



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD, MODULACIÓN
Y POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS
DE ORIGEN VEGETAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

NAYELI KARINA TREJO GINEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal: Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
Secretario: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
1er. Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
2° Suplente: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema: _____

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano.

Supervisor Técnico: _____

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante: _____

Nayeli Karina Trejo Ginez

AGRADECIMIENTOS

- A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN215016) y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (proyecto CB220535) por el financiamiento de la investigación.

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer	3
2.1.1 El cáncer como enfermedad	3
2.1.2 Carcinogénesis	3
2.1.3 Agentes carcinógenos	4
2.1.4 El cáncer en el mundo	5
2.1.5 El cáncer en México	6
2.1.6 Diagnóstico y tratamiento del cáncer	6
2.1.7 Quimioterapia y productos naturales	8
2.1.8 Mecanismos de Resistencia hacia la quimioterapia	15
2.2 Proteínas de membranas relacionadas con la resistencia a fármacos	17
2.2.1 Estructura de la glicoproteína P (gp-P)	20
2.2.2 Características genéticas de la glicoproteína P	20
2.2.3 Papel fisiológico de la glicoproteína P	21
2.2.4 Funcionamiento de la glicoproteína P	21
2.2.5 Agentes moduladores de la actividad de glicoproteína P	23
2.2.6 BCRP/ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein)	24
2.2.7 Estructura de la proteína y configuración funcional	25

2.2.8 Distribución tisular y función fisiológica	26
2.2.9 Principales características de sustratos e inhibidores de BCRP (ABCG2)	28
2.3 Género <i>Salvia</i>	28
2.3.1 Descripción y usos etnobotánicos de especies del género <i>Salvia</i>	29
2.4 Pruebas biológicas en la evaluación de productos naturales	32
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivos General	34
4.2 Objetivos Específicos	34
5. PARTE EXPERIMENTAL	35
5.1 Compuestos prueba	35
5.2 Líneas celulares	35
5.3 Cultivos de líneas celulares	35
5.4 Soluciones utilizadas	35
5.5 Metodología	36
5.5.1 Descongelamiento de las líneas celulares	36
5.5.2 Mantenimiento y propagación de las líneas celulares	36
5.5.3 Conteo celular	36
5.6 Preparación de diluciones	36
5.7 Bioensayos de actividad biológica	37
5.7.1 Bioensayo de citotoxicidad	37
5.7.2 Caja de día cero o control inicial	38
5.7.3 Desarrollo de color	38

5.7.4 Determinación de Cl_{50}	38
5.8 Ensayo de modulación	39
5.9 Ensayo preliminar de acumulación intracelular de teotihuacanina (1)	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Estudio químico de <i>Salvia amaríssima</i>	43
6.2 Citotoxicidad	43
6.3 Bioensayos preliminares de modulación de la glicoproteína P	46
7. CONCLUSIONES	49
8. PERSPECTIVAS	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos antitumorales provenientes de plantas.	11
Cuadro 2. Compuestos que interactúan con glicoproteína-P.	23
Cuadro 3. Moduladores de la glicoproteína P.	24
Cuadro 4. Usos de especies de género <i>Salvia</i> en la medicina tradicional mexicana.	31
Cuadro 5. Diluciones para el control positivo.	37
Cuadro 6. Diluciones de las muestras de prueba.	37
Cuadro 7. Líneas celulares empleadas en el ensayo de modulación	39
Cuadro 8. Diluciones iniciales para el compuesto 1.	41
Cuadro 9. Diluciones para el compuesto 1 en el ensayo de acumulación.	41
Cuadro 10. Ensayo de citotoxicidad de los compuestos y extractos obtenidos de <i>Salvia amarissima</i> .	45
Cuadro 11. Ensayos de modulación de la actividad de la Vinblastina con los compuestos sobre las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin.	48

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Fármacos anticancerígenos aceptados desde 1940 a 2010.	10
Figura 2. Fármacos usados para el tratamiento del cáncer.	12
Figura 3. Mecanismos de resistencia las células cancerosas.	17
Figura 4. Diagrama de un transportador ABC.	18
Figura 5. Estructura de los transportadores ABC relacionados con la resistencia a fármacos.	19
Figura 6. Mecanismo de acción de gp-P, planteados para la expulsión de fármacos.	22
Figura 7. Estructura del gen ABCG2 humano y de la proteína derivada mostrándose algunos de los polimorfismos descritos en humano.	25
Figura 8. Conformación de ABCG2 en la membrana plasmática.	26
Figura 9. Órganos en los que se localiza el transportador ABCG2.	27
Figura 10. <i>Salvia amarissima</i> .	29
Figura 11. <i>Salvia divinorum</i> .	29
Figura 12. Posible mecanismo de formación de la teotihuacanina (1).	31
Figura 13. Ensayos de modulación de vinblastina para el compuesto 1 (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin ⁺ .	40
Figura 14. Ensayo de acumulación intracelular de mitoxantrona para el compuesto 1 (100-12.5 µM).	42
Figura 15. Bioensayo de citotoxicidad para el compuesto STJ-7, fracción de acetato de etilo y extracto de acetona contra MCF7.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
µg	Microgramos
ABC	<i>ATP- Binding Cassette</i> ,
AcOEt	Acetato de etilo
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> (Proteína de cáncer de mama relacionada con la resistencia)
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
DMSO	Dimetilsulfóxido
gp-P	Glicoproteína P
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i> (Resistencia a múltiples fármacos)
MDR-1	Gen que codifica para la glicoproteína-P
MRP-1	<i>Multidrug Resistance associated Protein</i> (Proteína relacionada con la resistencia a fármacos)
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
mL	Mililitros
MXR	Mitoxantrona
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i> (región de unión de nucleótidos)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Res	Reserpina
Rh	Rodamina 123
SNC	Sistema Nervioso Central
SFB	Suero Fetal Bovino
SRB	Sulforodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
TM	Región transmembrana
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
Vin	Vinblastina
VRP	Verapamilo

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con fines medicinales es común para la elaboración de remedios caseros para el tratamiento de diversas enfermedades y, a partir del conocimiento empírico, ha estado presente en diversas civilizaciones antiguas, transmitido oralmente de generación en generación o documentado por escrito. México, como muchos otros países, cuenta con una gran y antigua cultura dentro de la medicina tradicional; dentro de los archivos históricos que contienen esta información se cuenta por ejemplo con el códice Badiano, el cual alberga un compilado de la herbolaria utilizada por las culturas prehispánicas. La población ha empleado las plantas como parte de la medicina tradicional para el tratamiento de diversas dolencias, incluido el cáncer.

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha involucrado numerosos campos de investigación y varios métodos de análisis. La etnofarmacología tiene como objetivo la investigación experimental y validación biológica de las plantas medicinales y medicamentos de origen natural. La amplia perspectiva de la etnofarmacología contextualiza la ecología y aborda el uso de las plantas, en conjunto con la farmacología y la toxicología en comunidades humanas.¹

Los productos naturales desempeñan un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, en particular, para el tratamiento del cáncer y neoplasias. Se contempla desde la década de los años 40 hasta el 2010, que el 74.9% de las moléculas orgánicas de bajo peso molecular obtenidas y admitidas como principios terapéuticos son de origen no sintético, y el 48.6% del total anterior, son de origen natural o derivados de semisíntesis.²

El descubrimiento y la caracterización química y biológica de sustancias provenientes de plantas superiores y de organismos marinos continúan representando una nueva alternativa para la obtención de nuevos fármacos en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y sobre todo, para aquellos casos de tipo refractario como el cáncer de mama, pulmón, colon y próstata.³

A pesar de los logros alcanzados en la quimioterapia de las enfermedades malignas, la mayoría de los tumores terminan siendo resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes. Este fenómeno conocido como resistencia cruzada a múltiples fármacos o MDR (“Multidrug Resistance”), complican el tratamiento e incrementan la morbilidad y mortalidad.

La glicoproteína P es uno de los mecanismos más estudiados que explica como las células cancerosas generan resistencia. Esta proteína pertenece a la superfamilia de bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette) y funciona como un transportador dependiente de energía que expulsa desde el interior de la célula, un amplio rango de fármacos cancerígenos lipofílicos y anfipáticos que son estructural y funcionalmente diversos, así como toxinas y otros xenobióticos, disminuyendo su acumulación intracelular. Esta proteína se ha encontrado en diversos órganos como el intestino, el hígado, el páncreas y las glándulas mamarias.⁴ La importancia clínica de este hecho ha llevado a múltiples estrategias para evitar o revertir los efectos de la resistencia a las drogas antineoplásicas.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar la evaluación biológica de compuestos de origen vegetal provenientes de *Salvia amarissima*. Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en líneas celulares tumorales para determinar la CI_{50} . Los compuestos que no fueron activos ($CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$), fueron sometidos al ensayo de modulación. Finalmente, se seleccionó el compuesto con mejor efecto modulador para realizar ensayos que permitieran establecer el efecto modulador de la glicoproteína P en líneas celulares resistentes a fármacos antineoplásicos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

2.1.1 El cáncer como enfermedad

En la actualidad, el cáncer es una enfermedad que tiene una importancia fundamental en el ámbito de la salud en nuestro país y en el resto del mundo; es una de las principales causas de mortalidad tanto en la infancia como en la edad adulta. Se reconoce al cáncer como una anomalía genética en el ámbito celular y la pérdida o inactivación de estos genes da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores. Las mutaciones que alteran el genoma o la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres. Si una de estas mutaciones se hereda, son necesarias menos mutaciones somáticas para que se desarrolle el tumor, y la persona puede tener una predisposición a padecer cáncer.⁵ El crecimiento de los tumores malignos está determinado en gran medida por la capacidad proliferativa de las células tumorales, por su capacidad de invadir los tejidos del huésped, tejidos vecinos y, finalmente, se propaga a otras partes del cuerpo (metástasis).⁶

2.1.2 Carcinogénesis

El proceso de carcinogénesis puede estar dividido en dos secuencias; la transformación neoplásica y el desarrollo neoplásico.⁷ La secuencia de eventos iniciales que se presentan en el proceso de carcinogénesis, se llama inicialización; la cual consiste en la transformación de una célula normal a una célula neoplásica por medio del desarrollo de defectos genéticos. Las transformaciones en estas células son consecuencia de mutaciones que resultan de la alteración del ADN que no se corrige por los procesos de reparación. Las mutaciones críticas que se ven involucradas en el proceso de transformación ocurren en los genes que controlan el crecimiento, en los protooncogenes, en los genes supresores de tumores y en los genes reguladores de los genes supresores de tumores, lo que resulta en una pérdida del control de la proliferación.^{8,9}

En la segunda secuencia de la carcinogénesis, la célula neoplásica prolifera de manera descontrolada hasta los tejidos vecinos, como si lograra una expansión clonal, que eventualmente resulta en la formación de una neoplasia benigna, dicha proliferación celular sostenida provoca que el comportamiento de la neoplasia benigna se encamine hacia la formación de una neoplasia maligna.¹⁰

2.1.3 Agentes carcinógenos

La enfermedad surge principalmente como consecuencia de la exposición a carcinógenos (agentes cancerígenos) químicos presentes en el entorno, de estilos de vida inapropiados y de la integración de virus oncogénicos (oncovirus) al genoma del hospedero. Algunos ejemplos de oncovirus son los siguientes: la forma más corriente de cáncer de hígado se asocia a la presencia del virus de la hepatitis B; el EBV (virus de Epstein-Barr) se asocia a linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo; el virus HTLV-I se asocia a una forma de leucemia humana; el HHV8/KSHV es el responsable del sarcoma de Kaposi así como de la MCD (enfermedad multicéntrica de Castleman) y de PEL (linfomas de efusión primarios) y el HPV (virus del papiloma humano) es el causante de las verrugas de la piel y es el responsable de un gran porcentaje del cáncer de cérvix.

La Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC) que es miembro de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a diversos agentes de acuerdo con su potencial carcinógeno para los seres humanos y los animales con la finalidad de planificar estrategias para prevención y control de esta enfermedad, definiendo cuatro grupos:¹⁰

Grupo 1: El agente es carcinógeno para los seres humanos. Esta categoría se utiliza cuando hay datos probatorios suficientes de la carcinogenicidad en seres humanos. En este grupo se incluyen 109 agentes: los más conocidos son el arsénico, asbesto, benceno, radón, berilio, sílice, cromo, cadmio y alquitrán. También integran este grupo los virus de la hepatitis B y C; recientemente, se incorporó a este grupo el humo de motor diesel.

Grupo 2A: Probablemente carcinógeno para el ser humano. Esta categoría se usa cuando las pruebas de carcinogenicidad en humanos son limitadas y las correspondientes a carcinogenicidad en experimentación animal son suficientes. A este grupo, integrado por 65 factores, pertenecen el formaldehído, la exposición ocupacional a altas temperaturas, los peluqueros, los artistas del vidrio y los trabajadores en refinerías de petróleo.

Grupo 2B: Posiblemente carcinógeno para el ser humano. Hay algunas pruebas de que puede causar cáncer a los humanos pero son limitadas y, en animales de experimentación las pruebas son insuficientes. Se incluyen en este grupo 275 factores: algunos tipos de virus del papiloma, el café como cancerígeno para la vejiga urinaria, los trabajadores en limpieza a seco o imprentas gráficas, los bomberos, etc.

Grupo 3: No puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano dado que no hay ninguna prueba adecuada de que cause cáncer a este género. En general se incluyen agentes o mezclas que no pueden catalogarse en otros grupos, algunos ejemplos son: antraceno e iluminación fluorescente.

Grupo 4: Probablemente no carcinógeno para el ser humano. Las pruebas sugieren la ausencia de potencial carcinogénico en humanos y animales de experimentación. Las sustancias químicas que inician la carcinogénesis son de diferentes estructuras desde productos naturales como sintéticos.

Los factores biológicos, tales como la infección por el virus de la hepatitis B y el papiloma humano desempeñan en la etiología del cáncer un papel importante, incluso mayor que los factores genéticos heredados. El conocimiento de estos factores puede servir de base en la lucha contra esta enfermedad.

2.1.4 El cáncer en el mundo

La OMS estimó que el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de

nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas. Se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente a un 70% en los próximos 20 años.¹¹

De todos los tipos de cáncer, el cáncer de pulmón es el que causa más muertes a nivel mundial, seguido por el cáncer de mama. En el 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon, recto, estómago e hígado, mientras que en mujeres fueron los de mama, colon, recto, pulmón, cuello uterino y estómago. Aproximadamente, un 30% de las muertes por cáncer son debidas a los cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. Los cánceres causados por infecciones virales, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por virus del papiloma humano (VPH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios. Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo y se estima que para el 2032 las defunciones por cáncer sigan aumentando a nivel mundial y alcance los 22 millones de casos.

2.1.5 El cáncer en México

El cáncer constituye un problema de salud pública en nuestro país. En México, el cáncer más frecuente en la población femenina es el de mama, afectando a 35 mujeres de cada cien mil. En hombres, el cáncer más común es el de próstata, que afecta a 27 de cada cien mil.¹²

2.1.6 Diagnóstico y tratamiento del cáncer.

El diagnóstico del cáncer es la primera medida que se adopta para hacer frente a esta enfermedad. Exige una combinación de evaluaciones clínicas minuciosas e investigaciones diagnósticas para identificar la presencia de células anormales, estas pruebas pueden confirmar o eliminar el diagnóstico de cáncer primario, además de determinar la fase del cáncer, dividiéndose en tres principales tipos:

- I. Radiología: permite la visualización de estructuras internas creando imágenes a través de rayos X o rayos γ , resonancia magnética de imagen, ultrasonido, medicina nuclear de imagen y tomografía de emisión de positrones.
- II. Patología: puede confirmar el diagnóstico clínico, utilizado también para monitorear la enfermedad del paciente y la respuesta al tratamiento, por medio de pruebas bioquímicas, uso de anticuerpos monoclonales, marcadores tumorales, biopsias o citología.
- III. Endoscopia: por medio de la introducción de una cámara o lente dentro de un tubo generalmente de fibra óptica a través de un orificio natural, una incisión quirúrgica o una lesión permite la visualización de un órgano hueco o cavidad corporal, permitiendo también obtener muestras de tejido o células para un examen histológico o citológico.¹³

Hay muchos tipos de tratamientos para el cáncer, una vez confirmado el diagnóstico se determina la fase en la que se encuentra para normalizar el diseño de los protocolos de tratamiento que dependerá del tipo de cáncer y del grado de avance que tenga y puede consistir en un solo tratamiento o alguna combinación de estas posibilidades terapéuticas, entre ellos se encuentran¹⁴

- I. Cirugía: procedimiento en el que médico cirujano, con capacitación especial, extirpa el cáncer de su cuerpo.
- II. Radioterapia: Tratamiento que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores.
- III. Quimioterapia: Tratamiento que usa fármacos para destruir células cancerosas.

- IV. Terapia dirigida: Tratamiento que actúa sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y la diseminación de las células cancerosas.
- V. Terapia hormonal: Tratamiento que detiene el crecimiento del cáncer a través de hormonas de crecimiento.

Los objetivos básicos del tratamiento del cáncer son: la curación, la prolongación de la vida y el mejoramiento de la calidad de vida del paciente.¹⁴ Una detección precoz en los casos de cáncer del cuello uterino, la mama, la cavidad bucal y el colon, unida a un tratamiento óptimo les garantiza en los próximos cinco años, un índice de supervivencia del 50-60%, en cambio, es limitada la eficacia de los tratamientos en el índice de supervivencia de los enfermos de cáncer de esófago.

El éxito del tratamiento depende de los recursos disponibles para los pacientes, de un acceso igualitario, una atención de calidad y de la información adecuada que se le proporcione al paciente. Algunos tratamientos requieren medios tecnológicos muy complejos que sólo están al alcance en lugares donde los recursos son abundantes.¹⁵

La mejoría en la calidad de los sistemas de salud, proporcionaría buenos resultados en la medida en que los propios pacientes, sus familias, la sociedad y los equipos de salud, unen esfuerzos que satisfagan las necesidades de las personas sanas y enfermas, con la elaboración de programas de control del cáncer que tengan como finalidad, la detección precoz y la cura de esta enfermedad.¹⁶

2.1.7 Quimioterapia y productos naturales

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Actúa evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan en más células. Debido a que las células cancerosas en general crecen y se dividen más rápido que las células sanas, la quimioterapia las destruye más rápido que a la mayoría de las células sanas. Como los fármacos de la quimioterapia son poderosos, estos causan daño a muchas células en crecimiento, incluidas algunas células sanas.

Este daño causa los efectos secundarios de la quimioterapia. La quimioterapia puede destruir las células cancerosas que han hecho metástasis o que se han propagado a otras partes del cuerpo alejadas del tumor primario; sin embargo, no excluye a las células sanas que se replican rápidamente como las del aparato reproductor, el epitelio intestinal y la médula ósea, observándose distintos efectos secundarios como la pérdida de cabello, falta de apetito, vómito e inmunosupresión, entre otras.¹⁷

La quimioterapia del cáncer se ha desarrollado de manera específica, desde los años cuarenta con el uso de agentes citotóxicos, como las mostazas nitrogenadas hasta los años setenta con el desarrollo de fármacos anticancerígenos a partir de fuentes naturales, como es el caso de los alcaloides de la vinca,¹⁸ los taxanos,¹⁹ los derivados de la podofilotoxina,²⁰ y las antraciclina,²¹ hasta llegar al uso de anticuerpos monoclonales específicos²² y agentes que inactivan vías de crecimiento de células cancerígenas.²³

Un sólo medicamento de quimioterapia puede ser usado para tratar el cáncer, pero a menudo se emplean múltiples medicamentos en cierto orden o en ciertas combinaciones y a este procedimiento se conoce como quimioterapia de combinación. El uso de diversos medicamentos permite que diferentes tipos de acción operen en conjunto para destruir un mayor número de células cancerosas. Además, se puede reducir la probabilidad de que el cáncer se torne resistente a un medicamento en particular.

Aproximadamente, el 70 % de los nuevos fármacos candidatos que se aprueban para su uso clínico es de origen natural. De 206 agentes anticancerígenos aprobados, desde el inicio de la quimioterapia en la década de los cuarenta hasta el 2010, sin tomar en cuenta los de alto peso molecular como los biológicos (26) y vacunas (5), reduciendo así el total de moléculas obtenidas y aceptadas a 175 (100%) del cual 131 moléculas (74.9%) son inspiradas en esqueletos de productos naturales, mientras que el 48.9% del total son de origen complemente natural o derivados de semisíntesis (Figura 1).²

La evaluación de extractos provenientes de plantas superiores y de organismos marinos sigue siendo una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos de interés clínico en el tratamiento de enfermedades

neoplásicas y, sobre todo, para aquellos casos de tipo refractario como el cáncer de mama, colon, próstata y pulmón.²³ Los productos naturales se han empleado extensivamente para la elucidación de mecanismos celulares complejos, incluyendo sistemas de transducción de señales y de regulación del ciclo celular, dando lugar a la identificación de importantes dianas celulares con potencial terapéutico.¹⁸

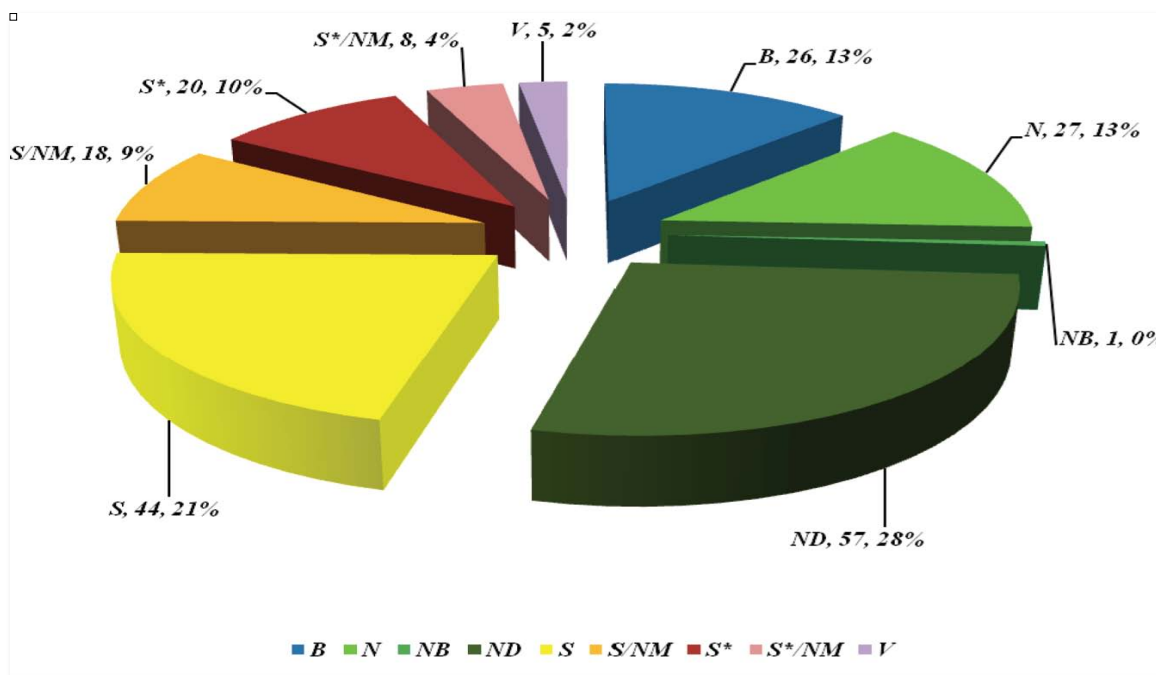


Figura 1. Fármacos anticancerígenos aceptados desde 1940 a 2010. Fuente de origen de los productos: N; Natural, NB; Productos Naturales Botánicos, S; Completamente Sintéticos, NM; Imitación de productos naturales, S*; Síntesis total pero el farmacóforo es derivado de un producto natural, V; Vacunas.

La química medicinal de productos naturales abarca desde la identificación, el aislamiento y la caracterización de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, su modificación estructural que repercutirá en la alteración de sus propiedades físicoquímicas para optimizar su actividad farmacológica. Los compuestos naturales aislados suelen ser productos naturales nuevos que se extienden en un amplio margen de tipos estructurales subdivididos en clases o grupos fitoquímicos (Cuadro 1). La estrategia general consiste en aislar el principio

activo del extracto de la especie en cuestión, determinar su estructura química, plantear su síntesis y realizar todos los ensayos inherentes a su actividad biológica, además de estudiar su farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad.^{10,13}

Cuadro 1. Compuestos antitumorales provenientes de plantas.

Clase	Compuesto	Fuente	Familia
Monoterpenos	4- Ipomeanol	<i>Ipomea batatas</i>	convolvulaceae
	Alamandina	<i>Allamnada catártica</i>	Apocynaceae
	Penstimida	<i>Penstemon deutus</i>	Scrophulariaceae
Sesquiterpenos	Bacaria	<i>Baccharis megapotamica</i>	Compositae
	Elefantopina	<i>Elephantopus elatus</i>	
	Helenalina	<i>Helenium autumnale</i>	
	Liatrina	<i>Liatris chapmanii</i>	
	Filantósido	<i>Phyllantus acuminatus</i>	Euphorbiaceae
	Filantostina 1		
	Vernolepina	<i>Vernonia hymenolepis</i>	Compositae
Diterpenos	Gnidina	<i>Gnidina lomprantha</i>	Thymelaeaceae
	Jatrofona	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Euphorbiaceae
	Taxodiona	<i>Taxodium distichum</i>	Taxodiaceae
	Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxaceae
	Tripdiólido	<i>Trypterygium wilfordii</i>	Celestraceae
	Triptólido		
Curcubitacinas Saponina Cardenólido Witanólido	Curcubitacina E	<i>Mara oreganus</i>	Cucurbitaceae
	Acer saponina P	<i>Acer negundo</i>	Aceraceae
	Estrofantidina	<i>Parquetina nigrencens</i>	Asclepiadaceae
	Witaferina A	<i>Acnistus arborescens</i>	Solanaceae
Lignanós	Podofilotoxina	<i>Podophyllum hexamdrum</i>	Podophyllaceae
	Esteganacina	<i>Steganotaenia araliacea</i>	Umbelliferae
Quinonas	jacaronona	<i>Jacaranda caucana</i>	Bignoniaceae
	Lapachol	<i>Steganotaenia suaveolens</i>	
Alcaloides Pirrolizidina Isoquinolina Benzofenantridina No heterociclicos Péptidos	Monocrotalina	<i>Crotalaria spectabilis</i>	Leguminosae
	Indicin-N-óxido	<i>Heliotropium indicum</i>	Boraginaceae
	Emetina	<i>Cephaelis acuminata</i>	Rubiaceae
	Tetrandrina	<i>Cyclea peltata</i>	Menispermaceae
	Leurosina	<i>Thalictrum dasycrapum</i>	Cephalotaxaceae
	Vinblastina	<i>C. harrungtonia</i>	Cephalotaxaceae
	Vincristina	<i>Chataranthus lanceus</i>	Cephalotaxaceae
	Colchicina	<i>C. roseus</i>	Apocynaceae
		<i>M. Serrata</i>	Celasteraceae

En la Figura 2 se muestran los medicamentos de uso común en la clínica para el tratamiento del cáncer, los cuales son capaces de detener alguna fase del proceso canceroso²⁴, algunos de ellos han sido aislados de plantas superiores, las que han constituido una fuente asequible de sustancias bioactivas de gran utilidad en la medicina.^{25,26} Los agentes antineoplásicos comprenden una gran diversidad de compuestos que se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción intracelular:

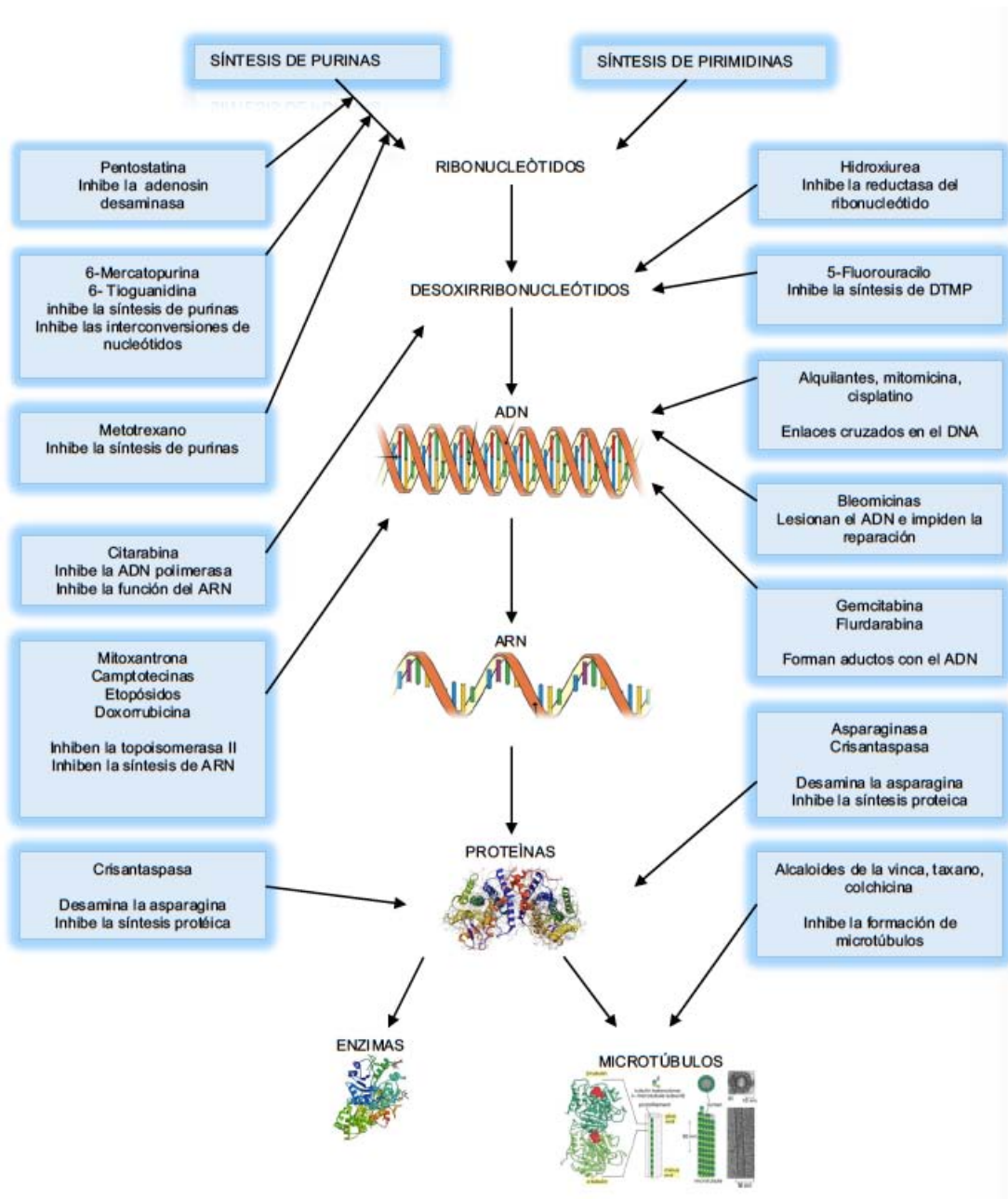


Figura 2. Fármacos usados para el tratamiento del cáncer.

1. Fármacos citotóxicos.

a) Antimetabolitos

Son sustancias similares a los metabolitos naturales, pero se han introducido uno o dos cambios en su estructura química. La célula los utiliza indistintamente; pero el antimetabolito induce la síntesis letal de bases púricas y pirimídicas. Algunos ejemplos son: el metotrexato, la 6-mercaptopurina y la 5- fluorouridina.^{21, 27}

b) Agentes alquilantes

Son un grupo heterogéneo de sustancias que tienen la propiedad común de donar, en situaciones fisiológicas, grupos alquilo a macromoléculas biológicamente vitales. Los efectos farmacológicos más importantes de estos agentes son la alteración de los mecanismos fundamentales que intervienen en la proliferación celular, en particular la síntesis de ADN y la división celular, entre ellos las mostazas nitrogenadas como la ciclofosfamida y el clorambucilo.^{24,27}

c) Antibióticos antitumorales

Son productos de origen microbiano, que inhiben el crecimiento tumoral, por lo general provienen de bacterias del género *Streptomyces*. Este grupo de fármacos tienen la propiedad de intercalarse en el ADN y así bloquear la síntesis de proteínas y ARN, entre los que se encuentran la actinomicina D y la mitomicina.²⁷

d) Inhibidores de la topoisomerasa II

Estos agentes no detienen las células en mitosis, sino que forman un complejo ternario con la topoisomerasa I y el ADN. Este complejo ocasiona ruptura en el ADN. Las células que están en fases S y G₂ son más sensibles a estos fármacos. Por ejemplo: el etopósido y el tenipósido.²⁷

d) Inhibidores de la mitosis

Diversos alcaloides derivados de plantas tienen actividad antineoplásica; entre ellos se encuentran los derivados de la vinca y al taxol.²⁵ Dentro del primer grupo, dos alcaloides tienen fundamental importancia: la vincristina y la vinblastina, obtenidos de la vinca (*Catharantus roseus*), que se han convertido en agentes clínicos importantes para tratar leucemias, linfomas y el cáncer testicular. Sus actividades biológicas se explican por su capacidad de ligarse específicamente a la tubulina y bloquear la propiedad de dicha proteína para polimerizarse en microtúbulos. Por otro lado, el taxol (paclitaxel) es otra droga citoesquelética que tienen como diana la tubulina. El paclitaxel se une a la subunidad beta de la tubulina. Las células tratadas con paclitaxel sufren disfunción del ensamblamiento de los microtúbulos, segregación cromosómica y división celular. A diferencia de otras drogas que se unen a la tubulina, como la colchicina, que inhibe el ensamblado de los microtúbulos, el paclitaxel estabiliza el microtúbulo polimerizado y lo protege de su despolimerización. Los cromosomas por tanto no podrán alcanzar la configuración necesaria para la metafase. Esto bloquea la continuación de la mitosis y prolonga la activación de los puntos de control de la mitosis, induciendo la apoptosis o bien revirtiendo el ciclo celular a la fase G, donde no se da división celular, por lo que en las células tratadas con este compuesto se observan haces de microtubúlos y estructuras aberrantes. En consecuencia el ciclo celular se detiene en mitosis.

2. Agentes hormonales

El efecto de la hormonoterapia se produce a partir de diversos mecanismos, como impedir o reducir la síntesis de hormonas que favorecen el crecimiento tumoral, antagonizar sus efectos, interferir su acción sobre la célula diana e interactuar en los procesos de regulación interhormonal; por ejemplo: antiestrógenos y antiprolactinémicos.²⁷

2.1.8 Mecanismos de resistencia a la quimioterapia

La resistencia a los fármacos es uno de los principales problemas que limita la efectividad de la quimioterapia contra el cáncer. La resistencia de las células cancerosas a los fármacos puede ser primaria es decir que está presente cuando se administra el fármaco por primera vez, o resistencia adquirida la cual se desarrolla durante el tratamiento. Una propiedad de la resistencia adquirida es que los tumores no únicamente se hacen resistentes al fármaco originalmente usado, sino que pueden desarrollar resistencia cruzada hacia otros fármacos aun cuando sus mecanismos de acción sean diferentes; además, puede deberse a una adaptación de las células tumorales o a una mutación, con aparición de células que se ven menos afectadas o que no se afectan por el fármaco, por lo tanto tienen una ventaja selectiva sobre las células sensibles. Aunque existen otras causas como las alteraciones genéticas y epigenéticas específicas, además de aquellas relacionadas al hospedero, es decir, poca absorción, rápido metabolismo o excreción del fármaco, poca tolerancia a los efectos de éste, por lo que se requiere disminuir las dosis por debajo de los niveles óptimos, así como la inhabilidad para liberar el fármaco en el sitio del tumor.²⁷ Se han descubierto numerosos mecanismos presentes en las células tumorales que actúan para reducir los efectos tóxicos de los fármacos:

- 1) resistencia a múltiples fármacos no dependiente de glicoproteína P;
- 2) enzimas citoplasmáticas (transferasas-S de glutation (GST) y proteína de resistencia pulmonar (lung resistance protein, LRP);
- 3) resistencia atípica a múltiples fármacos [enzimas involucradas en la topología del ADN (topoisomerasa del tipo I y II)] y,
- 4) proteínas transmembranales que funcionan como bombas de expulsión tales como la familia MRP (Multidrug Resistance associated Protein), BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) y la glicoproteína P.

Se ha establecido que la expresión de estas proteínas transportadoras o bombas inespecíficas tipo ABC (ATP Binding Cassette) en las células tumorales, se ha asociado a una expulsión activa del fármaco del citoplasma al exterior de la célula tumoral.²⁸ Particularmente, los blancos de estas bombas son fármacos hidrofóbicos tales como: los taxanos, las antraciclinas y los alcaloides de la planta *Catharantus roseus*. El inhibidor de la topoisomerasa I (topo-I), irinotecan, así como su metabolito activo SN-38, también son blancos para bombas tipo ABC al igual que el cisplatino y el metotrexato.²⁹

La multirresistencia a fármacos ha sido ligada a la sobreexpresión de la glicoproteína P (P-gp), la cual se ha identificado en numerosas líneas resistentes a fármacos y en diversas leucemias y tumores sólidos, lo cual ha llevado a la búsqueda de inhibidores de P-gp y otras proteínas transportadoras. Estos mecanismos de resistencia tienen en común que presentan un patrón cruzado de resistencia pero difieren en las vías por las cuales se adquiere dicha resistencia.

En la actualidad existe una gran diversidad de fármacos utilizados en quimioterapia que han sido desarrollados para inhibir actividades celulares. Sin embargo, las células llegan a presentar diversos mecanismos de resistencia a fármacos, que pueden ser asociados con la actividad del fármaco utilizado en quimioterapia. Se han descubierto numerosos mecanismos presentes en las células tumorales que actúan para reducir los efectos tóxicos de los fármacos, estos mecanismos se ilustran en la Figura 3.²⁸

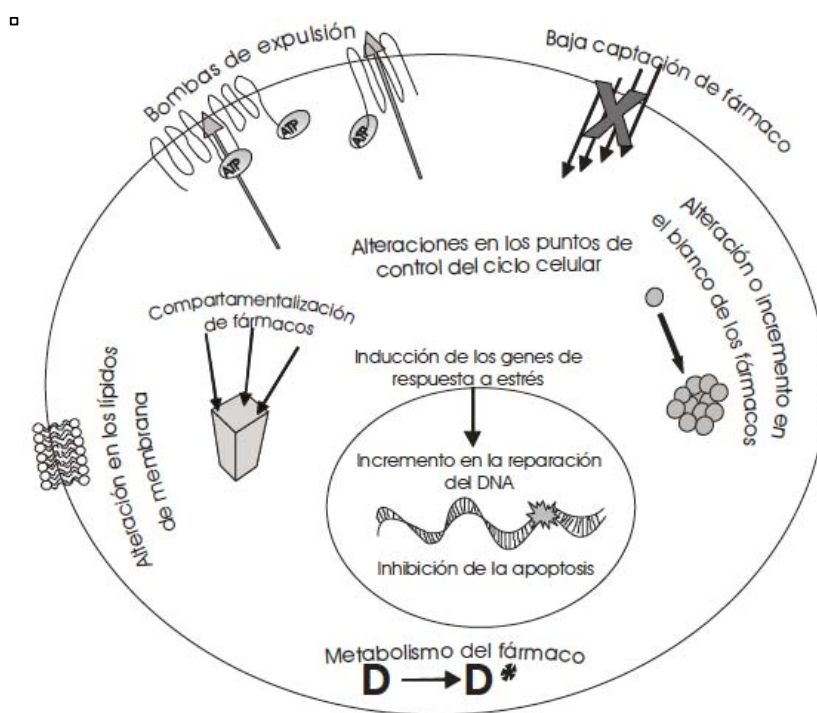


Figura 3. Mecanismos de resistencia las células cancerosas.²⁸

2.2 Proteínas de membranas relacionadas con la resistencia a fármacos.

Transportadores ABC

Los transportadores ABC son una extensa familia de proteínas de membrana que regulan la entrada de nutrientes esenciales y iones, así como la salida de los productos del metabolismo celular, las toxinas ambientales y otros productos xenobióticos. La estructura general de estas moléculas consiste en dos regiones transmembranales (TM), las cuales constan de 6 dominios que atraviesan la membrana y cada región contiene un sitio de unión de ATP (ABC) localizado en la parte citoplasmática de la membrana (Figura 4).^{28,30-32}

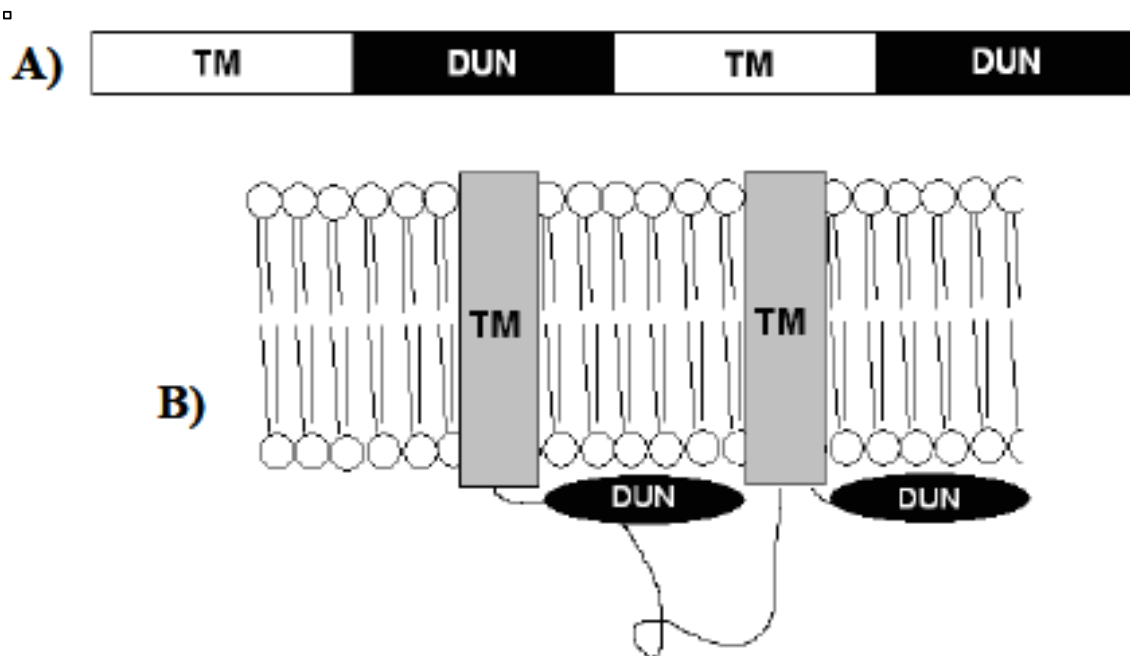
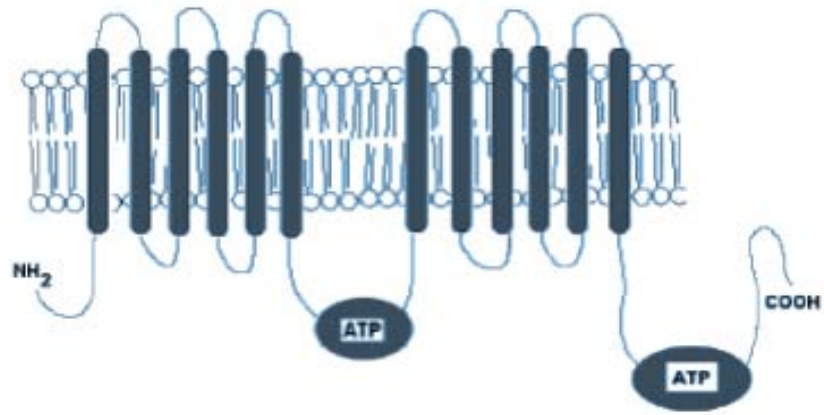


Figura 4. Diagrama de un transportador ABC. A) organización típica de los transportadores ABC. Dominios transmembranales (TM) seguidos por dominios de unión al nucleótido (DUN) B) Esquema simplificado de la topología de los transportadores ABC. Las elipses oscuras representan la región de unión del ATP.

Se han descrito transportadores ABC en células y tejidos humanos asociados con el fenotipo de resistencia a fármacos (Figura 5), entre los principales transportadores ABC involucrados en la resistencia están los miembros de la familia de MDR (Multidrug resistance), con 12 dominios TM y dos dominios de unión de ATP, la familia MRP cuya estructura presenta dos dominios de unión de ATP y una región adicional con 5 dominios TM en el extremo amino terminal, dando como total una proteína de 17 dominios TM y los transportadores BCRP, que contiene seis dominios TM y un sitio de unión de ATP en la región amino terminal.^{33,34}

o

- EJEMPLOS
A) gp-P / MDR1 (ABCB1)
MRP4 (ABCC4)
MRP5 (ABCC5)
BSEP/ SPGP (ABCB11)



- B) MRP1 (ABCC1)
MRP2 (ABCC2)
MRP3 (ABCC3)
MRP6 (ABCC6)



- C) BCRP/ABCP/MXR
(ABCG2)

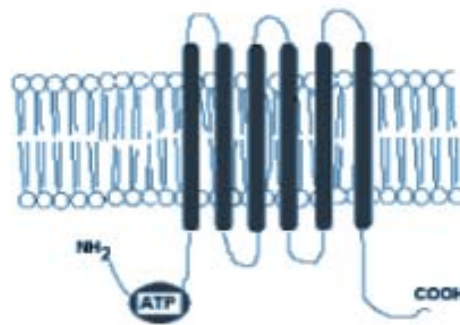


Figura 5. Estructura de los transportadores ABC relacionados con la resistencia a fármacos. A) Transportadores ABC como glicoproteína-P (MDR1), B) Estructura de MRP1 C) Estructura representativa de los medio-transportadores BCRP. Dominios transmembranales (barras oscuras) y dominios de unión de ATP (esferas).^{35,36}

2.2.1 Estructura de la glicoproteína P (gp-P)

Desde la década de los 70, la gp-P se ha caracterizado bioquímicamente como una glicoproteína que se extiende en la bicapa lipídica y que actúa como una bomba de membrana que activamente exporta fármacos al exterior celular. Se obtuvieron las primeras evidencias sobre la asociación de la baja acumulación del fármaco y la sobreexpresión de una proteína de membrana plasmática de 170 Kd, que está compuesta por una cadena de aproximadamente 1280 residuos de aminoácidos con dos mitades homólogas, cada una con un segmento N-terminal hidrofílico y un segmento C-terminal hidrofóbico y 12 dominios transmembranales.³⁷ Cada cadena dispone de seis regiones de transmembrana a las que se pueden unir numerosos xenobióticos como los fármacos antitumorales. En su cara intracelular hay una región hidrofílica a la que se liga una molécula de ATP, un sitio de glucosilación entre el primero y el segundo dominio transmembranal y varios sitios de fosforilación (Figura 5).

2.2.2 Características genéticas de la glicoproteína P

El gen MDR-1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, y codifica para la proteína de 170 kDa, también conocida como glicoproteína P (gp-P).²⁸ Este gen forma parte de una familia que tiene dos miembros en los humanos (MDR1 y MDR2/3). Sólo la MDR1 (gp-P) está relacionado con la resistencia múltiple a fármacos, en tanto que la MDR3 está relacionada con la secreción de ácidos grasos en la bilis, transporta fosfatidilcolina de la membrana interna a la externa y tiene actividad de lipasa.³⁸ La glicoproteína pertenece a la superfamilia de proteínas ABC (casete de unión de ATP) especializadas en el transporte celular dependiente de energía, que participa en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas y movilización de iones y péptidos.^{38,39}

2.2.3 Papel fisiológico de la glicoproteína P

La expresión de gp-P se ha encontrado en la superficie luminal de células epiteliales de órganos maduros con capacidad excretora-secretora. La corteza adrenal, el túbulo proximal del riñón, intestino grueso o delgado, hepatocitos biliares, barrera hematoencefálica, placenta, etc., expresan gp-P de forma difusa y con mayor intensidad que el resto de los tejidos, esto sugiere que tiene un papel importante en la absorción y excreción de múltiples sustratos (toxinas y desechos), incluyendo fármacos y xenobióticos en tejidos normales.^{33,35,39}

2.2.4 Funcionamiento de la glicoproteína P

La gp-P muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembrana N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplásmicos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de fármacos al exterior celular, disminuyendo la concentración en el interior de la célula a niveles que resultan inactivos.^{23,37,38} La unión del fármaco a la gp-P es esencial para la inactivación. El fármaco no sólo es bombeado fuera de la célula tumoral sino que también disminuye su entrada. Los compuestos entran en la célula por difusión pasiva y son detectados por la gp-P en la membrana y expulsados al exterior de modo que no puedan alcanzar la concentración necesaria para ejercer su efecto citotóxico. El eflujo se realiza a través del poro directa o indirectamente de un amplio rango de fármacos anticancerígenos lipofílicos y anfipáticos estructural y funcionalmente diversos, por lo que evita que los mismos ejerzan su actividad citotóxica al disminuir su concentración intracelular.⁴⁰ Esta interacción con compuestos estructuralmente diversos sugiere diferentes entornos químicos para sus múltiples sitios de unión. De acuerdo a las interacciones, estos compuestos pueden ser transportados por:

- 1) Transporte pasivo del fármaco a través de la membrana celular.
- 2a) Formación de canales hidrofóbicos (poros) entre los espacios intracelulares y extracelulares.

2b) Actividad de flippasa en donde el fármaco es translocado (flipped) de la cara interna a la cara externa de la membrana celular.

2c) “Modelo de aspiradora” en el cual el fármaco interactúa con gp-P en la bicapa y subsecuentemente es expulsado de nuevo al espacio extracelular (Figura 6).⁴¹

□

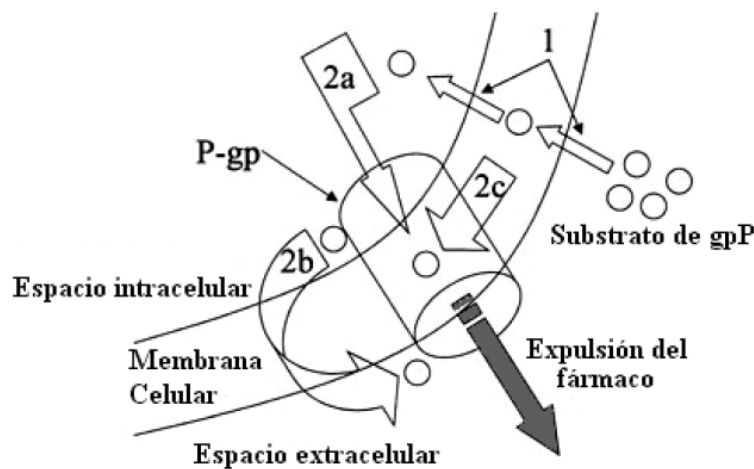


Figura 6. Mecanismo de acción de gp-P, planteados para la expulsión de fármacos.⁴¹

La reversión del fenotipo MDR (multirresistencia a fármacos o resistencia cruzada a fármacos) durante o después de un tratamiento quimioterapéutico hasta ahora se ha explicado como una respuesta inespecífica al tratamiento farmacológico con agentes capaces de interactuar con la gp-P. Estos fármacos son compuestos hidrofóbicos, incluyendo una variedad de fármacos antineoplásicos, agentes citotóxicos y fármacos que revierten el fenotipo MDR (Cuadro 2). Sin embargo, el espectro de sustancias que pueden ser transportadas por la gp-P es muy amplio ya que se ha descubierto que es una bomba inespecífica a los xenobióticos y, por lo tanto, el número de sustratos se ha incrementado de forma progresiva, además muchos fármacos como los antagonistas de los canales de calcio, ciclosporina A, interfieren en la expresión y función de la gp-P, generalmente, a través de un mecanismo de inhibición competitiva. La mayoría de los sustratos de esta bomba de extrusión pueden ser agentes antitumorales, por ejemplo, los alcaloides de la vinca como la vincristina y

la vinblastina; las atraciclinas como la daunorrubicina y la doxorrubicina y las epipodofilotoxinas como el etopósido y tenopósido.^{2,3}

Cuadro 2. Compuestos que interactúan con la glicoproteína-P

Antineoplásicos	Agentes revertidos de MDR	Otros citotóxicos	Péptidos cíclicos y lineales
Daunorrubicina	Verapamilo	Colchicina	Actinomicina D
Doxorrubicina	Nifedipino	Bromuro de etidio	Gramicidina D
Mitoxantrona	Azidopina	Emetina	Valinomicina
Etopósido	Quiniclina	Puromicina	
Vinblastina	Reserpina		
Vincristina	Ciclosporina A		
Mitomicina C	FK506		
Paclitaxel	Rapamicina		
Actinomicina D			
Topotecan			

2.2.5 Agentes moduladores de la actividad de glicoproteína P

Una de las principales características de la MDR es su importancia en el tratamiento de diversas enfermedades (epilepsia, VIH, cáncer, etc.). La industria farmacéutica se ha enfocado en desarrollar fármacos para inhibir su actividad; las células seleccionadas en función de su resistencia a un agente citostático son también resistentes a otros agentes que no poseen ningún tipo de analogía funcional o estructural, pues unos actúan como inhibidores de la síntesis de DNA o RNA, otros intervienen en el potencial de membrana y otros en la formación de la tubulina. Lo único que tienen en común estos compuestos es su propiedad anfipática y que algunos de ellos poseen anillos aromáticos hidrofóbicos. Por ejemplo, se han desarrollado bloqueadores de canales de calcio (verapamilo), fármacos hipotensivos (reserpina), antibióticos (gramicidina, cefalosporinas) e inmunosupresores (ciclosporina A) (Cuadro 3). Estos compuestos tienen como función inhibir competitivamente la unión o transporte de los fármacos de quimioterapia.⁴²⁻⁴⁵

Cuadro 3. Moduladores de la glicoproteína P	
Bloqueadores de calcio	Verapamilo, Diltiazem, Nicardipina
Análogos de antraciclinas	N-acetildaunorrubicina, Cianomorfilin-doxorrubicina
Fármacos contra la malaria	Quinina, Cloroquinas, Quinidinas
Antibióticos	Eritromicina, Cefarantidina, Cefoperazona
Fármacos cardiovasculares	Amiodaruna, Dipyridamol, Propranolol
Inmunosupresores	Ciclosporina A, Valspodar
Inhibidores de calmodulinas	Clorpromazina, Trifluoroperazina
Esteroides y derivados	Tamoxifen, Progesterona

2.2.6 BCRP/ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein)

En 1998, se descubrió y clonó casi simultáneamente en tres laboratorios diferentes el gen del transportador ABC relacionado más recientemente con el fenotipo MDR en cáncer: la proteína BCRP codificada por el gen ABCG2 que fue aislada a partir de una sublínea celular humana de cáncer de mama, seleccionada por su resistencia a las antraciclinas y doxorubicina en presencia de verapamilo. Debido a esta característica, le dieron el nombre de proteína de cáncer de mama relacionada con la resistencia (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP/MDR/ABCG2).⁴⁶ El gen humano BCRP/ ABCG2 se localiza en el cromosoma 4q22, tiene 66 Kb y consta de 16 exones (Figura 7). BCRP se traduce en una proteína de 655 aminoácidos con un peso molecular de 72.6 kDa.

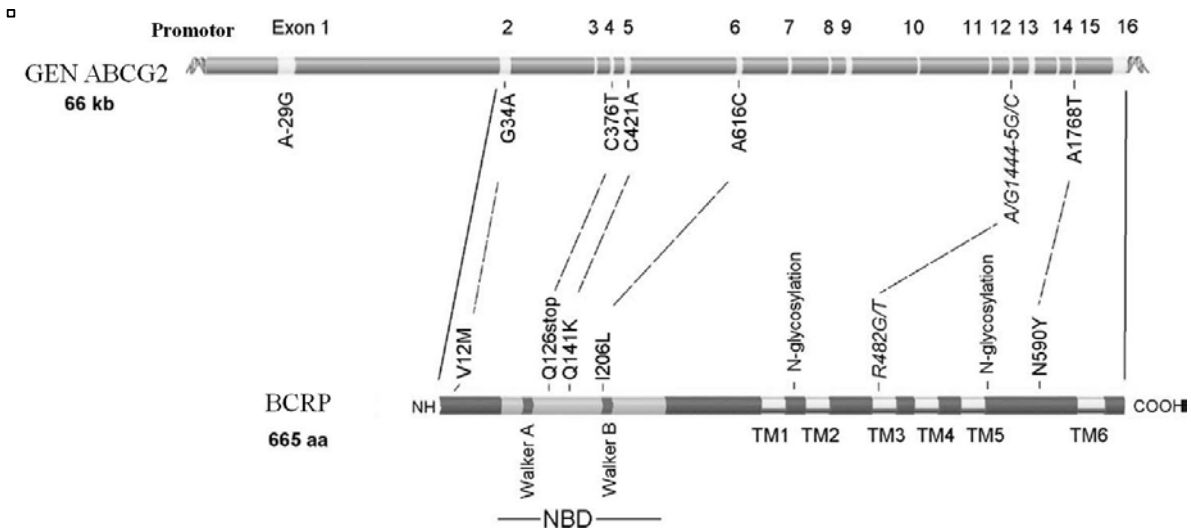


Figura 7. Estructura del gen ABCG2 humano y de la proteína derivada mostrándose algunos de los polimorfismos descritos en la especie humana. NBD: Nucleotide Binding Domin, región de unión de nucleótidos; TM: regiones transmembranales.

2.2.7 Estructura de la proteína y configuración funcional.

La proteína BCRP se considera como un “medio transportador” ya que no presenta la estructura típica de los otros transportadores ABC (6+6 TM y 2 DUN). El transportador BCRP contiene en su región amino terminal un dominio a ATP y en su región carboxilo terminal posee 6 dominios TM (Figura 8) y un sitio de unión a ATP.^{47,48}

La proteína BCRP tiene un peso de 70 kDa y su actividad de transportador se debe a su estructura como homodímero en un complejo de 140 kDa.

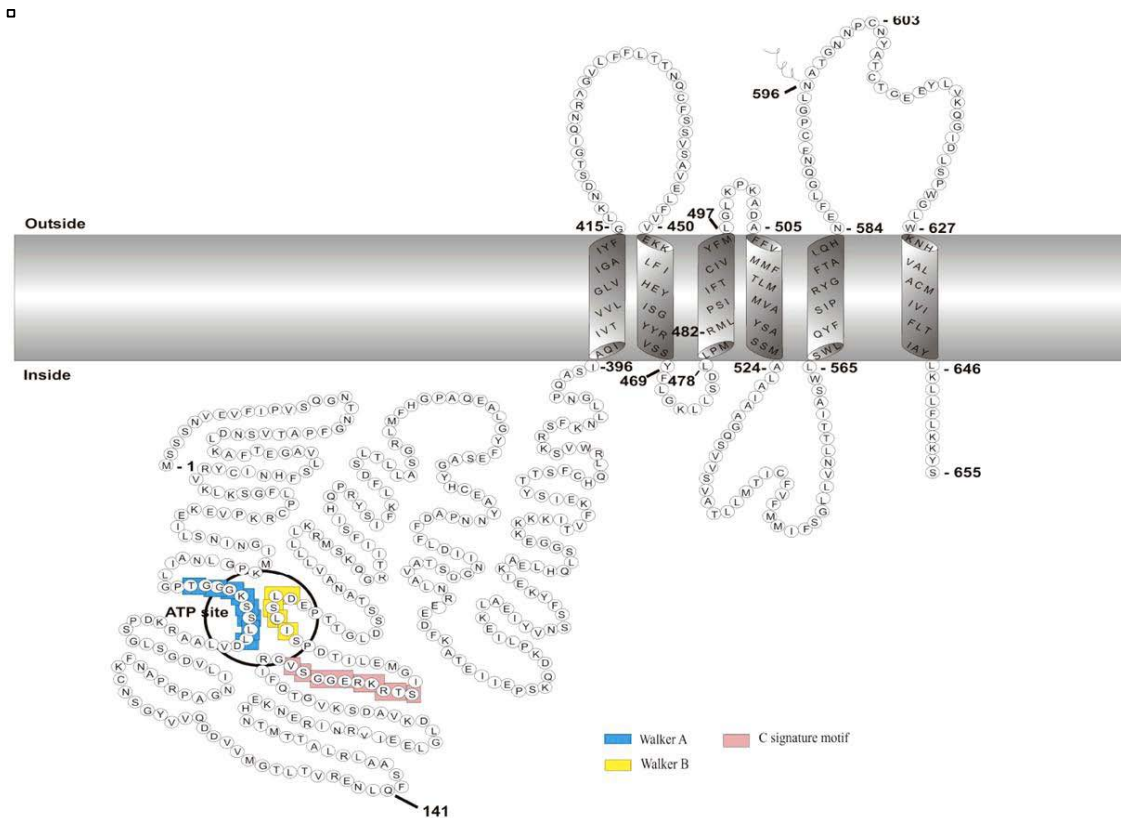


Figura 8. Conformación de ABCG2 en la membrana plasmática, el dominio transmembranal formado por 6 regiones y un sitio de unión a ATP

2.2.8 Distribución tisular y función fisiológica.

La proteína BCRP se expresa en placenta, en la membrana canalicular del hígado, intestino delgado, pulmón, riñón, glándulas sudoríparas, membrana apical del colon, en el endotelio de las venas y vasos capilares; en tejidos como cerebro, corazón, próstata, estómago y vejiga. En el cuello uterino se encontró con una baja o indetectable expresión (Figura 9).^{47,49} BCRP se ha encontrado en diferentes líneas celulares seleccionadas con mitoxantrona (MTX) y topotecan. El fenotipo de resistencia conferida por BCRP pareciera coincidir con el observado para la gp P (a pesar de estar poco relacionadas filogenéticamente); sin embargo, existen importantes diferencias en la eficiencia de los mecanismos. Además de que la implicación clínica en el fenotipo MDR de cánceres humanos, por el momento, sólo parece clara para el caso de la glicoproteína P.⁵⁰

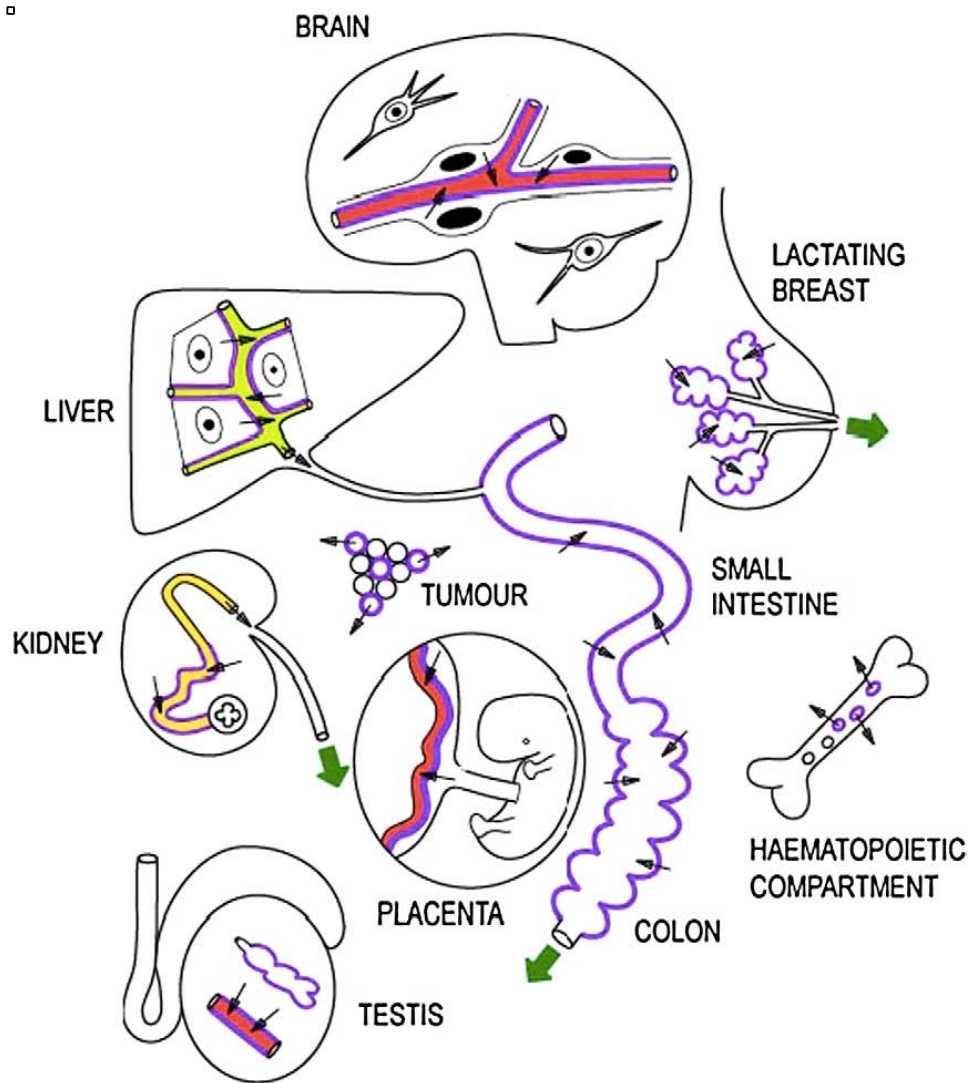


Figura 9. Órganos en los que se localiza el transportador ABCG2. Las flechas pequeñas indican la dirección del transporte mediado por ABCG2 en cada órgano. Las flechas grandes indican la excreción neta del organismo de los sustratos de la ABCG2. La expresión en células endoteliales, capilares y venas en los distintos tejidos no aparece indicada.⁴⁹

2.2.9 Principales características de los sustratos e inhibidores de BCRP (ABCG2)

ABCG2 es capaz de transportar un amplio espectro de compuestos, solapándose en algunos casos con los sustratos de la gp-P (MRP1); fundamentalmente, se trata de moléculas hidrofóbicas cargadas positiva o negativamente. Cabe destacar que la mayoría de las células que sobreexpresan ABCG2 son resistentes a agentes quimioterapéuticos y presentan una alta afinidad para su expulsión como son el caso de la: mitoxantrona, tepotecan, irinotecan, indolcarbazoles, antifolatos, flavopiridol, prazosina e inhibidores de tirosina cinasas como imatinib y erlotinib, algunos antibióticos (nitrofurantoína, fluoroquinolonas) y la vitamina B2.³³ ABCG2 también interacciona con las porfirinas⁵¹ como la feoforbida A que es un metabolito clorofílico empleado como fotosensibilizador en el tratamiento de tumores y se ha descrito como sustrato de ABCG2. Además, se conoce un amplio número de sustancias inhibitoras entre las que se encuentran compuestos esteroidales como la corticosterona y la digoxina.⁵²

La inhibición de ABCG2 se considera como una estrategia para el tratamiento farmacológico del cáncer, ya que en algunos tumores hay una alta expresión del transportador y la inhibición permitiría la acumulación intracelular de agentes quimioterapéuticos. Las células que expresan BCRP presentan una resistencia cruzada con camptotecina, inhibidor de topoisomerasa I. También puede expulsar otros compuestos fluorescentes como antraciclinas, bisantreno, rodamina 123, etc. El primer inhibidor de la actividad de ABCG2 descrito fue fumitremorgina C, toxina aislada de *Aspergillus fumigatus*.^{45,48} Su análogo Ko143, se utiliza ampliamente en los ensayos de laboratorio.⁵³

2.3 Género *Salvia*.

El género *Salvia* agrupa al mayor número de especies de la familia Lamiaceae con aproximadamente 900 especies distribuidas en el mundo. Las principales áreas de diversidad se localizan en México y Sudamérica. Estas plantas fueron organizadas en 4 subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y

Calosphace. De los 220 géneros que conforman a la familia de las lamiaceas, el género *Salvia* destaca por su uso en la medicina tradicional.⁵⁴

2.3.1 Descripción y usos etnobotánicos de especies del género *Salvia*.

El uso de especies de la familia Lamiaceae data de tiempos ancestrales, algunos de los principales géneros de esta familia usados en la medicina tradicional son: *Ajuga*, *Coleus*, *Rabdosia*, *Scutellaria* y *Teucrium*, destacando el género *Salvia* debido al número de especies que posee y a la gran variedad de metabolitos que son aisladas de estas especies; en las figuras 10 y 11 se ilustran dos ejemplos. En particular, *Salvia amarissima* es una planta mexicana a la que se atribuyen actividades hipoglucemiantes, antiulcerosas y antihelmínticas.⁵⁵ *Salvia divinorum* es una hierba psicoativa alucinógena endémica de la sierra del Estado de Oaxaca y ha sido utilizada por los indígenas mazatecas de esa región durante siglos. Este miembro del género *Salvia* se conoce como menta mágica y, en forma más coloquial, como la hierba María y hoja de la pastora, que se refieren a la creencia de que la *Salvia divinorum* es la reencarnación de la Virgen María. El uso recreacional de esta planta como psicoativa se ha difundido globalmente, siendo su principal constituyente activo, la salvinorina A, un diterpeno neoclerodánico. Este producto natural representa el primer agonista no nitrogenado y selectivo de los receptores κ -opioides del cerebro. Dosis entre 200-500 μg pueden inducir alucinaciones profundas.



Figura 10. *Salvia amarissima*



Figura 11. *Salvia divinorum*

El género *Salvia*, se caracteriza por ser una importante fuente de metabolitos secundarios, entre los que destacan monoterpenos, diterpenos, triterpenos⁵⁶, flavonas⁵⁷, compuestos fenólicos.⁵⁸ Existen especies de interés en la medicina tradicional, de éstas se han aislado compuestos diterpénicos, algunos con esqueleto de abietano y en general presentan actividad biológica, destacando sus propiedades bactericidas y anticancerosas.

Algunas especies han sido estudiadas por sus propiedades antimicrobianas atribuidas a sus aceites esenciales que presentan una gran variedad de compuestos monoterpénicos y sesquiterpénicos cuyo perfil puede cambiar de acuerdo con la especie, la temporada del año de cosecha y la distribución geográfica, entre otros factores.⁵⁹ Alguno de los usos que tienen las especies del género *Salvia* en la medicina tradicional mexicana se muestran en la Cuadro 4.^{60,61}

La variedad de metabolitos secundarios aislados de estas especies, colectadas en diferentes regiones geográficas, es muy diferente, observando lo mismo en *S. amarissima*. En un estudio químico del extracto no polar obtenido de las hojas de una colecta de Oaxaca, permitió el aislamiento de la amarisolida, un diterpeno de tipo clerodano glicosilado, el cual presentó actividad antiinflamatoria.⁶² En un estudio reciente, el extracto de acetona de las hojas de una colecta del Estado de México, guió al aislamiento de la teotihuacanina, un diterpeno de tipo clerodano rearreglado, con potente actividad moduladora en líneas celulares resistentes a la vinblastina. En esta colecta, la amarisolida no se encontró. El posible mecanismo para la obtención de la teotihuacanina es ilustrado en la figura 12.⁶³

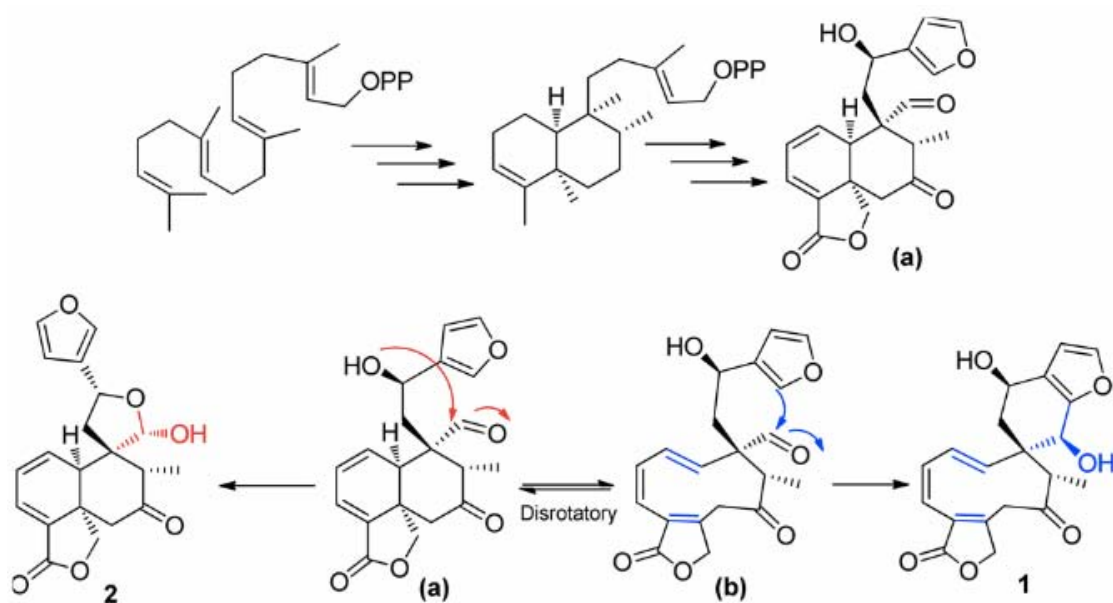


Figura 12. Posible mecanismo de formación de la teotihuacanina.

Cuadro 4. Usos de especies de género *Salvia* en la medicina tradicional mexicana.

Especie	Nombres populares	Usos
<i>Salvia adenophora</i>	Mirto	Diarrea
<i>Salvia coccinea</i>	Mirto, cimarrón.	Disentería, infecciones en los ojos, sangrado nasal,
<i>Salvia divinorum</i>	Pastora	Diarrea, dolor de cabeza y reumatismo
<i>Salvia elegans</i>	Mirto, Jetcho deni	Tos, insomnio, sarampión
<i>Salvia fulgens</i>	Mirto	Insomnio
<i>Salvia hispánica</i>	Chía	Dolor
<i>S. lavanduloides</i>	Bacal nichz, lúcoma	Tos, bronquitis
<i>S. leucantha</i>	Salva real	Abortivo, anticonceptivo, fiebre
<i>S. microphylla</i>	Mirto	Dolor de estómago, empacho, cólicos, diarrea, problemas menstruales, insomnio y disminución de la ansiedad.

2.4 Pruebas biológicas en la evaluación de productos naturales.

Las pruebas biológicas son un indicador de la acción de una sustancia en un organismo vivo, desde ensayos preliminares en líneas celulares y microorganismos hasta ensayos en fase clínica en humanos. La simplicidad o complejidad de la prueba depende de la actividad que se quiere comprobar. En el caso de la química de productos naturales, los extractos crudos de plantas o las sustancias químicas aisladas se evalúan mediante una serie de pruebas biológicas preliminares. Esto permite discernir la acción o las acciones potenciales para posteriormente buscar modelos biológicos más precisos.

Una clasificación de los ensayos biológicos en base a su tipo pudiera ser *in vitro* o *in vivo*. El primer grupo engloba principalmente a líneas celulares y pruebas de laboratorio que permiten observar la acción sobre enzimas. En el segundo grupo se utilizan animales modelo de laboratorio desde protozoarios y crustáceos hasta ratas, cobayos, conejos, perros y monos. Ambos modelos son muy utilizados para probar la efectividad o toxicidad y su selección depende de los estudios previos que existan sobre la sustancia y la cantidad de muestra que se pueda obtener. De esta manera, se ha centralizado el interés en las metodologías alternativas *in vitro*, modelos que pueden generar resultados con validez internacional, relativamente económico, rápido y sencillo, además de que contribuyen a la reducción del empleo de animales de laboratorio y abren la posibilidad de realizar estudios a nivel molecular. El tamizaje preliminar de agentes anticancerígenos emplea grupos de líneas celulares derivadas de tumores humanos que son expuestas a la sustancia en estudio por un periodo determinado, al cabo del cual se evalúa la viabilidad celular; la capacidad citotóxica de los agentes estudiados es interpretada como un indicativo de potencial anticancerígeno *in vivo*. Para llegar a los ensayos en fase clínica en humanos se requiere la mayor cantidad de información disponible en ambos tipos de pruebas, además, la acción biológica debe demostrar ser más efectiva o menos tóxica en comparación con el fármaco de elección y/o que muestre alguna ventaja competitiva.^{32,34,64}

3. HIPÓTESIS

Un nuevo estudio químico de la especie *Salva amarissima* y la evaluación biológica tanto de fracciones como de compuestos puros, permitirá establecer si el aislamiento de otros productos naturales no presentarán actividad citotóxica y que podrán revertir la resistencia a multifármacos como se estableció con la teotihuacanina, un producto novedoso aislado de la misma especie que presento una potente actividad moduladora; al mismo tiempo se intentará establecer si actúan modulando la actividad de la gp-P y ACBG2.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el potencial citotóxico y modulador de los compuestos STJ-1, STJ-2-, STJ-3, STJ-6, STJ-7, extracto total de acetona y fracción de acetato de etilo provenientes de *Salvia amarissima*.

4.2 Objetivos Específicos

- I. Determinar la CI_{50} de los compuestos naturales por medio de ensayos de citotoxicidad utilizando líneas provenientes de carcinomas humanos.
- II. Realizar los ensayos de modulación empleando la línea celular sensible y resistente de la línea MCF (carcinoma de mama).
- III. Realizar una revisión bibliográfica enfocada a la búsqueda de condiciones experimentales que permitan explorar el mecanismo de modulación.
- IV. Iniciar con la implementación de biosensayos que permitan establecer el mecanismo de modulación de la multirresistencia de la teotihuacanina.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Compuestos de prueba

Extracto de acetona

Fracción de acetato de etilo

Teotihuacanina (1)

Amarisinina A (2)

Amarisinina B (3)

Amarisinina C (4)

STJ-7

5.2 Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares tumorales de origen humano con diferentes sitios de origen para tratar de observar diferencias en las respuestas ante la exposición a los compuestos. Las líneas celulares utilizadas son: MCF7 y MDA-MB-231 (carcinoma de glándula mamaria, ambas originalmente obtenidas del líquido pleural de pacientes con adenocarcinoma de la glándula mamaria), HeLa (carcinoma epidermal de cérvix), HCT15 y HCT116 (carcinomas de colon).

5.3 Cultivo de líneas celulares

Se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco), enriquecido con glutamina (200Mm), bicarbonato de sodio al 4% (In vitro) y una solución de penicilina-estreptomina (10 000 U/mL y 10 mg/mL respectivamente, Gibco). Las líneas celulares se cultivaron en una incubadora (Thermo Scientific) a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100 % de humedad.

5.4 Soluciones utilizadas

Solución PBS

Sulforodamida B al 0.4 % (SRB)

Solución de ácido tricloroacético 20%

Solución de ácido acético al 1%

Tris-base (pH 10) 10 mM

5.5 Metodología

5.5.1 Descongelamiento de las líneas celulares

- a) Se agregaron 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 en cajas de cultivo de 25 mL.
- b) Se descongelaron los criotubos conteniendo las células y se adicionaron a las cajas con medio.
- c) Las cajas se dejaron en incubación a 37° C, 100% de humedad y 5% de CO₂ por un periodo máximo de 24 h y se procedió a cambiar el medio. Se dejaron en incubación hasta observar confluencia.

5.5.2 Mantenimiento y propagación de las líneas celulares

- a) Se decantó el medio de cultivo en un frasco estéril.
- b) Se lavó la capa de células con PBS.
- c) Se añadió tripsina y se incubó a 37° C por 5 minutos
- d) Una vez que las células se despegan, se adicionó medio RPMI y se resuspendieron para realizar el conteo celular.

5.5.3 Conteo celular

- a) Se adicionó una alícuota de aproximadamente 40 µL de la suspensión celular en la cámara de Neubauer.
- b) Se contaron los recuadros laterales de la cámara con la ayuda del microscopio.
- c) Se promediaron las células contadas en los cuatro cuadrantes y se calculó el volumen de suspensión celular para colocar 0.5×10^6 cel/ mL en cajas para la resiembra y 5000 cel/mL para las placas de 96 pozos.

5.6. Preparación de diluciones

A partir de una solución de 4 mg/ mL de vinblastina y de los compuestos de prueba, se realizaron las diluciones indicadas en los cuadros 5 y 6 respectivamente. De cada una de estas diluciones se emplearon 10 µL por triplicado. Los compuestos de origen natural se disolvieron en DMSO al 100%

como vehículo. El DMSO tiene un efecto inhibitorio sobre las líneas celulares utilizadas, por lo que la cantidad máxima de DMSO por pozo fue menor o igual a 10%.

Cuadro 5 . Diluciones para el control positivo	
10 µg/mL	10 µL de 4 mg/mL + 190 µL agua estéril
2 µg/mL	40 µL de 10 µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.4 µg/mL	40 µL de 2 µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.08 µg/mL	40 µL de 0.4µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.016 µg/mL	40 µL de 0.08 µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.0032 µg/mL	40 µL de 0.016 µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.00064 µg/mL	40 µL de 0.0032 µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.000128 µg/mL	40 µL de 0.00064 µg/mL + 160 µL DMSO 10%

Cuadro 6. Diluciones de las muestras de prueba	
25 µg/mL	25 µL de 4 mg/mL + 175 µL agua estéril
5 µg/mL	40 µL de 25 µg/mL + 160 µL DMSO 10%
0.2 µg/mL	40 µL de 5 µg/mL + 160 µL agua estéril
0.04 µg/mL	40 µL de 0.02 µg/mL + 160 µL agua estéril

5.7. Bioensayos de actividad biológica

5.7.1 Bioensayo de citotoxicidad.

El método fue desarrollado por Skehan⁶⁴ y consiste en la unión del colorante sulforodamida a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares de una capa celular fijada a una microplaca. La cuantificación de la absorbancia del colorante a 540 nm ayuda a estimar el total de la masa proteica, la cual está relacionada al número de células viables después de adicionar un compuesto citotóxico de prueba. La respuesta obtenida se compara con un grupo control positivo (células en contacto con compuestos citotóxicos, como colchicina y vinblastina) y un grupo control blanco (células a las cuales sólo se adicionó DMSO 10 %). Cuando se tuvieron las cajas con las líneas celulares con un crecimiento de 60-70%, se realizó el conteo celular y se preparó la suspensión celular para

colocar 190 μ L en cada pozo de las cajas de 96 pozos, donde previamente se colocaron 10 μ L de cada una de las diluciones del control positivo o de los compuestos de prueba. Las cajas son incubadas por 72 h y se procedió a la fijación de las células con ácido trifluoroacético.

5.7.2. Caja de día cero o control inicial

1. Se adicionaron 190 μ L de suspensión celular en una caja alterna a la que contiene las muestras.
2. Se incubaron a 37 °C por 30 min
3. Se fijaron las células

5.7.3. Desarrollo de color

- a) A cada pozo de las cajas iniciales y con muestras se adicionaron 100 μ L de sulforodamina B al 0.4%, en ácido acético al 1%, y se dejaron en reposo por 30 minutos.
- b) Se decantó y se eliminó el exceso de colorante con ácido acético al 1%.
- c) Se dejaron secar las placas a temperatura ambiente.
- d) La proteína teñida se solubilizó, agregando a cada pozo 200 μ L Tris-base 10 Mm (pH=10) y agitando de 5-10 min en el agitador de placas.
- e) La absorbancia se leyó a 490 nm en un lector de placas.

5.7.4 Determinación de CI_{50}

Se determinó el porcentaje de crecimiento de las diferentes concentraciones empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{Absorbancia de las células+muestra} - \text{Absorbancia de las células tiempo inicial}}{\text{Absorbancia+DMSO 10\%} - \text{Absorbancia tiempo inicial}} \times 100$$

El valor de CI_{50} se estimó empleando con una gráfica semilogarítmica que relaciona la concentración del compuesto (μ g/mL) contra el porcentaje de

inhibición de crecimiento utilizando el programa Table Curve 2D v5.01 de Jandel Scientific.

5.8 Ensayo de modulación

La modulación fue determinada con la misma metodología indicada en las secciones 5.7.1 a 5.7.4, empleando las líneas celulares indicadas en la Cuadro 7.

Cuadro 7. Líneas celulares empleadas en el ensayo de modulación.	
Línea celular	Características
MCF-7	Línea parental (sensible a vinblastina)
MCF-7/Vin⁺	Línea resistente que crece en presencia de 0.192 µg/mL de vinblastina
MCF-7/Vin⁻	Línea resistente que crece en medio libre de vinblastina.

Las líneas MCF-7 sensible, MCF-7/ Vin⁺, MCF-7/ Vin⁻ fueron sembradas en placas de 96 pozos tratadas con diferentes concentraciones de vinblastina (0.000128-2 µg/ mL) en presencia de compuestos a 25 y 5 µg/mL por 72 h (Figura 13). En estos ensayos se utilizó reserpina (5 µg/ mL) como control positivo. La placa está dividida en líneas 1 a 12 y columnas A a H. Las soluciones se colocan de la siguiente manera. Línea A: 10 µL DMSO 10% + 190 µL suspensión de células. Línea B a H: 10 µL de las diferentes concentraciones de vinblastina (0.00064 a 10 µg/mL). Columna 1-3 filas B-H: 10 µL del compuesto a evaluar a una concentración de 25 µg/mL. Columnas 4-6, filas B-H: 10 µL del compuesto a evaluar (5 µg/mL). Columnas 7-9, filas B-H: 10 µL de reserpina (5 µg/mL). Columnas 1-12, filas B-H + 180 µL de suspensión de células

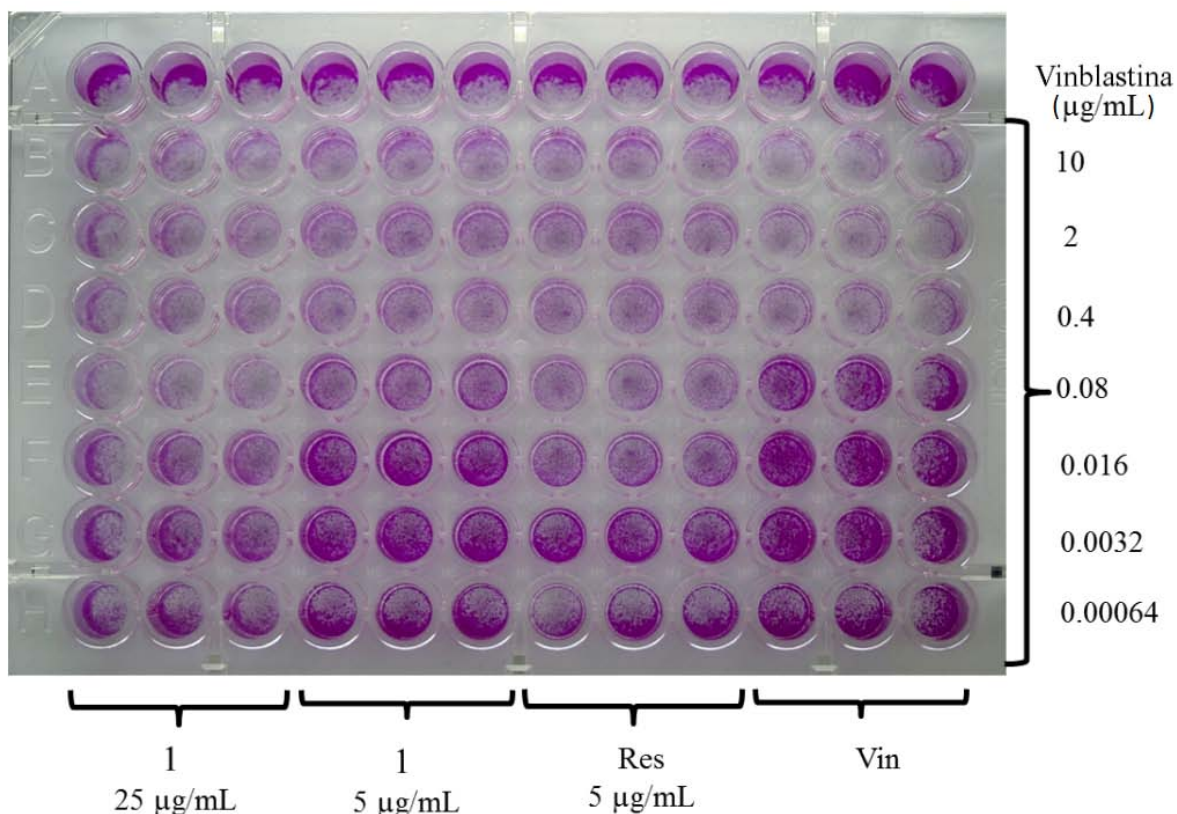


Figura 13. Ensayos de modulación de vinblastina con compuesto 1 (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺. Abreviaciones: Res, reserpina (5 µg/mL); Vin, vinblastina.

Se determinaron las CI_{50} de la vinblastina sola y en presencia de los compuestos de origen natural a dos concentraciones. Con estos valores, se calculó el factor de reversión (FR; parámetro de potencia) dividiendo la CI_{50} de la vinblastina entre la CI_{50} de la vinblastina en presencia de los compuestos de prueba. También fue calculado el FR de la reserpina.

5.9 Ensayo preliminar de acumulación intracelular de tehuacanina (1) .

Las líneas celulares MCF-7 y MCF-7/Vin+/- (Cuadro 8) fueron sembradas en placas de 6 pozos (1.5×10^5 células por pozo) e incubadas por 72 h a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO_2 y 100% de humedad.

A partir de una solución de 4 mg/mL del compuesto 1, se realizaron las diluciones indicadas en las Cuadro 8. Una vez concluidas las 72 h de incubación,

se cambió el medio RMPI y se adicionaron las cantidades indicadas en el Cuadro 9 para tener el compuesto **1** a diferentes concentraciones (6.25-100 μM), todas las muestras se incubaron bajo las mismas condiciones por 30 min.

Cuadro 8. Diluciones iniciales para el compuesto 1.	
2000 μM	178 μL de 4 mg/mL + 822 μL de agua estéril
1000 μM	500 μL de 2000 μM + 500 μL DMSO 10%
500 μM	500 μL de 1000 μM + 500 μL DMSO 10%
250 μM	500 μL de 500 μM + 500 μL DMSO 10%
125 μM	500 μL de 250 μM + 500 μL DMSO 10%

Cuadro 9. Diluciones para el compuesto 1 en el ensayo de acumulación.	
100 μM	150 μL de 2000 μM + 2790 μL de medio + 60 μL mitoxantrona 10 μM
50 μM	150 μL de 1000 μM + 2790 μL de medio + 60 μL mitoxantrona 10 μM
25 μM	150 μL de 500 μM + 2790 μL de medio + 60 μL mitoxantrona 10 μM
12.5 μM	150 μL de 250 μM + 2790 μL de medio + 60 μL mitoxantrona 10 μM
6.25 μM	150 μL de 125 μM + 2790 μL de medio + 60 μL mitoxantrona 10 μM

En un pozo, se colocaron 98 μL de feoforbida 4 μM y 60 μL mitoxantrona 10 μM como control positivo, en otro pozo se utilizaron 150 μL de DMSO al 10% y 2850 μL de medio RMPI como blanco (Figura 14).

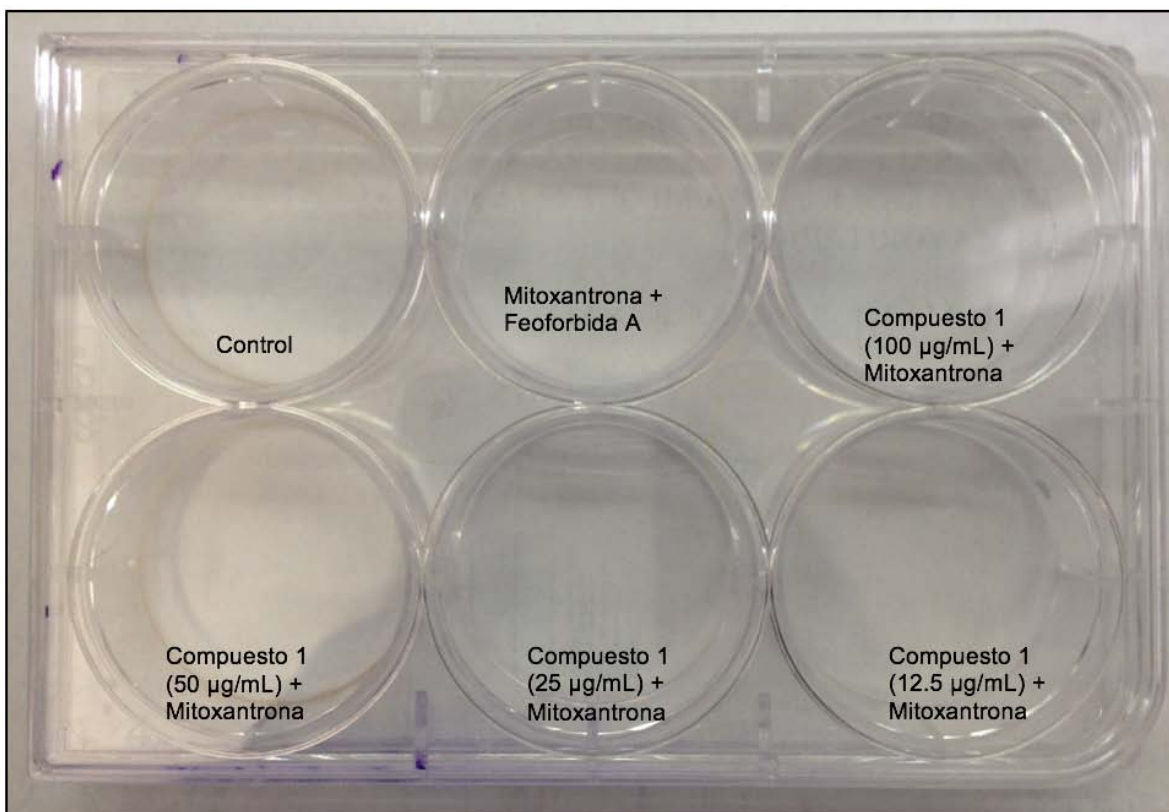


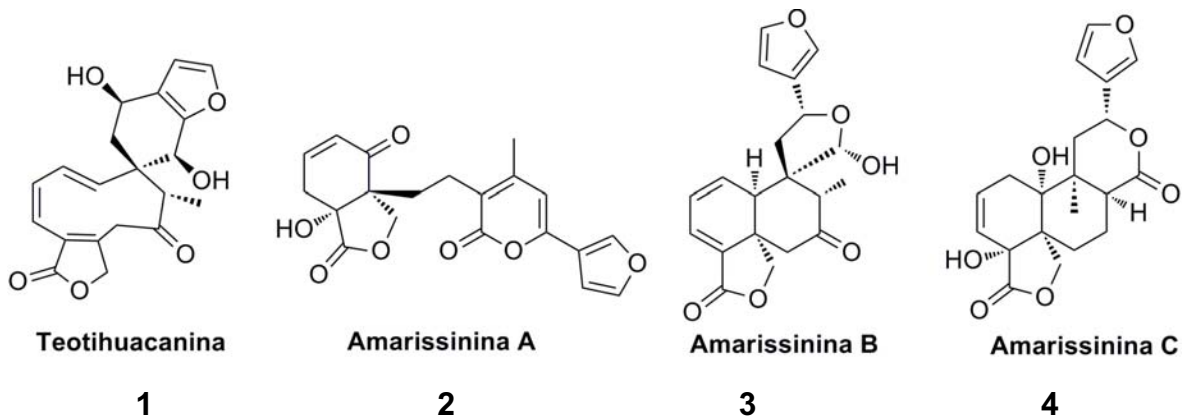
Figura 14. Ensayo de acumulación intracelular de mitoxantrona para el compuesto **1** (100-12.5 µM).

Al término del tiempo de incubación, se detuvo la acumulación del compuesto **1**. Se lavaron las células 2 veces con 500 µL de PBS, se despegaron con tripsina, se adicionó 1 mL de medio RPMI 1640 a cada pozo para resuspenderse. Finalmente se transfirieron a tubos estériles con 300 µL de medio RPMI, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. Se agregó 0.5 mL de *p*-formaldehído al 4% en PBS para refrigerar hasta que se registró la fluorescencia intracelular asociada a la mitoxantrona con en un citómetro de flujo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudio químico de *Salvia amarissima*

S. amarissima ha sido sujeta a diversos estudios sobre su composición química. Esta investigación se enfocó en la evaluación biológica de cuatro nuevos compuestos aislados del extracto de acetona obtenido a partir de las hojas, también se evaluó el extracto de acetona y la fracción de acetato de etilo, a partir de los cuales se obtuvieron estos compuestos. El compuesto **1**, reportado recientemente en la literatura es representado por un esqueleto carbonado novedoso y no convencional al que se llama amarisano.⁶³ El compuesto **2** es un 9-10-*seco*-clerodane y los compuestos **3** y **4** son clerodanos. Estos compuestos fueron nombrados con el nombre convencional de amarisininas A a C. También fue evaluado el compuesto STJ-7 del cual aún no se conoce su estructura.



6.2 Citotoxicidad

La valoración *in vitro* de citotoxicidad se introdujo en 1950 con el objetivo de predecir la actividad *in vivo* de un agente antineoplásico. El ensayo clonogénico fue el primer método empleado para tal fin; con el paso del tiempo, éste ha sido complementado con metodologías alternativas basadas en la medición de la viabilidad celular (tinción selectiva, tinción de proteínas) y del metabolismo celular (inclusión de timidina, bioluminiscencia ATP, reducción de MTT). Estos modelos

presentan baja correlación con la respuesta *in vivo* frente a un tratamiento quimioterapéutico, pero han demostrado ser de gran utilidad como métodos de “screening” o tamizaje de nuevos agentes antineoplásicos.³⁶

El método de tinción con sulforodamina B (SBR) ha sido ampliamente utilizado para la determinación del contenido proteico total, que es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, con dos grupos sulfónicos SO_3^- , que en condiciones mediamente ácidas aumentan su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, fijandose electrostática y selectivamente a éstos.⁶⁵

Para determinar la citotoxicidad, se emplearon cinco líneas celulares utilizando el agente antineoplásico vinblastina (Vin) como control positivo. Todas las líneas celulares mostraron ser sensibles al compuesto antitumoral con valores de CI_{50} dentro del intervalo de 0.002-0.06 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica la adecuada sensibilidad de las líneas celulares a productos xenobióticos. La línea más sensible en este trabajo fue HeLa con una CI_{50} de 0.002 $\mu\text{g/mL}$, dato que no difiere por otros autores con CI_{50} dentro del orden de 0.001 $\mu\text{g/mL}$.⁶⁵ Se utilizó DMSO para preparar todas las soluciones de los compuestos evaluados, se garantizó que la concentración en el ensayo no fuera mayor a 0.010 % en ninguna de las concentraciones evaluadas, para descartar interferencias en la actividad citotóxica observada para los compuestos ensayados.

Al analizar los resultados del Cuadro 10 e ilustrados en la Figura 15, se observa que no exhiben actividad citotóxica, tomando en cuenta que para la evaluación del potencial citotóxico de extractos vegetales y fracciones, se consideran con actividad significativa aquellos con valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) $\leq 25 \mu\text{g/mL}$ y para compuestos puros $\text{CI}_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$.^{25,66}

Cuadro 10. Ensayo de citotoxicidad de los compuestos y extractos obtenidos de *Salvia amarissima*.

Compuesto	CI ₅₀ (µg/ mL)				
	MCF-7	HCT15	MDA	HCT116	HeLa
Vin	0.0032	0.06	0.009	0.05	0.002
Exto acetona	>25	>25	>25	>25	>25
Fracción AcOEt	>25	>25	>25	>25	>25
1	>25	>25	>25	>25	>25
2	>25	>25	>25	>25	>25
3	>25	>25	>25	>25	>25
4	>25	>25	>25	>25	>25
STJ7	>25	>25	>25	>25	>25

MCF-7 y MDA, carcinoma mamario, HCT15 y HCT116, carcinoma de colon, HeLa, carcinoma de cérvix. Cada valor representa la media ± D.E de tres experimentos independientes.

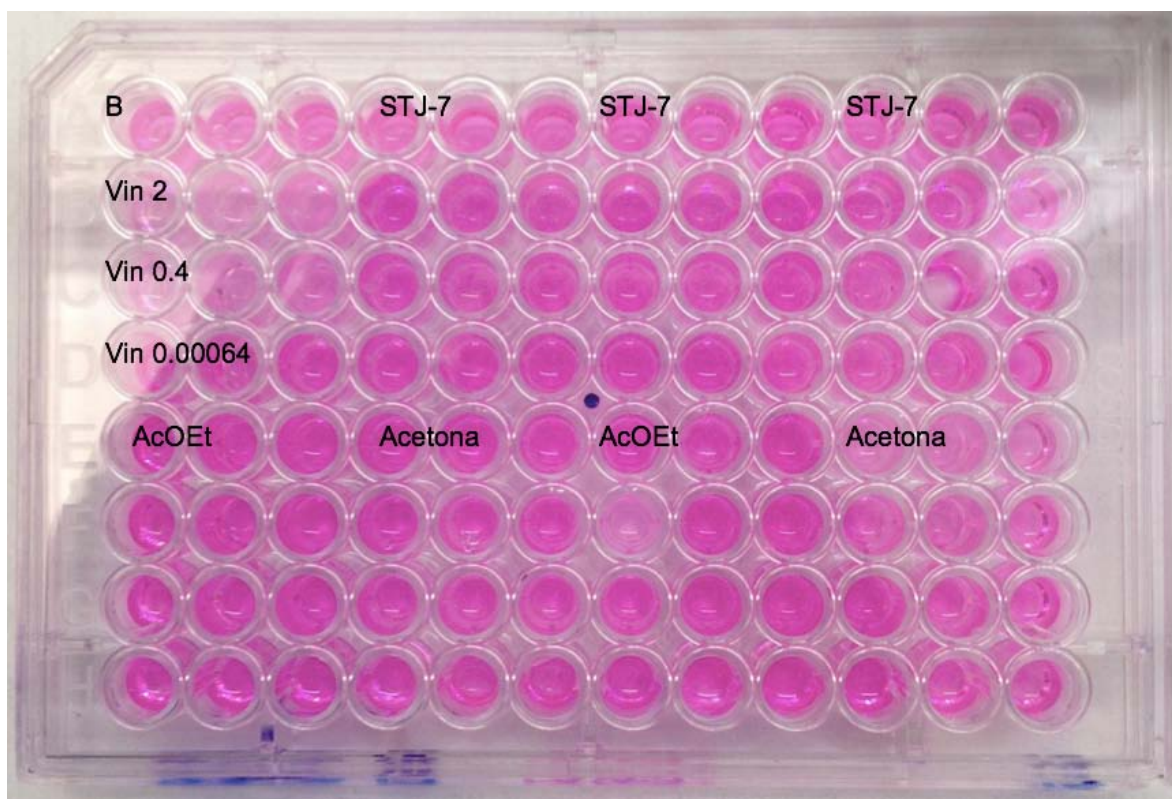


Figura 15. Bioensayo de citotoxicidad para el compuestos STJ-7, fracción de acetato de etilo y extracto total acetona contra MCF7.

6.3 Bioensayos preliminares de modulación de la glicoproteína P

Uno de los mayores impedimentos para el tratamiento exitoso del cáncer es el desarrollo de células resistentes, esfuerzos significativos de investigación para desarrollar terapias que puedan obstruir o inactivar a estos transportadores ha aumentado. La sobreexpresión de ABCB1/glicoproteína-P (gp-P) es una de las causas más comunes de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en células cancerígenas. Recientemente diversos productos naturales derivados de plantas han demostrado un potencial inhibidor de la función de la gp-P sin desarrollar un efecto citotóxico, lo que implica la necesidad de seleccionar productos seguros para el desarrollo de nuevos y potentes inhibidores de las bombas de eflujo.

El proceso de quimiosensibilizar o revertir la MDR implica la coadministración de un modulador de MDR con un medicamento contra el cáncer con el fin de causar un incremento en la acumulación intracelular del agente anticancerígeno y, de esta forma, alterando la función de la gp-P.⁶⁷

La ausencia de citotoxicidad es un requisito importante e indispensable para realizar los ensayos de modulación y distinguir claramente cualquier efecto de potenciación (por inhibición de las bombas de eflujo) de un posible sinergismo entre un compuesto activo y la vinblastina.^{68,69} De esta forma, se evaluó la actividad moduladora de todos los compuestos puros, extracto y fracción obtenidos a partir de *Salvia amarissima* empleando diferentes líneas, MCF-7 S, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin⁺ (ver Cuadro 7, sección 5.8, parte experimental), la reserpina se utilizó como control positivo.

Las células MCF-7 S, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin⁺ fueron expuestas a diferentes concentraciones de Vin desde 0.000128-2 µg/mL, un fármaco anticancerígeno utilizado en el tratamiento de numerosas enfermedades malignas, incluyendo el cáncer de mama, el carcinoma de vejiga, la enfermedad de Hodgkin, el melanoma y el cáncer testicular. La línea resistente MCF-7/Vin⁻, que crece en ausencia de vinblastina, presentó la mejor tasa de proliferación.

Para los compuestos y los extractos de acetona y fracción de acetato de etilo en el ensayo de modulación, el comportamiento se resume en la Cuadro 11.

En estos ensayos, se observó un incremento en la susceptibilidad de las células a la vinblastina desde 0.44 a 61.53 veces para la línea MCF7/ VIN⁻, mientras que para el compuesto 1, el factor de reversión (RF) para la línea MCF7/VIN⁺ fue de 14441.7 veces a 25 µg/mL y de 97.08 veces a 5 µg/mL lo que indica que es más potente que el control positivo (reserpina FR MCF7/VIN⁺ fue 82.35 a 5 µg/mL).

El factor de reversión para las líneas MCF-7 sens, MCF-7/V⁻ y MCF-7/V⁺ con reserpina (control positivo) fue de 16.17, 106.76 y 82.35, respectivamente, observando que todos los compuestos son menos potentes que el control positivo, excepto el compuesto 1, que resultó ser un potente agente de reversión de la resistencia.⁶²

La importancia de los transportadores MDR ha provocado una intensa búsqueda de inhibidores eficaces en especial de estas proteínas transportadoras Gp-p y ABCG2, en este trabajo se planteó como estrategia inicial, establecer los ensayos que se enfocaron en inhibir la función de la Gp-P y ABCG2, en los cuales se trato de observar el incremento de la acumulación intracelular del compuesto.^{70,71} En los ensayos de eflujo con el compuesto 1 a diferentes concentraciones y como control positivo mitoxantrona y a feoforbida A que actúa como sustrato de ABCG2,⁷² se observó fluorescencia con la metodología empleada, además de un efecto diferente en el comportamiento de la fluorescencia con los fenotipos MCF-7 sens, MCF-7/ Vin, las lecturas que se obtuvieron fueron significativas. Sin embargo, se necesitan hacer más repeticiones y emplear concentraciones más bajas, debido a que a menores concentraciones se observó un efecto comparable con respecto al control positivo.

Cuadro 11. Ensayos de modulación de la actividad de la vinblastina con los compuestos sobre las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin.

Compuesto ^a	Línea celular CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^c			Factor de reversión (FR) ^d		
	MCF-7 sens	MCF-7 / Vin ⁻	MCF-7 / Vin ⁺	MCF-7 sens	MCF-7 / Vin ⁻	MCF-7 / Vin ⁺
Vinblastina	0.00207 ± 0.0011	0.8861 ± 0.6656	1.8447 ± 0.2411			
Exto acetona- C1	<0.000128	0.0296 ± 0.001	0.2205 ± 0.0429	16.17	29.94	8.36
Exto acetona- C2	<0.000128	0.3141 ± 0.001	0.6553 ± 0.1732	16.17	2.82	2.81
Fr AcOet-C1	0.000252 ± 0.00008	0.0147 ± 0.0189	0.2864 ± 0.1806	8.21	60.28	6.44
Fr AcOet-C2	0.001334 ± 0.00016	0.2424 ± 0.1036	1.1118 ± 0.3542	1.55	3.65	1.65
1-C1	<0.000128	<0.000128	<0.000128	16.17	6922.6	14441.7
1-C2	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.08	0.19 ± 0.05	0.1035	5.9	97.08
2-C1	<0.000128	0.3461 ± 0.001	0.2729 ± 0.17	16.17	2.56	6.76
2-C2	0.00046 ± 0.00024	0.44 ± 0.17	1.4559 ± 0.48	4.5	2.01	1.26
3-C1	<0.000128	0.0144 ± 0.001	0.5911 ± 0.25	16.17	61.53	3.12
3-C2	<0.000128	0.012 ± 0.046	1.63 ± 0.277	16.17	73.84	1.13
4-C1	<0.000128	0.4503 ± 0.2405	1.44 ± 0.30	16.17	1.97	1.28
4-C2	<0.0045 ± 0.003	>2	1.47 ± 0.23	0.46	0.44	1.25
STJ-7-C1	<0.000128	0.0881 ± 0.057	0.7521 ± 0.203	16.17	10.06	2.45
STJ-7-C2	<0.000128	0.44 ± 0.18	1.2851 ± 0.32	16.17	2.01	1.43
Reserpina ^b	<0.000128	0.0083 ± 0.0136	0.0224 ± 0.0205	16.17	106.76	82.35

^aDiluciones seriadas desde 0.000128 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Vinblastina en presencia o ausencia de los compuestos (C1= 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o C2= 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),

^bReserpina = 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como control positivo. ^cCada valor representa la media ± D.E de tres experimentos independientes. ^dFR= CI_{50} Vinblastina / CI_{50} Vinblastina en presencia del compuesto natural.

7. CONCLUSIONES

1. Se realizó la evaluación de la actividad citotóxica y moduladora de cinco compuestos provenientes de *Salvia amarissima*, no se observó actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales evaluadas, por otro lado, los resultados de modulación para el compuesto **1**, permiten proponerlo como un nuevo agente modulador no tóxico de las bombas de extrusión como la gp-P.

2. La resistencia a múltiples fármacos representa una limitación importante para la quimioterapia del cáncer. Hay varios mecanismos de MDR, pero el más importante está asociado con la sobreexpresión de la glicoproteína P (gp-P). El desarrollo de moduladores de la Gp-P que sean capaces de restablecer la sensibilidad a los fármacos de las células resistentes, se ha considerado como un enfoque prometedor para la superación de la MDR. Por lo tanto, el compuesto **1** representa un candidato prometedor como un quimiosensibilizador que permite la reversión del fenotipo de la MDR.

3. Estos resultados apoyan la propuesta de que las terapias combinatorias empleando mezclas de agentes anticancerígenos (“cocteles antitumorales”) con un inhibidor de las bombas de extrusión promete posibilidades positivas para el tratamiento de las neoplasias malignas y enfermedades refractarias. Por lo tanto, el interés por las posibilidades terapéuticas que ofrecen los fármacos de origen vegetal ha ido en aumento ya que en muchos casos se trata de principios que no desarrollan citotoxicidad pero que son sustratos para las bombas de extrusión. El valor de estos productos dentro del marco de la terapia médica moderna tiene cada día mayor relevancia, y se puede afirmar que en el ámbito mundial han alcanzado un interés mayor al observado en cualquier momento anterior de la historia de los medicamentos.

8. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo, los experimentos futuros se orientarán en las siguientes direcciones.

- Se realizarán ensayos de eflujo y persistencia de la rodamina 123 con el compuesto **1**, en las células MCF-7 sens y MCF-7/Vin para determinar si puede inhibir la función de la gp-P, responsable de la resistencia a múltiples drogas (MDR), utilizando rodamina 123 (Rh123) y reserpina, como un control positivo, por medio de citometría de flujo.
- Para el bioensayo de eflujo con el medio transportador ABCG2 se ajustarán las concentraciones a partir de 50 μM , 6.25 μM , 1 μM , 0.1 μM , 0.05 μM y 0.025 μM con la finalidad de compararlo con el control positivo, debido a que se evaluaron concentraciones de 100 a 1 μM , observando un efecto modulador a estas concentraciones.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Leonti, M. (2011) The future is written: impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology, *J Ethnopharmacol* 134, 542-55.
- 2) Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* 75, 311-335.
- 3) Jinwoong K.; Eun J.P. (2002) Cytotoxic Anticancer Candidates from Natural Resources Current Medicinal Chemistry. *Anti-Cancer Agents.* 2 (4), 485-537.
- 4) Goldstein, L.J.; Galski, H.; Fojo, A.; Willingham, M.; Lai, S.L.; Gazdar, A.; Pirker, R.; Green, A.; Crist, W.; Broudeur, G.M. (1989) Expression of a multidrug resistance gene in human cancers, *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 116-124.
- 5) Klug, W.S. (2000) Conceptos de genética, 5ª edición, 626-629.
- 6) Abul, K.; Abbas, A.; Lichtman, H. (2000) *Inmunología celular y molecular*, Mc Graw Hill- Interamericana. 4ª edición, México. 398-401.
- 7) Williams, G. (2001) Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 166, 113-125.
- 8) Weisburger, H.J. (2001) Antimutagenesis and anticarcinogenesis from the past to the future. *Mutation Research* 23, 480-481.
- 9) Guenferich, F.P. (2001) Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research* 488, 195-209.

- 10) Bruce, A.; Roberts, G. (2005) Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews of Cancer* 5, 65-72.
- 11) Organización Mundial de la Salud. Cáncer. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> Consultado el 14 de enero del 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 12) <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/dia-mundial-cancer>, consultado: lunes 18 de enero del 2016.
- 13) Gabriel, J. (2007) *The Biology of Cancer*. Jhon Wiley & Sons, Ltd: England, 2nd Edition, pp. 3-15.
- 14) <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> consultado: lunes 8 de febrero del 2016
- 15) National Cancer Institute, Chemotherapy and You; USA, www.cancer.gov. Consultado: 10 de febrero del 2016
- 16) <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf> consultado: lunes 15 de febrero del 2016
- 17) Katzung, B.G. (2006) *Basic and Clinical Pharmacology*. Mc. Graw Hill- Lange, San Francisco 10th Edition.
- 18) Ng, J.S. (2011) Vinflunine: review of a new vinca alkaloid and its potential role in oncology. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 17, 209-224.
- 19) Singla, A.K.; Garg, A.; Aggarwal, D. (2002) Paclitaxel and its formulations. *Int. J. Pharm.* 235, 179-192.

- 20) Afroz, A.M.; Naik, P.K. (2009) Molecular modelling evaluation of the cytotoxic activity of podophyllotoxin analogues. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 23, 209-225.
- 21) Pai, V.B.; Nahata, M.C. (2000) Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf.* 22, 263-302.
- 22) Adams, G. P.; Weiner, L. M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 23, 1147-1157.
- 23) Gottesman, M.M. (1993) How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 53, 747–754.
- 24) Harman, G.J.; Limbirt E. L. & Gilman G. A. (2003) *Las bases farmacológicas de la terapeutica*, Mc Graw Hill. 1397-1404.
- 25) Cordell, G.A.; Beecher, C.W.; Pezzuto, J.M. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs?. *J. Ethopharmacol.* 32, 117-133
- 26) Cragg, M.G.; Boyd, M.R.; Cardellina, J.H.; Newman, D.J.; Snader, K.M.; McCloud. T. G. (1994) Ethobotany and the search for New Drugs, Ciba Foundation Symposium 185, John Wiley & Sons, Chischester, England. 178-190.
- 27) Longley, D.; Johnston, P. (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205: 275-292.
- 28) Gottesman, M.M. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53, 615-627.

- 29) Thomas, H.; Coley, H.M. (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*. 10, 159-165.
- 30) Dean M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. (2001) The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 11, 1156-1166.
- 31) Polgar, O.; Bates, S.E. (2005) ABC transporters in the balance: is there a role in multidrug resistance?. *Biochem. Soc. Trans*. 33: 241-255.
- 32) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray- Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. (1991) Feasibility of a high-flux anticancerdrug screen using a diverse panel of cultured human tumor cells lines. *J. Nat. Cancer Inst*. 83 (11), 757-766.
- 33) Gottesman, M.M.; Fojo, T.; Bates, S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP- dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*. 2, 48-58.
- 34) Lieberman, M.; Patterson, G.; Moore, R. (2001) In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Lett*. 173, 21-29.
- 35) Borst, P.; Elferink, R.O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Ann. Rev. Biochem*. 71, 537-592.
- 36) Bellamy, W. (1992) Prediction of response to drug therapy of cáncer, a review of *in vitro* assays. *Drugs* 44 (5), 690-708.
- 37) Szakács, G.; Gottesman, M.M. (2004) Comparing Solid Tumors with Cell Lines: Implications for Identifying Drug Resistance Genes in Cancer. *Mol. Interv*. 4, 323-325.

38) Casale, F.D; Angelo, V.; Addeo, R. (2004) P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* 12, 1202-1207.

39) Hrycyna, C.A. (2001) Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance. *Cell Develop. Biol.* 12, 247-256.

40) Borst, P.; Elferink, O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537–592.

41) Matheny, C.J.; Lamb, M.W.; Brouwer, K.R.; Pollack, G.M. (2001) Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 21, 778-796.

42) Chen, G.K.; Lacayo, N.J.; Durán, G.E.; Cohen, D.; Sikic, B.I. (2000) Loss of cyclosporin and azidopine binding are associated with altered ATPase activity by mutant P-glycoprotein with deleted Phe355. *Mol. Pharmacol.* 57, 769-777.

43) Uchiyama-Kokub, N.; Watanabe, T.; Cohen, D. (2001) Intracellular levels of two cyclosporin derivatives valspodar (PSC833) and cyclosporin A associated with multidrug resistance- modulating activity in sublines of human colorectal adenocarcinoma HCT-15. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 1126-1136.

44) Fojo, T.; Bates, S.E. (2003) Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* 22, 7512-7523.

45) Modok, S.; Mellor H.R.; Callaghan, R. (2006) Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 350-354.

- 46) Doyle, L.A.; Ross, D.D. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein bcrp (abcg2). *Oncogene* 22 (47), 7340-7358.
- 47) Maliepaard, M.; Scheffer, G.L.; Faneyte, I.; Pijnenborg, A.C.; Schinkel, A.H.; Van de Vijver; M.J.; Scheper, R.J.; Schellens, H.M. (2002) Subcellular Localization and distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Res.* 61, 3458-3464.
- 48) Imai, Y.; Nakane, M.; Kage, K.; Tsukahara, S.; Ishijawa, E.; Tsuruo, T.; Miki, Y.; Sugimoto, K. (2002) C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* 1, 611-616.
- 49) Vlaming, M.L.; Lagas, J.S.; Schinkel, A.H. (2009) Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 14-25.
- 50) Leonard, G.D.; Fojo, T.; Bates, S.E. (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 8, 411-424.
- 51) Krishnamurthy, P.; Ross, D. D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K. E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B. P.; and Schuetz, J. D. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* 279, 24218–25
- 52) Robey, R.W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S.E. (2004) Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition., *Cancer Res.* 64, 1242–1246.

- 53) Allen, J.D.; Schinkel, A.H. (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol. Cancer Ther.* 1, 427-434.
- 54) Domínguez-Vázquez, G.; Berlin, B.; Castro-Ramírez, A.; Estrada-Lugo, E.; (2002) Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiateae en Chiapas. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73, 39-80.
- 55) Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S.; Jáquez, P.; López, M. E. (1994) *Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social; Instituto Mexicano del Seguro Social, México*, 107-110.
- 56) Rodríguez Hann, L.; Cárdenas, J.; Comparative chemotaxonomy in Labiatae; *Current topics in Phytochemistry* 1999, 2, 91-102.-
- 57) Dewick, P.M.; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, Chapter 4, 2009, John Wiley & Sons.
- 58) Yinrong, L.; Yeap, F. L.; Polyphenolics in *Salvia*-a review; *Phytochemistry*, 2002, 59, 117-140
- 59) Kamatou, G.P.P.; Makunga, N. P.; Ramogola, W. P. N.; Viljoen, A. M.; South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry; *J. Ethnopharmacol.* 2008 , 199, 664-672.
- 60) Flora medicinal Indígena de México, *Instituto Nacional Indigenista* (1994) 1 (3), 1228-1292.
- 61) Flora medicinal Indígena de México, *Instituto Nacional Indigenista* (1994) 1 (2), 672, 696, 738, 762, 928.

- 62) Maldonado, E.; Cárdenas, J.; Bojórquez, H.I.; Escamilla-Silva, E.M.; Ortega, A. (1996) Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry* 42 (4), 1105-1108.
- 63) Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Toscano, R.A.A.; García-Peña, M.R.; Ortega, A. (2015) Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in Cancer Cells. *Org. Lett.* 17, 3280–3282.
- 64) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer- drug screening. *J. Natl. Cancer Inst*, 82, 1107-1112.
- 65) Suárez Ortiz, G. (2013) Caracterización estructural y análisis conformacional de 6-heptenil-5,6-dihidro-2h-piran-2-onas de origen vegetal. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- 66) Geran, R.I.; Greenberg, N.H.; MacDonald, M.M.; Schumacher, A.M.; Abbott, B.J. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumours and other biological systems. *Cancer Chemother Rep.* 3, 100-103.
- 67) Muñoz-Martínez, F.; Lu, P.; Cortés-Selva, R.; Pérez-Victoria, J.M.M.; Jiménez, I.A.; Ravelo, A.G.; Sharom, F.J.; Gamarro, F.; Castanys, S. (2004) Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulation that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse cellular multidrug resistance. *Cancer Res.* 64, 7130-7138.
- 68) Pereda-Miranda, R.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. (2006) Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*., *J. Nat. Prod.* 69, 406-409.

69) Corona-Castañeda, B.; Pereda-Miranda R. (2011) Morning Glory Resin Glycosides as Modulators of Antibiotic Activity in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Planta Med.* 78, 128-131.

70) Limtrakul, P.; Khantamat, O.; Pintha, K. (2004) Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54, 525-530.

71) Yoshida, N.; Koizumi, M.; Adachi, I.; Kawakami, J. (2006) Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by terpenoids contained in herbal medicines and natural products. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2033-2039.

72) Robey, R.W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S.E. (2004) Pheophorbide A is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* 64, 1242-1246.