAN
ACM3_RAT	DRD1_HUMAN	M3K9_HUMAN	RORA_HUMAN
ACM4_HUMAN	DRD1_PIG	MAP11_HUMAN	RORG_HUMAN
ACM5_HUMAN	DRD1_RAT	MAP2_HUMAN	RXRA_HUMAN
ACV1B_HUMAN	DRD2_BOVIN	MBTD1_HUMAN	RXRB_HUMAN
ADA1A_BOVIN	DRD2_HUMAN	MCL1_HUMAN	RXRG_HUMAN
ADA1A_HUMAN	DRD2_RAT	MCLN3_HUMAN	S1PR1_HUMAN

ADA1A_RAT	DRD3_HUMAN	MCR_HUMAN	S1PR2_HUMAN
ADA2A_HUMAN	DRD3_RAT	MDM2_HUMAN	S1PR3_HUMAN
ADA2B_HUMAN	DRD4_HUMAN	MDR1_HUMAN	S1PR4_HUMAN
ADA2C_HUMAN	DRD4_RAT	MEN1_HUMAN	S1PR5_HUMAN
ADA2C_RAT	DRD5_HUMAN	MGLL_HUMAN	S22A2_HUMAN
ADH1A_HUMAN	DRTS_PLAFK	MIF_HUMAN	S5A1_HUMAN
ADRB1_HUMAN	DUS3_HUMAN	MK11_HUMAN	S5A2_HUMAN
ADRB3_HUMAN	DYR1A_HUMAN	MK15_HUMAN	SC5A7_HUMAN
AHR_HUMAN	DYR1A_RAT	MMP12_HUMAN	SC6A1_MOUSE
AK1C3_HUMAN	EBP_HUMAN	MMP17_HUMAN	SC6A1_RAT
AKT1_HUMAN	EPAS1_HUMAN	MMP2_HUMAN	SC6A2_HUMAN
ALDR_RAT	ESR1_HUMAN	MMP3_HUMAN	SC6A3_HUMAN
ALK_HUMAN	ESR2_HUMAN	MMP9_HUMAN	SC6A3_RAT
AMPC_ENTCL	EST1_HUMAN	MP2K1_HUMAN	SC6A4_HUMAN
AMPE_HUMAN	EST2_HUMAN	MPI_HUMAN	SC6A4_RAT
AMPL_HUMAN	FAAH1_HUMAN	MPIP1_HUMAN	SC6A9_HUMAN
AMPN_HUMAN	FAAH1_RAT	MPIP2_HUMAN	SCN5A_HUMAN
ANDR_HUMAN	FDFT_HUMAN	MPIP3_HUMAN	SCN9A_HUMAN
ANDR_RAT	FDFT_RAT	MTR1A_HUMAN	SGMR1_CAVPO
AOC3_HUMAN	FFAR1_HUMAN	MTR1B_HUMAN	SGMR1_HUMAN
AOFA_HUMAN	FGFR2_HUMAN	NEP_HUMAN	SGMR1_RAT
AOFA_RAT	FKB1A_HUMAN	NEP_RAT	SHBG_HUMAN
AOFB_HUMAN	FOLH1_HUMAN	NICA_HUMAN	SIR1_HUMAN
AOFB_RAT	FPPS_HUMAN	NISCH_HUMAN	SIR2_HUMAN
APH1B_HUMAN	FUCO_HUMAN	NMDE2_HUMAN	SL9A1_HUMAN
AT12A_HUMAN	FURIN_HUMAN	NMDE2_RAT	SO1B1_HUMAN
ATP4A_HUMAN	FYN_HUMAN	NMDZ1_RAT	SO1B3_HUMAN
B2LA1_HUMAN	G6PD_HUMAN	NOS1_HUMAN	SOAT1_HUMAN
BACE1_HUMAN	GALR3_HUMAN	NOS1_RAT	SOAT1_RAT
BODG_HUMAN	GCR_HUMAN	NOS2_HUMAN	STAT3_HUMAN
C11B1_HUMAN	GGPPS_HUMAN	NOS2_MOUSE	STF1_HUMAN
C11B2_HUMAN	GLCM_HUMAN	NOS3_HUMAN	STK4_HUMAN
CAC1B_HUMAN	GLI1_HUMAN	NPY1R_HUMAN	STS_HUMAN
CAC1C_HUMAN	GLRA1_HUMAN	NPY5R_HUMAN	TAAR1_HUMAN

CAC1G_HUMAN	GP119_HUMAN	NR1H2_HUMAN	TAAR1_MOUSE
CAC1H_HUMAN	GPBAR_HUMAN	NR1H3_HUMAN	TAU_HUMAN
CAH1_HUMAN	GPR18_HUMAN	NR1H4_HUMAN	TBA1A_PIG
CAH12_HUMAN	GPR35_HUMAN	NR1I2_HUMAN	TBB2B_RAT
CAH13_HUMAN	GPR55_HUMAN	NR2E3_HUMAN	TERT_HUMAN
CAH14_HUMAN	GRIA2_HUMAN	NUAK1_HUMAN	TF65_HUMAN
CAH2_HUMAN	GRIK1_HUMAN	OPRK_CAVPO	TGM2_HUMAN
CAH4_BOVIN	GRIK2_HUMAN	OPRK_HUMAN	THA_HUMAN
CAH4_HUMAN	GRM1_HUMAN	OPRK_RAT	THAS_HUMAN
CAH5A_HUMAN	GRM1_RAT	OPRM_HUMAN	THAS_RAT
CAH5B_HUMAN	GRM2_HUMAN	OPRM_MOUSE	THB_HUMAN
CAH6_HUMAN	GRM2_RAT	OPRX_HUMAN	TLR9_HUMAN
CAH7_HUMAN	GRM4_HUMAN	OX1R_HUMAN	TNFA_HUMAN
CAH9_HUMAN	GRM5_RAT	P2RX7_HUMAN	TPA_HUMAN
CAN1_HUMAN	GSK3A_HUMAN	P2RX7_RAT	TRPA1_HUMAN
CASP2_HUMAN	GSK3B_HUMAN	PA21B_HUMAN	TRPM8_HUMAN
CASP9_HUMAN	HCAR2_HUMAN	PA2GA_HUMAN	TRPV1_HUMAN
CATB_HUMAN	HDAC1_HUMAN	PABP1_HUMAN	TRPV1_RAT
CATG_HUMAN	HDAC1_PONAB	PAK4_HUMAN	TRY2_HUMAN
CATK_HUMAN	HDAC2_HUMAN	PCP_HUMAN	TRYB1_HUMAN
CATL1_HUMAN	HDAC3_HUMAN	PD2R_HUMAN	TRYB2_HUMAN
CATS_HUMAN	HDAC4_HUMAN	PDE10_HUMAN	TSHR_HUMAN
CBG_HUMAN	HDAC6_HUMAN	PDE1B_HUMAN	TTL_HUMAN
CCR1_HUMAN	HDAC8_HUMAN	PDE1C_HUMAN	UD2B7_HUMAN
CCR2_HUMAN	HIF1A_HUMAN	PDE3A_HUMAN	UFO_HUMAN
CCR3_HUMAN	HNF4A_HUMAN	PDE4A_HUMAN	UROK_HUMAN
CDC7_HUMAN	HRH1_CAVPO	PDE4B_HUMAN	VACHT_HUMAN
CDK1_HUMAN	HRH1_HUMAN	PDE4D_HUMAN	VDR_HUMAN
CDK16_HUMAN	HRH1_RAT	PDE7A_HUMAN	XBP1_HUMAN
CDK7_HUMAN	HRH2_HUMAN	PDPK1_HUMAN	XDH_BOVIN

Tabla 14. Lista de dianas que están vinculadas con uno o más de los compuestos bioactivos del aceite esencial de *S. molle*.

Procesos biológicos enriquecidos a partir de las dianas predichas de los clústeres 1 y 2.

Códigos	Procesos Biológicos	Códigos	Procesos Biológicos
GO:0000086	Transición g2/m del ciclo celular mitótico	GO:0032922	Regulación circadiana de la expresión génica
GO:0000122	Regulación negativa de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II	GO:0033138	Regulación positiva de la fosforilación de peptidil-serina
GO:0000187	Activación de la actividad mapk	GO:0034205	Formación de beta-amiloide
GO:0001516	Proceso de biosíntesis de prostaglandinas	GO:0034614	Respuesta celular a especies reactivas de oxígeno
GO:0001525	Angiogénesis	GO:0034983	Desacetilación de peptidil-lisina
GO:0001542	Ovulación del folículo ovárico	GO:0035094	Respuesta a la nicotina
GO:0001662	Respuesta conductual al miedo	GO:0035235	Vía de señalización del receptor ionotrópico de glutamato
GO:0001666	Respuesta a la hipoxia	GO:0035556	Transducción de señales intracelulares
GO:0001934	Regulación positiva de la fosforilación de proteínas	GO:0038003	Vía de señalización del receptor opioide
GO:0001963	Transmisión sináptica, dopaminérgica	GO:0040012	Regulación de la locomoción
GO:0001974	Remodelación de vasos sanguíneos	GO:0042053	Regulación del proceso metabólico de la dopamina
GO:0001975	Respuesta a la anfetamina	GO:0042136	Proceso de biosíntesis de neurotransmisores
GO:0002003	Maduración de la angiotensina	GO:0042178	Proceso catabólico xenobiótico
GO:0002446	Inmunidad mediada por neutrófilos	GO:0042220	Respuesta a la cocaína
GO:0003376	Vía de señalización de esfingosina-1-fosfato	GO:0042307	Regulación positiva de la importación de proteínas en el núcleo
GO:0006198	Proceso catabólico camp	GO:0042310	Vasoconstricción
GO:0006468	Fosforilación de proteínas	GO:0042391	Regulación del potencial de

			membrana
GO:0006476	Desacetilación de proteínas	GO:0042493	Respuesta a la droga
GO:0006508	Proteólisis	GO:0042593	Homeostasis de la glucosa
	Proteólisis del ectodominio		
GO:0006509	de la proteína de membrana	GO:0042596	Respuesta de miedo
GO:0006694	Proceso de biosíntesis de esteroides	GO:0042632	Homeostasis del colesterol
GO:0006695	Proceso de biosíntesis de colesterol	GO:0042737	Proceso catabólico de drogas
GO:0006702	Proceso de biosíntesis de andrógenos	GO:0042738	Proceso catabólico de fármacos exógenos
GO:0006704	Proceso de biosíntesis de glucocorticoides	GO:0042752	Regulación del ritmo circadiano
GO:0006706	Proceso catabólico de esteroides	GO:0042755	Comportamiento alimentario
GO:0006730	Proceso metabólico de un carbono	GO:0042759	Proceso biosintético de ácidos grasos de cadena larga
GO:0006805	Proceso metabólico xenobiótico	GO:0042789	Transcripción de ARNm del promotor de ARN polimerasa II
GO:0006809	Proceso biosintético de óxido nítrico	GO:0042982	Proceso metabólico de la proteína precursora de amiloide
GO:0006816	Transporte de iones de calcio	GO:0042987	Proceso catabólico de la proteína precursora de amiloide
GO:0006836	Transporte de neurotransmisores	GO:0043065	Regulación positiva del proceso apoptótico
GO:0006874	Homeostasis de iones de calcio celular	GO:0043066	Regulación negativa del proceso apoptótico
GO:0006915	Proceso apoptótico	GO:0043278	Respuesta a la morfina
GO:0006939	Contracción del músculo liso	GO:0043406	Regulación positiva de la actividad map quinasa
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	GO:0043410	Regulación positiva de la cascada mapk
GO:0006955	Respuesta inmune	GO:0043518	Regulación negativa de la

			respuesta al daño del ADN, transducción de señales por el mediador de clase p53
GO:0007165	Transducción de señales	GO:0043524	Regulación negativa del proceso apoptótico de la neurona
GO:0007186	Vía de señalización del receptor acoplado a proteína g	GO:0043525	Regulación positiva del proceso apoptótico de la neurona
GO:0007187	Vía de señalización del receptor acoplado a proteína g, acoplado al segundo mensajero de nucleótido cíclico	GO:0043627	Respuesta al estrógeno
GO:0007188	Vía de señalización del receptor acoplado a proteína g moduladora de adenilato ciclasa	GO:0043951	Regulación negativa de la señalización mediada por camp
GO:0007189	Vía de señalización del receptor acoplado a proteína g activadora de adenilato ciclasa	GO:0045429	Regulación positiva del proceso biosintético del óxido nítrico
GO:0007190	Activación de la actividad del adenilato ciclasa	GO:0045471	Respuesta al etanol
GO:0007193	Vía de señalización del receptor acoplado a proteína g que inhibe el adenilato ciclasa	GO:0045760	Regulación positiva del potencial de acción
GO:0007194	Regulación negativa de la actividad del adenilato ciclasa	GO:0045766	Regulación positiva de la angiogénesis
GO:0007197	Vía de señalización del receptor de acetilcolina acoplado a proteína g que inhibe el adenilato ciclasa	GO:0045776	Regulación negativa de la presión arterial

GO:0007198	Vía de señalización del receptor de serotonina que inhibe el adenilato ciclasa	GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción, plantilla de ADN
GO:0007200	Vía de señalización del receptor acoplado a proteína g activadora de fosfolipasa c	GO:0045907	Regulación positiva de la vasoconstricción
GO:0007204	Regulación positiva de la concentración de iones de calcio citosólico	GO:0045931	Regulación positiva del ciclo celular mitótico
GO:0007212	Vía de señalización del receptor de dopamina	GO:0045944	Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II
GO:0007213	Vía de señalización del receptor de acetilcolina acoplado a proteína g	GO:0046483	Proceso metabólico del heterociclo
GO:0007218	Vía de señalización de neuropéptidos	GO:0046627	Regulación negativa de la vía de señalización del receptor de insulina
GO:0007220	Procesamiento del receptor de muesca	GO:0046677	Respuesta al antibiótico
GO:0007249	Señalización de quinasa i-kappab/nf-kappab	GO:0046777	Autofosforilación de proteínas
GO:0007268	Transmisión sináptica química	GO:0048148	Respuesta conductual a la cocaína
GO:0007271	Transmisión sináptica, colinérgica	GO:0048149	Respuesta conductual al etanol
GO:0007565	Embarazo femenino	GO:0048384	Vía de señalización del receptor del ácido retinoico
GO:0007567	Parto	GO:0048511	Proceso rítmico
GO:0007568	Envejecimiento	GO:0048661	Regulación positiva de la proliferación de células de músculo liso
GO:0007611	Aprendizaje o memoria	GO:0050482	Secreción de ácido

			araquidónico
GO:0007613	Memoria	GO:0050727	Regulación de la respuesta inflamatoria
GO:0007623	Ritmo circadiano	GO:0050729	Regulación positiva de la respuesta inflamatoria
GO:0007626	Comportamiento locomotor	GO:0050795	Regulación del comportamiento
GO:0008202	Proceso metabólico de esteroides	GO:0050796	Regulación de la secreción de insulina
GO:0008203	Proceso metabólico del colesterol	GO:0050955	Termocepción
GO:0008209	Proceso metabólico de los andrógenos	GO:0050966	Detección de estímulos mecánicos implicados en la percepción sensorial del dolor
GO:0008210	Proceso metabólico de los estrógenos	GO:0051209	Liberación de iones de calcio secuestrados en el citosol
GO:0008217	Regulación de la presión arterial	GO:0051247	Regulación positiva del proceso metabólico de proteínas
GO:0008284	Regulación positiva de la proliferación celular	GO:0051481	Regulación negativa de la concentración de iones de calcio citosólico
GO:0008285	Regulación negativa de la proliferación celular	GO:0051482	Regulación positiva de la concentración de iones de calcio citosólico implicada en la vía de señalización acoplada a proteína g activadora de fosfolipasa c
GO:0008542	Aprendizaje visual	GO:0051492	Regulación del ensamblaje de fibras de tensión
GO:0008584	Desarrollo de las gónadas masculinas	GO:0051926	Regulación negativa del transporte de iones de calcio
GO:0009409	Respuesta al frío	GO:0051930	Regulación de la percepción sensorial del dolor
GO:0009410	Respuesta al estímulo	GO:0051966	Regulación de la transmisión

	xenobiótico		sináptica, glutamatérgica
GO:0009636	Respuesta a sustancia tóxica	GO:0051967	Regulación negativa de la transmisión sináptica, glutamatérgica
GO:0009755	Vía de señalización mediada por hormonas	GO:0060079	Potencial postsináptico excitatorio
GO:0010613	Regulación positiva de la hipertrofia del músculo cardíaco	GO:0060134	Inhibición de prepulso
GO:0010628	Regulación positiva de la expresión génica	GO:0060158	Vía de señalización del receptor de dopamina activador de fosfolipasa c
GO:0010629	Regulación negativa de la expresión génica	GO:0060348	Desarrollo óseo
GO:0014059	Regulación de la secreción de dopamina	GO:0060397	Cascada jak-stat implicada en la vía de señalización de la hormona del crecimiento
GO:0014063	Regulación negativa de la secreción de serotonina	GO:0061370	Proceso de biosíntesis de testosterona
GO:0016098	Proceso metabólico monoterpenoide	GO:0070301	Respuesta celular al peróxido de hidrógeno
GO:0016485	Procesamiento de proteínas	GO:0070374	Regulación positiva de la cascada erk1 y erk2
GO:0016575	Desacetilación de histonas	GO:0070588	Transporte transmembrana de iones de calcio
GO:0017144	Proceso metabólico de drogas	GO:0070932	Desacetilación de la histona h3
GO:0018105	Fosforilación de peptidil-serina	GO:0070933	Desacetilación de histona h4
GO:0018107	Fosforilación de peptidil-treonina	GO:0071222	Respuesta celular al lipopolisacárido
GO:0018108	Fosforilación de peptidil-tirosina	GO:0071300	Respuesta celular al ácido retinoico
GO:0019221	Vía de señalización	GO:0071312	Respuesta celular al alcaloide

	mediada por citoquinas		
GO:0019222	Regulación del proceso metabólico	GO:0071375	Respuesta celular al estímulo de la hormona peptídica
GO:0019228	Potencial de acción neuronal	GO:0071407	Respuesta celular al compuesto cíclico orgánico
GO:0019229	Regulación de la vasoconstricción	GO:0071456	Respuesta celular a la hipoxia
GO:0019233	Percepción sensorial del dolor	GO:0071492	Respuesta celular a los rayos uv-a
GO:0019369	Proceso metabólico del ácido araquidónico	GO:0071498	Respuesta celular al esfuerzo cortante del fluido
GO:0019370	Proceso de biosíntesis de leucotrienos	GO:0071549	Respuesta celular al estímulo de dexametasona
GO:0019371	Vía de la ciclooxigenasa	GO:0071872	Respuesta celular al estímulo de epinefrina
GO:0019722	Señalización mediada por calcio	GO:0071875	Vía de señalización del receptor adrenérgico
GO:0019933	Señalización mediada por camp	GO:0071880	Vía de señalización del receptor adrenérgico activador de adenilato ciclasa
GO:0022617	Desmontaje de la matriz extracelular	GO:0086010	Despolarización de la membrana durante el potencial de acción
GO:0030518	Vía de señalización del receptor intracelular de hormonas esteroides	GO:0097067	Respuesta celular al estímulo de la hormona tiroidea
GO:0030522	Vía de señalización del receptor intracelular	GO:0097191	Vía de señalización apoptótica extrínseca
GO:0030574	Proceso catabólico del colágeno	GO:0098664	Vía de señalización del receptor de serotonina acoplado a proteína g
GO:0031641	Regulación de la mielinización	GO:1901386	Regulación negativa de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje

GO:0032092	Regulación positiva de la unión a proteínas	GO:1902004	Regulación positiva de la formación de beta-amiloide
GO:0032355	Respuesta al estradiol	GO:1902894	Regulación negativa de la transcripción de pri-mirna del promotor de la ARN polimerasa II
GO:0032496	Respuesta al lipopolisacárido	GO:1904645	Respuesta a beta-amiloide
GO:0032526	Respuesta al ácido retinoico	GO:1904646	Respuesta celular a beta-amiloide
GO:0032729	Regulación positiva de la producción de interferón-gamma	GO:1904707	Regulación positiva de la proliferación de células del músculo liso vascular
GO:0032735	Regulación positiva de la producción de interleucina-12	GO:1990000	Formación de fibrillas de amiloide
GO:0032755	Regulación positiva de la producción de interleucina-6	GO:2000273	Regulación positiva de la actividad del receptor
GO:0032757	Regulación positiva de la producción de interleucina-8	GO:2000300	Regulación de la exocitosis de vesículas sinápticas
GO:0032760	Regulación positiva de la producción del factor de necrosis tumoral		

Tabla 15. Lista completa de procesos biológicos enriquecidos a partir de todos los compuestos del aceite *S. molle*.

Rutas metabólicas enriquecidas de la base de datos KEGG a partir de las dianas predichas de los clústeres 1 y 2.

Códigos	Rutas Metabólicas	Códigos	Rutas Metabólicas
hsa00140	Biosíntesis de hormonas esteroideas	hsa04914	Maduración de ovocitos mediada por progesterona
hsa00590	Metabolismo del ácido araquidónico	hsa04915	Vía de señalización de estrógenos

hsa00591	Metabolismo del ácido linoleico	hsa04919	Vía de señalización de la hormona tiroidea
hsa00910	Metabolismo del nitrógeno	hsa04920	Vía de señalización de adipocitoquinas
hsa01100	Vías metabólicas	hsa04923	Regulación de la lipólisis en adipocitos
hsa01521	Resistencia al inhibidor de la tirosina cinasa del EGFR	hsa04924	Secreción de renina
hsa04020	Vía de señalización del calcio	hsa04929	Secreción de GnRH
hsa04022	Vía de señalización de cGMP-PKG	hsa04931	Resistencia a la insulina
hsa04024	Vía de señalización de AMPc	hsa05030	Adicción a la cocaína
hsa04062	Vía de señalización de quimioquinas	hsa05031	Adicción a las anfetaminas
hsa04066	Vía de señalización de HIF-1	hsa05032	Adicción a la morfina
hsa04071	Vía de señalización de los esfingolípidos	hsa05034	Alcoholismo
hsa04370	Vía de señalización de VEGF	hsa05163	Infección por citomegalovirus humano
hsa04371	Vía de señalización de Apelin	hsa05164	Influenza A
hsa04540	Brecha de la salida	hsa05200	Vías en el cáncer
hsa04614	Sistema renina-angiotensina	hsa05204	Carcinogénesis química - aductos de ADN
hsa04659	Diferenciación de células Th17	hsa05205	Proteoglicanos en el cáncer
hsa04725	Sinapsis colinérgica	hsa05207	Carcinogénesis química - activación del receptor
hsa04726	Sinapsis serotoninérgica	hsa05215	Cáncer de prostata
hsa04728	Sinapsis dopaminérgica	hsa05223	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
hsa04742	Transducción del gusto	hsa05417	Lípidos y aterosclerosis
hsa04750	Regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP		

Tabla 16. Lista completa de rutas metabólicas enriquecidas a partir de todos los compuestos del aceite *S. molle*.