



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFEECTO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LAS CONVULVÁCEAS SOBRE LA
MODULACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA P EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS RESISTENTES A
FÁRMACOS ANTITUMORALES**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ



TUTOR: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA AÑO: 2013



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. Adela Rodríguez Romero
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

TUTOR:

Dr. Rogelio Pereda Miranda

SUSTENTANTE:

M. en C. Gabriela Figueroa González

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo de Septiembre del 2008 a Agosto del 2012 con número de becario 204882, además del apoyo económico brindado a través del proyecto 101380-Q.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN217310) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- A la Dra. Nadia Jacobo Herrera del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por todo su apoyo, confianza, amistad, sugerencias y siempre buena disposición en la realización de esta investigación.
- Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo en la realización de los ensayos biológicos.
- A los miembros del jurado por sus comentarios y observaciones que permitieron la corrección de este manuscrito.
- Al Dr. Leovigildo Quijano y la Dra. María Luisa Villarreal, miembros de mi comité tutelar, por su continuo apoyo y observaciones durante la realización de esta investigación.
- Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su apoyo, tiempo, dedicación y paciencia en la dirección de esta tesis.
- A la Dra. Mabel Clara Frago Serrano por su apoyo y cooperación en la realización de esta investigación.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por ser mi segundo hogar y por mi formación profesional.
- A mis amigos que con su presencia, cariño y apoyo incondicional hacen enriquecedor cada día además de hacerme sonreír incluso en los momentos más difíciles y porque sin duda forman parte de este proyecto y de mi vida.



A mis padres, hermano y abuelitos por su amor, apoyo y presencia...

ABSTRACT

Resin glycosides from the morning glory family (Convolvulaceae) are amphipathic glycolipids which had been previously demonstrated to be substrates for efflux pumps related to the multidrug resistant (MDR) phenotype in prokaryotic and eukaryotic cells.

The present work describes the development of new MDR breast carcinoma cells (MCF-7/Vin) selected by growing the parental cells (MCF-7) in increasing concentrations of vinblastine which were used as the resistant target in modulation assays. The evaluation of thirty five resin glycosides as modulators of the multidrug resistance (MDR) in these carcinoma cells (MCF-7/Vin), as well as the effects of these amphipathic compounds on the cytotoxicity and P-glycoprotein (Gp-P)-mediated MDR, was estimated with the sulforhodamine B colorimetric assay. Active noncytotoxic compounds exerted a potentiation effect of vinblastine susceptibility by 1- to over 2140-fold at tested concentrations of 5 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Murucoidin V (**1**) and purgin II (**34**) enhanced vinblastine activity 255-fold and >2140.6-fold respectively when incorporated at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and also, based on flow cytometry, significantly increased the intracellular accumulation of rhodamine 123 with the use of reserpine as a positive control for a MDR reversal agent. Incubation of MCF-7/Vin cells with compounds **1** and **34** caused an increase in uptake and notably lowered the efflux rate of rhodamine 123. Decreased expression of P-glycoprotein by compound **1** was detected by immunofluorescence flow cytometry after incubation with an anti-P-gp monoclonal antibody. These results suggest that resin glycosides represent potential efflux pump inhibitors for overcoming MDR in cancer therapy.

RESUMEN

Las resinas glicosídicas de la familia de las Convolvulaceas son glicolípidos anfipáticos que han demostrado previamente ser sustratos para las bombas de eflujo relacionadas con el fenotipo de la resistencia múltiple a fármacos (MDR) en células procariotas y eucariotas.

El presente trabajo describe el desarrollo de células resistentes (MCF-7/Vin) derivadas de cáncer de mama, seleccionadas a partir de las parentales (MCF-7) después de su exposición continua y en concentraciones crecientes de vinblastina.

La evaluación de treinta y cinco resinas glicosídicas como moduladores de la MDR en estas células resistentes (MCF-7/Vin), los efectos de estos compuestos anfipáticos en la citotoxicidad y la modulación de la MDR mediada por la glicoproteína P (Gp-P), se estimaron con el ensayo colorimétrico de la sulforodamina B. Los compuestos activos no citotóxicos mostraron un efecto de potenciación en la susceptibilidad de la vinblastina desde 1 a más de 2140 veces a las concentraciones de prueba de 5 y 25 $\mu\text{g/mL}$. La murucoidina V (**1**) y la purgina II (**34**) incrementaron la actividad de la vinblastina con factores de reversión de 255 y >2140.6 respectivamente cuando se incorporaron a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. Por medio de citometría de flujo, se observó un incremento significativo de la acumulación intracelular de rodamina 123 con el uso de la reserpina como un control positivo de agente de reversión de la MDR. La incubación de las células MCF-7/Vin con los compuestos **1** y **34** mostraron un incremento en la captación y una notable disminución del eflujo de la rodamina 123 al exterior de la célula. La disminución de la expresión de la glicoproteína P por el compuesto **1** se detectó mediante ensayos de

inmunofluorescencia-citometría de flujo después de la incubación con un anticuerpo monoclonal. Estos resultados sugieren que las resinas glicosídicas representan inhibidores potenciales de las bombas de eflujo para vencer la MDR observada en la terapia contra el cáncer.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer	3
2.1.1 Naturaleza del cáncer.....	3
2.1.2 Cáncer en México y a nivel mundial.....	4
2.1.3 Diagnóstico y tratamiento del cáncer	6
2.1.4 Quimioterapia antineoplásica y productos naturales.....	7
2.1.5 Mecanismos de resistencia al cáncer	11
2.1.6 Glicoproteína P.....	14
3 JUSTIFICACIÓN.....	24
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 General	25
4.2 Específicos	25
5 DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
5.1 Citometría de flujo	26
5.2 Reactivos	26
5.3 Compuestos de prueba.....	26
5.3.1 Condiciones instrumentales en CLAE	27
5.4 Líneas y cultivos celulares.....	27
5.5 Citotoxicidad	28

5.6	Ensayos de modulación	29
5.7	Captación y acumulación intracelular de rodamina 123	29
5.8	Ensayos de eflujo y persistencia de la rodamina 123	30
5.9	Expresión de la glicoproteína P	31
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1	Curvas de proliferación celular.....	32
6.2	Selección de la línea celular resistente	33
6.3	Citotoxicidad de los glicolípidos de prueba	35
6.4	Ensayos preliminares de modulación de la glicoproteína P.....	38
6.5	Evaluación de la Murucoidina V y Purgina II sobre la actividad de la glicoproteína P	41
6.5.1	Captación intracelular de rodamina 123	41
6.5.2	Acumulación intracelular de rodamina 123.....	44
6.5.3	Ensayos de eflujo y persistencia de la rodamina 123	45
6.6	Expresión de la glicoproteína P	50
7	CONCLUSIONES	54
8	REFERENCIAS	55
9	APÉNDICES	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Citotoxicidad de vinblastina y resistencia cruzada en las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin resistentes.....	34
Cuadro 2. Citotoxicidad de los glicolípidos 1-35.	37
Cuadro 3. Ensayo preliminar de modulación sobre la línea MCF-7/Vin.....	39
Cuadro 4. Ensayos de modulación de la actividad de la vinblastina con glicolípidos selectos sobre las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fármacos anticancerígenos aprobados desde 1940 hasta 2010.	8
Figura 2. Principales sitios de acción de los fármacos citotóxicos.	10
Figura 3. Mecanismos de resistencia de las células cancerosas.	12
Figura 4. Ejemplo de fármacos anticancerígenos de origen natural con estructuras y mecanismos de acción diversos.....	13
Figura 5. Modelo del transportador multifármaco Gp-P donde se visualizan los segmentos transmembranales y los sitios de unión a ATP.....	14
Figura 6. Ciclo de transporte para sustratos de la glicoproteína P.	15
Figura 7. Distribución y expresión de la glicoproteína P en el cuerpo.	16
Figura 8. Ejemplos de productos farmacéuticos y de productos naturales moduladores de la Gp-P.....	19
Figura 9. Ilustración del Manuscrito de la Cruz-Badiano para la raíz de jalapa (<i>Ipomoea purga</i>).....	20
Figura 10. Ejemplo de estructuras de dos alcaloides de tipo ergolina (a) y de un glicolípidos (b) aislados del género <i>Ipomoea</i>	21
Figura 11. Características estructurales generales de una resina glicosídica.....	22

Figura 12. Similitud en diseño entre las bombas de eflujo de procariotas y eucariotas.	23
Figura 13. Curvas de proliferación de las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin multifármaco-resistentes.	33
Figura 14. Monitoreo de la morfología de las líneas celulares por microscopía óptica.	35
Figura 15. Efecto de la muruoidina V en la captación intracelular de Rh123 en la línea parental MCF-7 y en las dos resistentes MCF-7/Vin.	42
Figura 16. Efecto de la purgina II en la captación intracelular de Rh123 en la línea parental MCF-7 y en las células resistentes MCF-7/Vin ⁻	43
Figura 17. Efectos de la muruoidina V (1) en la acumulación de rodamina 123 en las células MCF-7 sensibles y en las MCF-7/Vin resistentes.	44
Figure 18. Efectos de la purgina II (34) en la acumulación de rodamina 123 en las células MCF-7 sensibles y en las MCF-7/Vin resistentes.	45
Figura 19. Efecto de la muruoidina V (1) en el ensayo de eflujo de Rh123 en las células MCF-7 sensibles y las MCF-7/Vin resistentes.	47
Figura 20. Efecto de la muruoidina V (1) en la persistencia de la actividad en células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin resistentes.	49
Figure 21. Efecto de la purgina II (34) en el ensayo de eflujo de Rh123 en las células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin resistentes.	48
Figura 22. Efecto de la Purgina II (34) en la persistencia de la actividad en células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin resistentes.	49
Figura 23. Expresión de la glicoproteína P mediada por la muruoidina V (1) en las células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin ⁺ resistentes.	51
Figura 24. Expresión de la glicoproteína P mediada por la purgina II (34) en las células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin ⁺ resistentes.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

mba	(2 <i>S</i>)-2-metilbutanoil
ca	(<i>E</i>)-ácido cinámico
tga	2(<i>E</i>)-metil-2-butenoil
nla	3-hidroxi-2-metilbutanoil
BHE	Barrera hematoencefálica
dodeca	Dodecanoil
Gp-P	Glicoproteína P
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
MIF	Intensidad media de fluorescencia
iba	Isobutanoil
MDR	Multi drug resistance
octa	Octanoil
OMS	Organización Mundial de la Salud
PVH	Papilomavirus humanos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Res	Reserpina
Rh123	Rodamina 123
SNC	Sistema nervioso central
SAR	Structure activity relationship
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
Vin	Vinblastina
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C

1 INTRODUCCIÓN

La resistencia múltiple o cruzada a fármacos (MDR por sus siglas en inglés, **Multidrug Resistance**) es uno de los mayores problemas asociados a la quimioterapia contra el cáncer. Múltiples mecanismos de resistencia complican el tratamiento e incrementan la morbilidad y la mortalidad, así como los costos financieros de los sistemas de salud.¹ La quimiorresistencia en células cancerígenas puede ser producto de múltiples cambios como el bloqueo de la apoptosis, la activación de los mecanismos de reparación del ADN y las alteraciones en el ciclo celular, entre otras.² El fenotipo de la MDR comprende la sobreexpresión de una proteína transmembranal de 170 kDa conocida como glicoproteína P (Gp-P) codificada por el gen MDR1.³ Esta proteína ha sido encontrada en diversos órganos como el intestino, el hígado, el páncreas, el riñón y las glándulas mamarias.⁴ La Gp-P pertenece a la superfamilia de bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette) y funciona como un transportador dependiente de energía que extrude desde el interior de la célula un amplio rango de fármacos anticancerígenos lipofílicos y anfipáticos estructural y funcionalmente diversos, así como toxinas y otros xenobióticos por lo que evita que los fármacos ejerzan su actividad citotóxica disminuyendo su acumulación intracelular.⁵ La sobreexpresión de esta glicoproteína es uno de los mecanismos mejor caracterizados que explica como las células cancerosas generan resistencia.

Con el fin de revertir la resistencia cruzada a fármacos en células cancerígenas, numerosos estudios se han enfocado en inhibir la función de la Gp-P y, de esta manera, incrementar la acumulación intracelular de los fármacos.⁶ Diversos productos naturales de origen vegetal,⁷⁻¹² así como algunos principios farmacéuticos naturales y sintéticos,^{7,13-15}

han demostrado un potencial inhibitorio de la función de la Gp-P sin desarrollar un efecto citotóxico, lo cual sugiere la necesidad de seleccionar productos seguros para el desarrollo de nuevos y potentes inhibidores de las bombas de eflujo.¹⁶

En México, las especies de enredaderas pertenecientes a la familia de las convolvuláceas han sido utilizadas desde tiempos precolombinos principalmente por su actividad purgante atribuida a diversos oligosacáridos biodinámicos.¹⁷ Estudios previos sobre el efecto modulador de estos compuestos microbiológicamente inactivos evaluados en bacterias resistentes Gram positivas (*Staphylococcus aureus*)¹⁸⁻²¹ y Gram negativas (*Escherichia coli* Rosetta-gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*)²² permitió caracterizar a estos glicolípidos como sustratos de las bombas de eflujo.

Se ha sugerido que la MDR es una variación de una traslocasa regular que simplemente ha ampliado su espectro de sustratos proporcionando a la célula una defensa simple contra las toxinas y xenobióticos que siempre se encuentran en el medio ambiente.²³ Por lo tanto, esta similitud en diseño y la alta incidencia de la evolución, aparentemente independientes de las bombas MDR bacterianas y eucariotas, fue el fundamento para la evaluación del potencial modulador de las resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae en células humanas de cáncer de mama resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin) para posteriormente poder desarrollar este tipo de productos naturales como prototipos seguros y eficaces inhibidores de las bombas de eflujo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

2.1.1 Naturaleza del cáncer

Después de más de medio siglo de investigación en quimioterapia, el cáncer sigue siendo una de las enfermedades más difíciles de tratar a nivel mundial como consecuencia de varios factores como son: las limitaciones de los modelos animales disponibles en la investigación de las neoplasias, la diversidad tumoral, la resistencia a los fármacos antitumorales, así como los efectos secundarios de la terapia.^{24,25}

El término «cáncer» se aplica a un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo.²⁴ Las células cancerosas manifiestan, en grados variables, características que las distinguen de las células normales como la proliferación incontrolada, la desdiferenciación, la pérdida de la función, la invasividad y la metástasis. Una célula normal se convierte en cancerosa debido a una o más mutaciones (heredadas o adquiridas) de su ADN. El desarrollo del cáncer es un proceso complejo que, además de un cambio genético, implica otros factores epigenéticos (alteraciones en la metilación del ADN, modificaciones en las histonas asociadas al ADN y ARN no modificados).²⁶ Las células cancerosas no están confinadas a un sobrecrecimiento focalizado, ni a la infiltración de los tejidos circundantes, por lo que, pueden extenderse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y torrente sanguíneo, creando tumores secundarios conocidos como «metástasis», siendo ésta la principal causa de mortalidad y morbilidad en la mayoría de

los casos.^{24,27} La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad. La incidencia para desarrollar cáncer se incrementa con el envejecimiento; sin embargo, gracias a los avances en cuanto a la prevención, la detección y el tratamiento de este padecimiento hoy en día, en lugar de considerarse como mortal, se considera como una enfermedad crónica.²⁵

De acuerdo con la OMS,²⁸ además de los factores genéticos del paciente, existen también agentes externos que participan como factores de riesgo:

1. Las radiaciones UV e ionizantes.
2. Los asbestos, el consumo de tabaco y alcohol, así como los contaminantes de alimentos (e.g., aflatoxinas), del agua potable (e.g., arsénico) y del aire en las ciudades.
3. La obesidad, malos hábitos alimenticios, la inactividad física, las infecciones crónicas por VHB o VHC y algunos tipos de PVH.

El conocimiento de estos factores de riesgo puede servir como base para la lucha contra el cáncer.

2.1.2 Cáncer en México y a nivel mundial

La Organización Mundial de la Salud (OMS)²⁸ estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer con 7.6 millones de casos, equivalente a un

13% de todas las muertes a nivel mundial, debidas principalmente a cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a 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. Desafortunadamente, alrededor del 70% de las muertes registradas por cáncer en el 2008, se produjeron en países de bajos y medianos recursos, estimándose que para el 2030 las defunciones por cáncer sigan aumentando a nivel mundial y supere los 13.1 millones de casos.

En México, durante el 2009 las principales causas de morbilidad hospitalaria en la población fueron debidas a tumores malignos en los órganos hematopoyéticos con 17.9% (principalmente leucemias); órganos digestivos con 14.8%; y mama con 12.5% de los casos. Para hombres, la distribución muestra predominio en órganos hematopoyéticos (22.8%) seguido de órganos digestivos (17.5%), mientras que para las mujeres, el cáncer de mama con un 22% seguida de los tumores de los órganos hematopoyéticos (14.1%) y de los órganos genitales femeninos (13.5%). Considerando el total de defunciones en México durante este mismo periodo, la tasa de mortalidad observada por tumores malignos fue de 65.11 y 65.49 por cada 100 mil hombres y mujeres, respectivamente.²⁹

2.1.3 Diagnóstico y tratamiento del cáncer

El diagnóstico del cáncer es la primera medida que se adopta para hacer frente a esta enfermedad. Un gran número de pruebas pueden realizarse para identificar la presencia de células anormales. Este tipo de pruebas pueden confirmar o eliminar el diagnóstico de cáncer primario, además de ayudar a determinar la propagación de la malignidad o fase del cáncer, dividiéndose en tres tipos generales de pruebas:

1. **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.
2. **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.
3. **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.²⁴

Una vez confirmado el diagnóstico de cáncer y la fase en la que se encuentra, es necesario elegir el tratamiento adecuado que por lo regular depende del tipo de degeneración. Este tratamiento generalmente es multidisciplinario y consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia biológica o alguna combinación de los mismos. Dependiendo del tipo de cáncer y qué tan avanzado sea, las terapias contra él pueden curar, controlar (prolongar vida) y aminorar los síntomas (tratamiento paliativo), mejorando la calidad de vida del paciente.³⁰

2.1.4 Quimioterapia antineoplásica y productos naturales

El diagnóstico temprano del cáncer puede incrementar las tasas de curación con un tratamiento local, como la cirugía o la radioterapia. Sin embargo, existen casos remanentes de micrometástasis temprana, en donde la quimioterapia es la elección, ésta es un tipo de terapia que utiliza fármacos para matar a las células cancerosas deteniendo o disminuyendo su rápida proliferación; sin embargo, no excluye a las células sanas que se replican rápidamente como las de los folículos pilosos, el aparato reproductor, el epitelio intestinal y la médula ósea, observándose distintos efectos secundarios como pérdida de cabello, falta de apetito, vómito e inmunosupresión, entre otras.^{30,31} La quimioterapia del cáncer se ha desarrollado de manera más específica, desde el uso en los años cuarenta de agentes citotóxicos, como las mostazas nitrogenadas al desarrollo de fármacos anticancerígenos a partir de fuentes naturales en los sesenta, como es el caso de los alcaloides de la vinca,³² los derivados de la podofilotoxina,³³ los taxanos³⁴ y las

antraciclinas,³⁵ hasta el uso de anticuerpos monoclonales específicos,³⁶ inmunotoxinas^{36,37} y agentes específicos que inactivan vías de crecimiento de células cancerígenas.²

Los productos naturales desempeñan un papel altamente significativo en el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos en donde aproximadamente el 70% de éstos es de origen natural, viéndose reflejado principalmente en áreas como el tratamiento del cáncer y neoplasias donde desde el inicio formal de la quimioterapia en los años 40 hasta el 2010, de 206 agentes anticancerígenos aprobados, 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 naturalmente inspirados, mientras que el 48.6% del total son de origen completamente natural o derivados de semisíntesis (Figura 1).³⁸

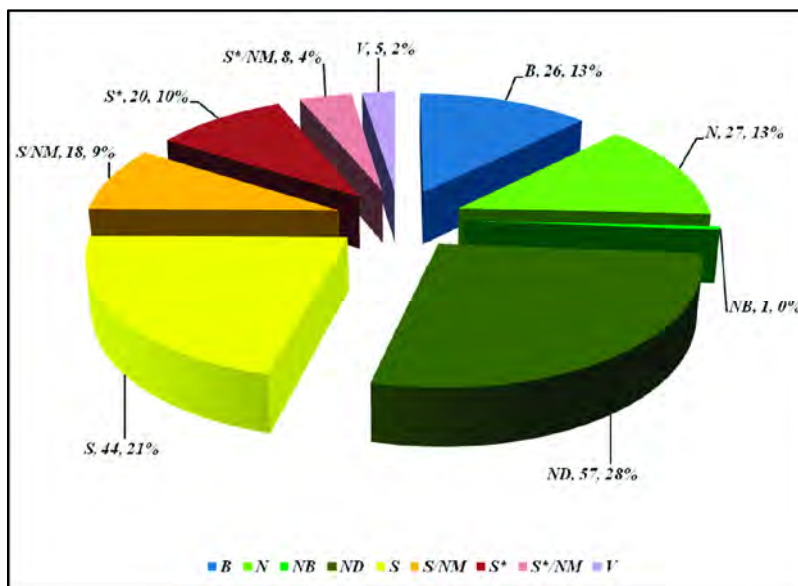


Figura 1. Fármacos anticancerígenos aprobados desde 1940 hasta 2010. Fuente de origen de los productos: B; Biológica, N; Natural, NB; Productos Naturales Botánicos, S; Completamente Sintéticos, NM; Imitación de productos naturales, S*; Síntesis total pero el farmacóforo es de producto natural, V; Vacunas, ND; Derivado de producto natural y es usualmente una modificación sintética.³⁸

La química medicinal de productos naturales abarca desde la identificación, el aislamiento y la caracterización de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, la modificación estructural, así como de otras propiedades físicas para optimizar su actividad farmacológica, además de su participación en la semisíntesis de productos para profundizar en estudios SAR^{39,40} y propiciar la generación de colecciones de productos químicos, basadas en estructuras privilegiadas mediante estrategias de química combinatoria.⁴¹

La terapia citotóxica del cáncer, comprende una gran diversidad de agentes, divididos en tres grandes categorías:²⁷

1. Fármacos citotóxicos es decir, fármacos que inhiben la división celular como:
 - a) Alquilantes y compuestos relacionados
 - b) Antimetabolitos
 - c) Antibióticos ciototóxicos
 - d) Derivados de plantas
 - e) Agentes intercalantes

2. Hormonas, de las cuales las más importantes son los esteroides como los glucocorticoides, estrógenos y andrógenos, así como fármacos que suprimen la secreción de las hormonas o que antagonizan su acción.

3. Otros fármacos diseñados para atacar dianas específicas relacionadas con el tumor.

En la Figura 2 se enumeran los principales sitios de acción de los fármacos citotóxicos para el tratamiento del cáncer que actúan sobre las células en división siendo capaces de detener alguna fase del ciclo celular.²⁷

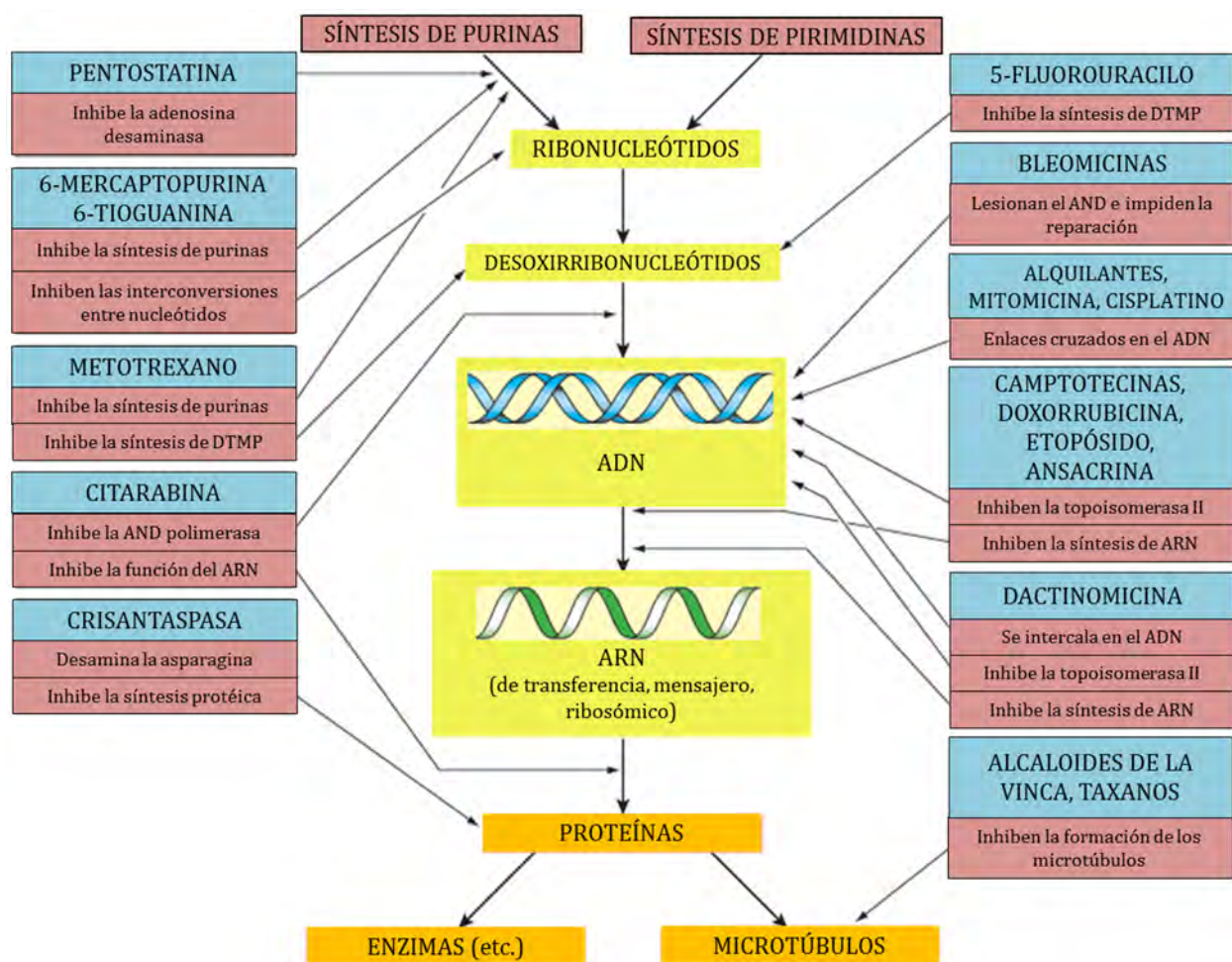


Figura 2. Principales sitios de acción de los fármacos citotóxicos. (DTMP: 2'-desoxitimidilato)²⁷

El descubrimiento y la caracterización química y biológica de sustancias provenientes de plantas superiores y de organismos marinos continúa representando una alternativa para la obtención de nuevos fármacos o precursores de interés clínico en el

tratamiento de enfermedades neoplásicas y sobre todo, para aquellos casos de tipo refractario como el cáncer de mama, pulmón, colon y próstata.⁴² Es importante resaltar que un alto porcentaje de los agentes anticancerígenos empleados en la actualidad derivan de fuentes naturales como los alcaloides de la vinca (*Catharanthus roseus*), los taxanos (*Taxus brevifolia*), la podofilotoxina (*Podophyllum peltatum*), y los derivados de la camptotecina (*Camptotheca acuminata*). Sin embargo, con el propósito de disminuir los efectos secundarios, sigue siendo prioritaria la búsqueda de nuevas estructuras químicas que permitan el desarrollo de fármacos más eficaces, más selectivos y menos tóxicos, a pesar de ello, la quimioterapia también se enfrenta con el problema de la quimiorresistencia que presentan algunas células tumorales.

2.1.5 Mecanismos de resistencia al cáncer

La razón más común para el fracaso de la quimioterapia en algunos tumores se debe principalmente a la resistencia desarrollada por las células cancerosas a los fármacos utilizados, 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. 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.² Esta resistencia adquirida, 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. 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.

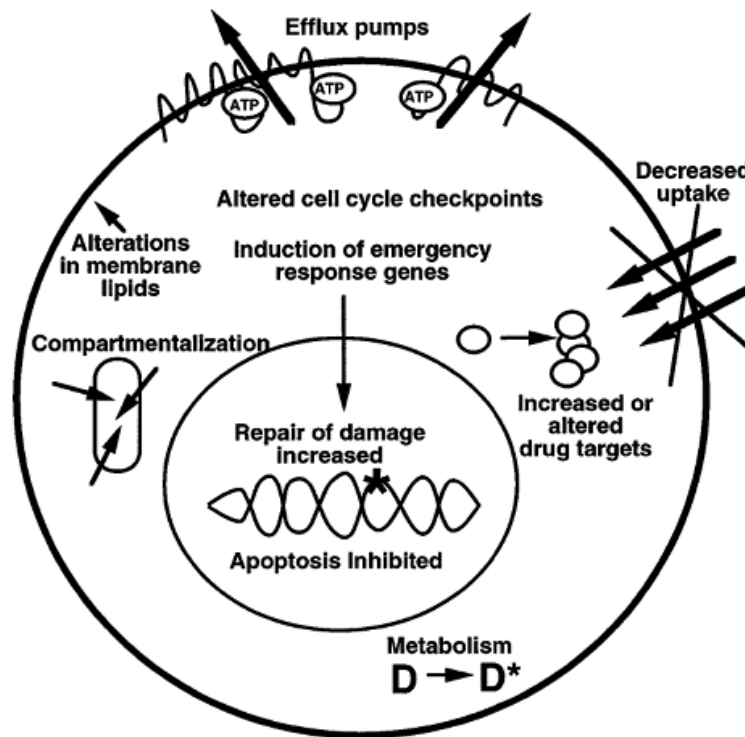


Figura 3. Mecanismos de resistencia de las células cancerosas.²

Algunos de estos mecanismos resultan en resistencia para sólo un pequeño grupo de fármacos relacionados, para tal caso, el uso de múltiples fármacos con diferentes mecanismos de entrada a las células, así como diferentes blancos celulares puede hacer más eficaz la quimioterapia así como aumentar las tasas de curación. Sin embargo, es muy frecuente que las células expresen mecanismos que confieren resistencia simultánea a diversos fármacos que son estructural y funcionalmente distintos (Figura 4), fenómeno

conocido como resistencia múltiple o cruzada a fármacos (MDR), ésta, además de complicar el tratamiento contra el cáncer, incrementa la morbilidad y la mortalidad, así como incrementa dramáticamente los costos financieros en los sistemas de salud.^{1,43} La quimiorresistencia en células cancerígenas puede ser una consecuencia de múltiples cambios como la disminución en la captación del fármaco, el aumento de eflujo, la alteración en los lípidos de membrana, el bloqueo de la muerte celular programada, la activación de mecanismos de reparación del ADN, así como alteraciones en el ciclo celular.²

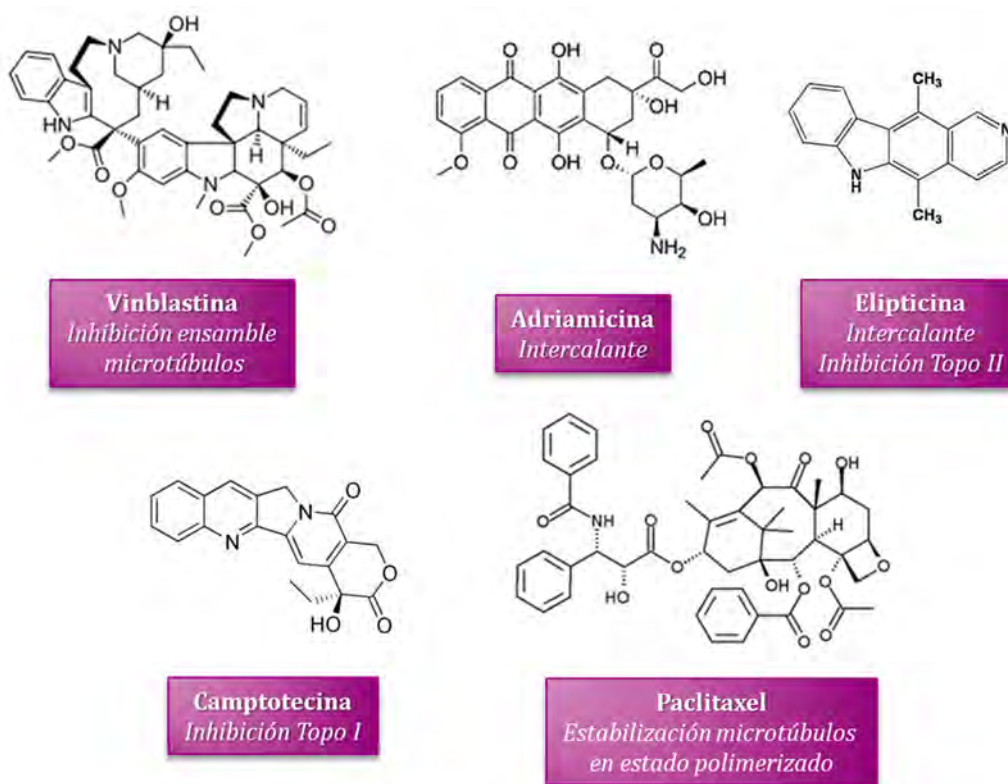


Figura 4. Ejemplo de fármacos anticancerígenos de origen natural con estructuras y mecanismos de acción diversos.

La razón más común para adquirir resistencia a un amplio rango de fármacos anticancerígenos es la expresión de uno o más transportadores dependientes de energía,

como la glicoproteína P, que tienen la tarea de detectar y expulsar el fármaco o cualquier xenobiótico al exterior de la célula.²

2.1.6 Glicoproteína P

El fenotipo de MDR comprende principalmente la sobreexpresión de una proteína transmembranal de 170 kDa conocida como glicoproteína P (Gp-P) codificada por el gen MDR1, la cual posee 12 segmentos transmembranales así como dos dominios intracitoplasmáticos de unión a moléculas de ATP y tres sitios de glicosidación (Figura 5).^{3,44}

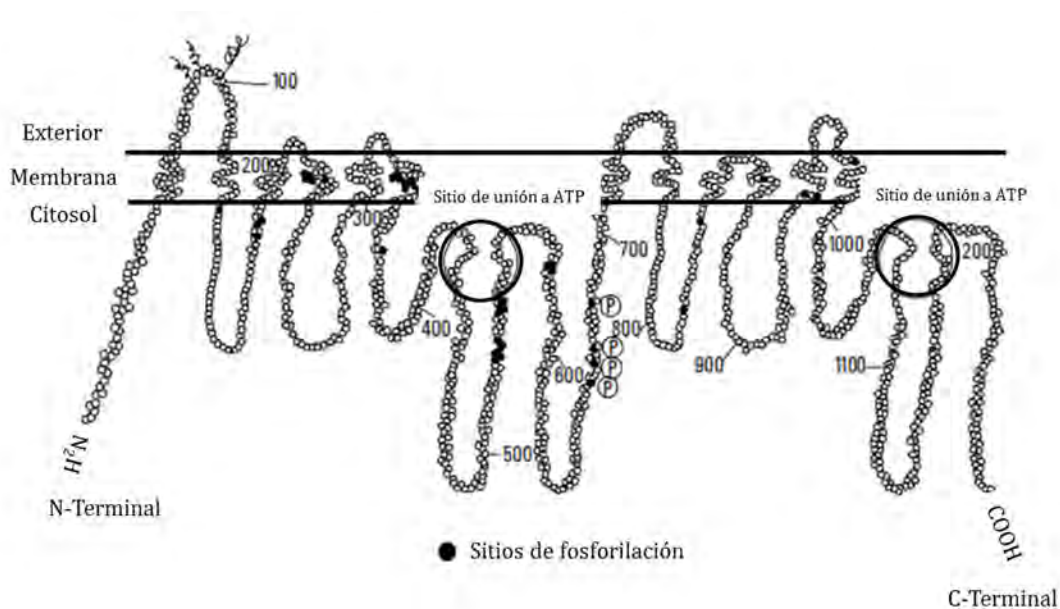


Figura 5. Modelo del transportador multifármaco Gp-P donde se visualizan los segmentos transmembranales y los sitios de unión a ATP.⁴⁵

El ciclo de transporte a los espacios extracelulares de los sustratos de la Gp-P se ilustra en la Figura 6, donde la estructura orientada al interior, no permite el acceso de sustratos del exterior de la membrana. Se considera que esta conformación representa un estado de pretransporte pues se ha demostrado que el fármaco se une a una cavidad interna abierta de la glicoproteína. Durante el ciclo catalítico, la unión de ATP estimulada por el sustrato provoca una dimerización de los dominios de unión a nucleótidos produciendo un gran cambio estructural en la glicoproteína y como resultado una conformación orientada hacia el exterior. Los sustratos pueden ser liberados como consecuencia de la disminución en la afinidad de unión causada por cambios en residuos específicos de aminoácidos entre la proteína y el fármaco que van desde la conformación interna a la externa o bien, facilitada por la hidrólisis de ATP. En cualquier caso, la hidrólisis de ATP altera la dimerización de los dominios de unión a nucleótidos, restableciendo el sistema, orientándolo al interior celular y así reiniciando el ciclo de transporte.⁴⁶

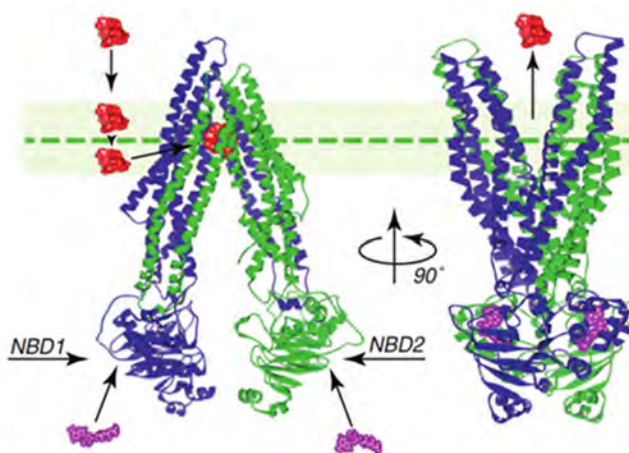


Figura 6. Ciclo de transporte para sustratos de la glicoproteína P. Sustratos (rojo), ATP (morado), NBD (Dominios de unión a nucleótidos).⁴⁷

Esta proteína se expresa en diversos tejidos normales (Figura 7) donde sirve como barrera para la absorción de fármacos (intestino delgado y colon), barrera de entrada a tejidos (células endoteliales del SNC, testículos, placenta y glándulas mamarias), así como para facilitar la excreción de fármacos (hígado y riñón).^{4,44}

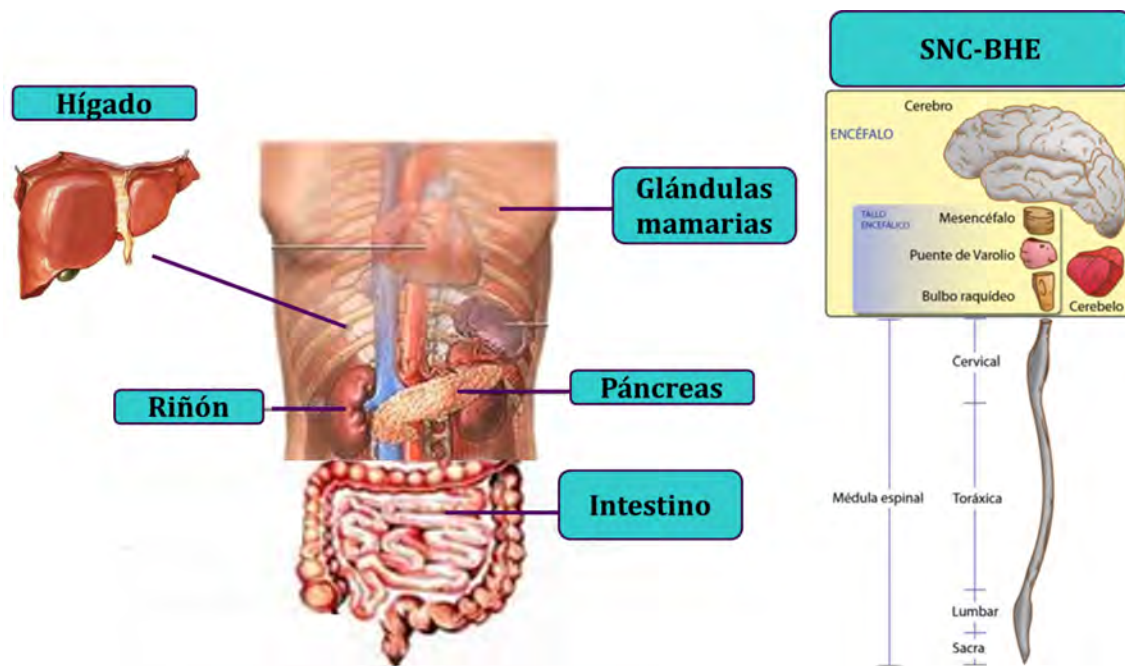


Figura 7. Distribución y expresión de la glicoproteína P en el cuerpo.

La Gp-P pertenece a la superfamilia de bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette) y funciona entonces como un transportador dependiente de energía que extrude desde el interior de la célula 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.⁵ 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 clasificados como

sustratos, inhibidores o moduladores, es decir, aquellos compuestos transportados activamente por la Gp-P son llamados sustratos, mientras que los inhibidores son aquellos que comprometen las funciones de transporte de la Gp-P y los moduladores interactúan con sitios de unión distintos que los de los sustratos, por lo que hay una reducción de unión del sustrato debido a una interacción alostérica negativa. Sin embargo, estos dos últimos tienen el mismo efecto biológico final que es el restaurar la sensibilidad de las células cancerígenas a los agentes quimioterapéuticos.⁴⁷ Existe una gran variedad de ensayos *in vitro* (actividad ATP-asa, acumulación intracelular de Rh123 o calcein-AM, transporte celular bidireccional, permeabilidad del fármaco) usados para clasificar a los fármacos o candidatos, como sustratos o no sustratos. Aunque este tipo de ensayos representan una batería bioquímica altamente eficaz, se han enfatizado los estudios por métodos computacionales (*in silico*) con el fin de economizar tiempo y dinero. Los métodos que se utilizan con más frecuencia son las predicciones basadas en el ligando y la estructura de la proteína.⁴⁸

Desde la década pasada, la estructura de la Gp-P humana ha sido caracterizada por técnicas de modelado por homología a partir de la estructura cristalina obtenida por rayos X de la Gp-P de ratón, la cual comparte un 87% de identidad en la secuencia con la humana. Sin embargo, la ausencia de una estructura cristalina confiable, también se ha convertido en un gran obstáculo para el diseño de inhibidores de la Gp-P.⁴⁷ Es importante mencionar que la dificultad para obtener la estructura tridimensional de la Gp-P se debe principalmente a que no se obtiene en grandes cantidades además de su difícil cristalización.⁴⁹

Algunas de las técnicas de laboratorio utilizadas para la identificación de la MDR, marcadores y mecanismos, son por medio de PCR, inmunohistoquímica y citometría de flujo.¹ Esta última representa la mejor herramienta para determinar la acumulación de fármacos fluorescentes en células resistentes, para monitorear la expresión de los marcadores de la resistencia cruzada a múltiples fármacos (con anticuerpos unidos a un fluorocromóforo), así como para el estudio de los mecanismos involucrados en la MDR.¹

Dentro de los fármacos anticancerígenos, derivados de productos naturales que reconoce esta glicoproteína, se encuentran las antraciclinas (doxorubicina, daunorribicina, idarubicina), los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vindesina), los taxanos (paclitaxel y docitaxel), las epipodofilotoxinas (etopósido y tenopósido), la mitoxantrona y la dactinomicina.⁴⁴ La sobreexpresión de esta glicoproteína es uno de los mecanismos mejor caracterizados que explica como las células cancerosas generan resistencia, por lo tanto, con el fin de revertir esta resistencia cruzada en células cancerígenas e incrementar la acumulación intracelular de los fármacos, numerosos estudios se han enfocado en identificar sustratos o desarrollar inhibidores más potentes, específicos y selectivos; sin embargo, esta búsqueda ha sido difícil debido a la promiscuidad o poca especificidad de reconocimiento de la Gp-P a los sustratos o inhibidores.^{6,47}

Varios productos farmacéuticos de origen natural y sintético, de estructuras diversas como bloqueadores de canales de calcio (verapamilo),¹³ antagonistas a calmodulina (trifluoperazina, cloropromazina),^{14,15} así como antimaláricos (cloroquina),¹³ antiarrítmicos (quinidina),¹³ e inmunosupresores (ciclosporina A),⁷ han demostrado un

potencial inhibidor de la función de la Gp-P. También, algunos productos naturales de origen vegetal como flavonoles (quercetina y galangina),⁸ gíngenosídeos,⁷ polifenoles,⁹ ácidos grasos poliinsaturados,¹⁰ diterpenos macrocíclicos¹¹ y alcaloides (reserpina y yohimbina)¹² se han descrito¹⁶ como moduladores de la actividad de la Gp-P (Figura 8).

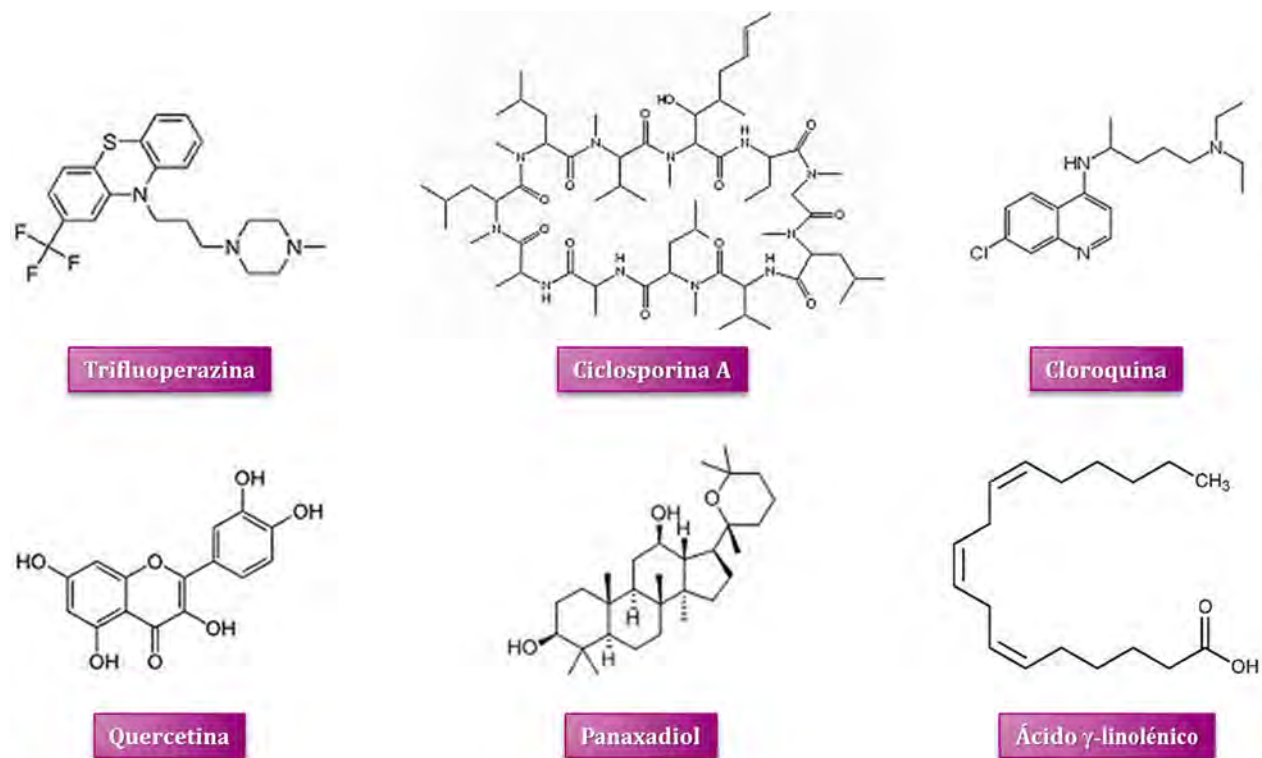


Figura 8. Ejemplos de productos farmacéuticos y de productos naturales moduladores de la Gp-P.

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer, es una práctica común dentro de la medicina tradicional de nuestro país en dónde el registro más antiguo se remonta al año de 1552, con el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Opúsculo Acerca de las Hierbas Medicinales de los Indios), mal llamado “*Códice Badiano*”, dictado en Náhuatl por el médico indígena Martín de la Cruz de Tlatelolco, traducido y escrito al latín por Juan Badiano. Se trata de un magnífico

ejemplo del encuentro de la cultura médica indígena del Centro de México y los formatos europeos de los recetarios. En este herbario medicinal, con 184 ilustraciones a color acompañadas de glosas en latín (Figura 9), se describen malestares que pueden interpretarse como afecciones cancerosas, e. g., los tumores en las mamas.⁵⁰



Figura 9. Ilustración del Manuscrito de la Cruz-Badiano para la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*), el principal remedio purgante de la medicina prehispánica (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, 1552, folio 32 recto).

Las especies de enredaderas, pertenecientes a la familia de las convolvuláceas y conocidas popularmente como quiebraplato o camotes, se han utilizado desde la época prehispánica por su actividad purgante y cuya principal característica quimiotaxonómica es que constituyen una fuente importante de alcaloides de tipo ergolina así como de glicolípidos, denominados con el nombre de resinas glicosídicas (Figura 10).¹⁷

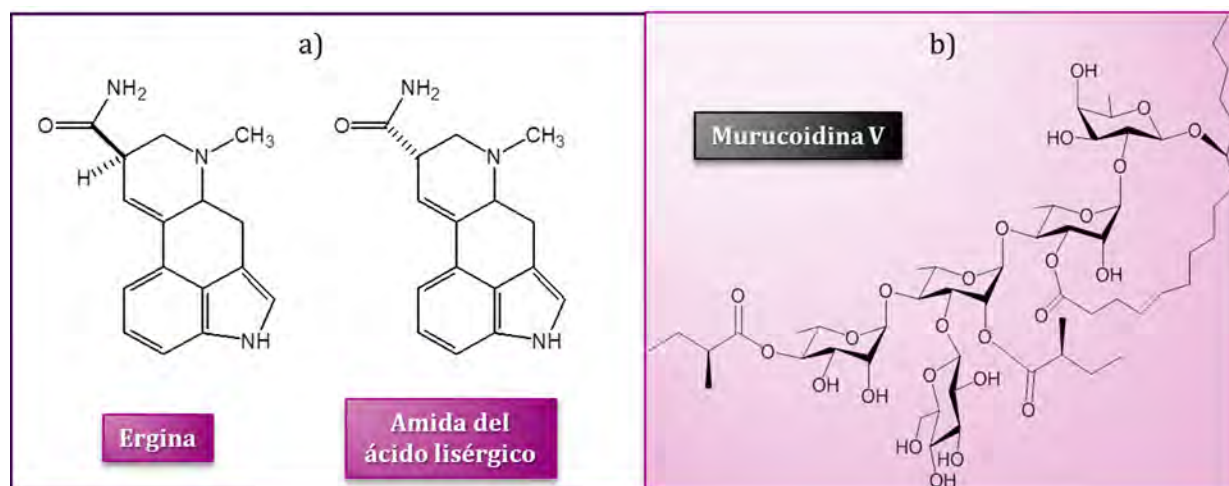


Figura 10. Ejemplo de estructuras de dos alcaloides de tipo ergolina (a) y de un glicolípido (b) aislados del género *Ipomoea*.

Desde el punto de vista químico, las resinas glicosídicas son derivados glicosilados de ácidos grasos mono o dihidroxilados de 14 a 16 átomos de carbono, conocidos como glicolípidos o lipopolisacáridos. Los glicolípidos característicos del género *Ipomoea* (uno de los géneros más representativos de la familia Convolvulaceae) constituyen una serie de oligosacáridos cuya particularidad radica en que son moléculas anfipáticas debido a la presencia simultánea en su estructura de un núcleo sacárido hidrofílico y una porción hidrofóbica constituida por la aglicona, la cual generalmente forma una lactona macrocíclica con la cadena oligosacárida (Figura 11).¹⁷ En las resinas glicosídicas podemos encontrar ésteres de ácidos grasos volátiles, no volátiles y carbohidratos. Los ácidos grasos volátiles identificados con mayor frecuencia son tíglico, isobutírico, metilbutírico, nílico y cinámico. Los ácidos grasos de alto peso molecular caracterizados en las especies del género *Ipomoea* incluyen a los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico. El ácido hexadecanoico hidroxilado en la posición C-11, conocido con el nombre de ácido

jalapινόlico, representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas del género *Ipomoea*. Por otra parte, los carbohidratos incluyen a la D-glucosa, la D-fucosa, la D-quinovosa y la L-ramnosa.¹⁷

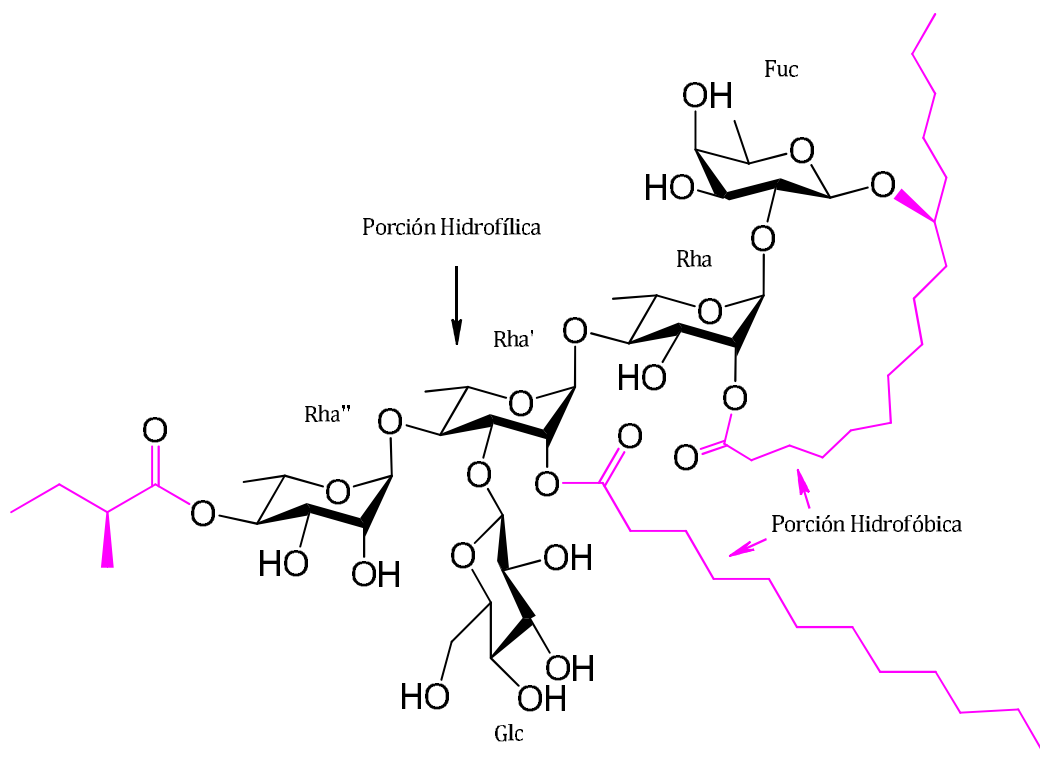


Figura 11. Características estructurales generales de una resina glicosídica.

Estudios previos sobre el efecto modulador de estos glicolípidos¹⁷ microbiológicamente inactivos evaluados en bacterias resistentes Gram positivo (*Staphylococcus aureus*)¹⁸⁻²¹ y negativo (*Escherichia coli* Rosetta-gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*)²² permitió caracterizar a estos compuestos como moduladores de las bombas de eflujo. Usando la cepa resistente SA-1199B de *S. aureus* que sobreexpresa la proteína transportadora de antibióticos Nor-A, algunos miembros de las series de orizabinas y murucoidinas fueron equipotentes a la reserpina (control positivo) en la

inhibición del eflujo de bromuro de etidio,^{18,19} un sustrato fluorescente de las bombas de eflujo.

La resistencia cruzada a fármacos entonces, abarca un amplio rango de sistemas biológicos desde bacterias, hongos y protozoarios hasta las complejas células cancerígenas humanas, donde en cada uno de ellos, se han aislados y caracterizados diversos homólogos de la Gp-P, ya que esta resistencia generalmente es conferida por bombas de eflujo, algunas de ellas similares en diseño y función, pero con mecanismos de transporte distintos como se ilustra en la Figura 12.⁴⁹

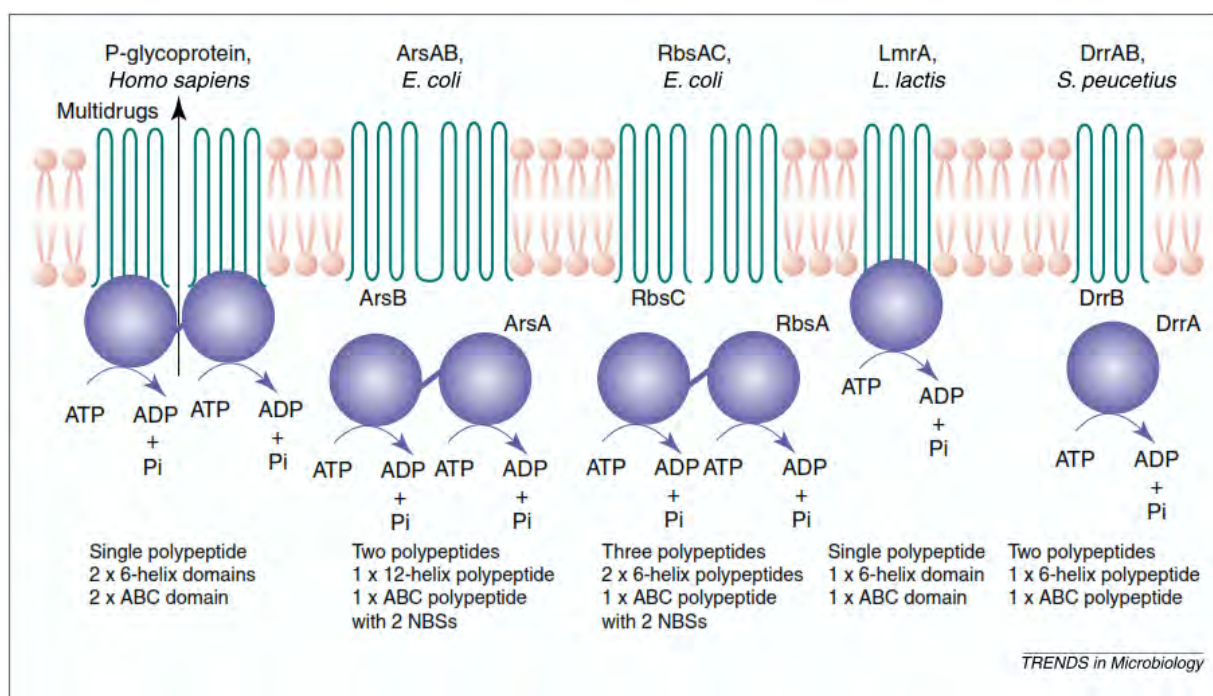


Figura 12. Similitud en diseño entre las bombas de eflujo de procariotas y eucariotas.⁵¹

3 JUSTIFICACIÓN

La similitud en diseño y la alta incidencia de la evolución aparentemente independientes de las bombas MDR bacterianas y eucariotas constituyen el fundamento para la evaluación de la actividad moduladora de las resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae en células humanas de cáncer de mama resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin), así como la evaluación por medio de citometría de flujo de la actividad y expresión de la glicoproteína P como uno de los mecanismos responsables de esta resistencia.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el potencial modulador de los oligosacáridos de las convolvuláceas sobre la actividad (transporte transmembranal) y expresión de la glicoproteína-P en células humanas aisladas de cáncer de mama resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin) y revertir el fenómeno de la resistencia a fármacos.

4.2 Específicos

- I. Seleccionar las líneas celulares resistentes a vinblastina.
- II. Obtener la CI_{50} de la vinblastina, elipticina, camptotecina, colchicina y adriamicina para corroborar la multifármaco-resistencia de las líneas seleccionadas.
- III. Realizar las curvas de proliferación celular.
- IV. Evaluar la citotoxicidad de treinta y cinco glicolípidos sobre las líneas celulares MCF-7 parental y las MCF-7 resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin) por el método de la sulforodamina B.
- V. Evaluar el potencial modulador de los glicolípidos sobre la actividad de la glicoproteína P.
- VI. Evaluar por inmunofluorescencia (citometría de flujo) la actividad de la glicoproteína P con dos glicolípidos selectos (murucoïdina V y purgina II) mediante ensayos de acumulación, eflujo y persistencia del colorante rodamina 123.
- VII. Medir la expresión de la glicoproteína P con un anticuerpo monoclonal anti-Gp-P por citometría de flujo en presencia o ausencia de murucoïdina V y purgina II.

5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Citometría de flujo

La intensidad media de fluorescencia (MIF) para todos los ensayos se midió en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José California, USA). La excitación se realizó a 485 nm y la fluorescencia emitida se colectó a través de un filtro de 530 nm. El control del equipo así como la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron con el programa CellQuest Pro.

5.2 Reactivos

El medio RPMI 1640 y el SFB fueron comprados a Gibco®, el anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína contra Gp-P Mdr-1 (UIC2) a Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) y la SRB, reserpina, vinblastina, elipticina, colchicina, camptotecina y Rh123 a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.3 Compuestos de prueba

Los glicolípidos 1–35 fueron aislados y purificados mediante la aplicación de métodos cromatográficos (HPLC) y caracterizados estructuralmente a través del empleo de la resonancia magnética homo y heteronuclear como se describió previamente durante los estudios fitoquímicos de *Ipomoea batatas*,⁵² *I. intrapilosa*,⁵³ *I. murucoides*,^{19,20,54} *I.*

orizabensis,⁵⁵ *I. pes-caprae*,^{56,57} *I. purga*^{58,59} e *I. tricolor*.^{60,61} Las estructuras para todos los compuestos se incluyen en el apéndice 1.

5.3.1 Condiciones instrumentales en CLAE

La pureza de cada uno de los compuestos de prueba (>99%) se confirmó mediante ensayos analíticos en cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) fase reversa C18. El equipo de cromatografía consistió en un modelo marca Waters compuesto de un sistema de liberación de disolventes 600 E, equipado con un detector de índice de refracción modelo 410 integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell). El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información cromatográfica se realizaron con el software Empower 2 (Waters). Las siguientes condiciones instrumentales se utilizaron para el análisis de cada una de las muestras:

Fase estacionaria: columna Symmetry C₁₈ (Waters; 5 μm, 4.6 × 250 mm)

Fase móvil: CH₃CN-MeOH (9:1)

Velocidad de flujo isocrático: 0.7 mL/min

Volumen de inyección de la muestra: 20 μL (3 mg/mL)

Detección: Índice de refracción

Sensibilidad: 128 RIU

5.4 Líneas y cultivos celulares

La línea celular MCF-7 parental derivada de cáncer de mama fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC HTB-22). La contraparte resistente MCF-7/Vin fue desarrollada a través de exposición continua y creciente del agente citotóxico vinblastina

durante tres años consecutivos. Se considera que estas células expresan el fenotipo MDR debido a que mostraron resistencia cruzada con adriamicina, colchicina y elipticina (Cuadro 1). Todas las células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y cultivadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y 100% de humedad. Para mantener la resistencia a vinblastina, las células MCF-7/Vin⁺ fueron cultivadas en medio conteniendo 0.192 µg/mL vinblastina. Al mismo tiempo, se mantuvieron células MCF-7/Vin⁻ en medio libre de vinblastina.

MCF-7	Línea parental (sensible a vinblastina)
MCF-7/Vin	Línea resistente (incluye la que crece en presencia de vinblastina y la que crece en medio libre de vinblastina.
MCF-7/Vin ⁺	Línea resistente que crece en presencia de 0.192 de vinblastina.
MCF-7/Vin ⁻	Línea resistente que crece en medio libre de vinblastina.

5.5 Citotoxicidad

La citotoxicidad y el factor de reversión de las resinas glicolípidas evaluadas (1-35) se determinaron con el método de la SRB.⁶² Las células fueron cosechadas hasta la fase logarítmica de su ciclo de crecimiento y fueron tratadas por triplicado con varias concentraciones de los compuestos de prueba (0.2 – 25 µg/mL) e incubadas por 72 h a 37 °C en atmósfera de 100% humedad y 5% de CO₂. Los resultados obtenidos se expresan como la concentración que inhibe el 50% del control de crecimiento después del periodo de incubación (CI₅₀). Los valores fueron estimados a partir de una curva semilogarítmica de

la concentración del fármaco ($\mu\text{g/mL}$) contra el porcentaje de inhibición de crecimiento. La vinblastina se utilizó como un control positivo.

5.6 Ensayos de modulación

Los efectos de modulación fueron determinados con el mismo método que para los ensayos de citotoxicidad. Las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con varias concentraciones de vinblastina ($0.00064 - 10 \mu\text{g/mL}$) en presencia o ausencia de glicolípidos a 25 y $5 \mu\text{g/mL}$ por 72 h. La habilidad de los glicolípidos para potenciar la citotoxicidad de la vinblastina fue medida a partir de la obtención de la CI_{50} . En estos experimentos se utilizó reserpina ($5 \mu\text{g/mL}$) como control positivo. El factor de reversión (FR, como un parámetro de potencia) se calculó dividiendo la CI_{50} de la vinblastina entre la CI_{50} de la vinblastina en presencia del compuesto de prueba.

5.7 Captación y acumulación intracelular de rodamina 123

Las líneas celulares MCF-7 y MCF-7/Vin fueron sembradas en placas de 6 pozos (4.5×10^5 células por pozo) e incubadas por 24 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 en aire y 100% de humedad. Cuando se alcanzó un 60% de confluencia, se sustituyó el medio de crecimiento con una solución recién preparada, adicionando posteriormente $2.5 \mu\text{g/mL}$ de rodamina 123, murucoidina V, purgina II (25 o $5 \mu\text{g/mL}$) o reserpina ($5 \mu\text{g/mL}$). Se incubó bajo las mismas condiciones durante 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 min con el fin de

determinar el tiempo de acumulación máximo de Rh123. Al término del tiempo de incubación, la acumulación de rodamina 123 se detuvo lavando las células 3 veces con PBS frío. Posteriormente, la intensidad media de fluorescencia intracelular asociada a la rodamina 123 se registró mediante citometría de flujo.

5.8 Ensayos de eflujo y persistencia de la rodamina 123

Las células fueron sembradas y cultivadas durante 24 h de la misma manera como se describió para el ensayo de acumulación. Al término de este tiempo las células fueron primero incubadas a 37 °C por 30 min (para el ensayo con muruoidina V) y por 120 min (para el de purgina II) con medio fresco conteniendo 2.5 µg/mL de rodamina 123. Después, se lavaron con medio fresco libre de rodamina e incubadas nuevamente en presencia o ausencia de muruoidina V o purgina II (25 o 5 µg/mL) por 0, 10, 20, 30, 50 min.

Para el ensayo de persistencia, se adicionó medio fresco y las células fueron incubadas nuevamente con 2.5 µg/mL de rodamina 123 en presencia o ausencia de muruoidina V o purgina II (25 o 5 µg/mL) por 30 ó 120 min respectivamente. La habilidad de las células para acumular la rodamina 123 y mantener el efecto inhibitorio remanente fue medida después de 30, 60 y 90 min. El t_0 representa el fin de la fase de incubación con el modulador.⁶³ Reserpina (5 µg/mL) se utilizó como un control positivo en ambos ensayos. La intensidad media fluorescente (MFI) se registró de la misma forma como se describió anteriormente para el ensayo de acumulación.

5.9 Expresión de la glicoproteína P

Para medir los niveles de glicoproteína P en la superficie de la célula por inmunofluorescencia (citometría de flujo),⁶⁴ las células fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 4.5×10^5 células por pozo e incubadas por 24 h. Después de este periodo, las células fueron recolectadas y lavadas dos veces con PBS frío; posteriormente, se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-Gp-P Mdr-1 (UIC2) conjugado con fluoresceína. Las células se incubaron al mismo tiempo con la mururoidina V, purgina II (25 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o reserpina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) así como con el anticuerpo durante 30 min en hielo. La MFI se midió como se describió anteriormente.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Curvas de proliferación celular

Se realizaron las curvas de proliferación celular para cada línea por el método colorimétrico de la sulforodamina B⁶² con el fin de identificar y estandarizar la cantidad de células, así como el tiempo de incubación óptimo para realizar los ensayos de citotoxicidad y modulación. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento de un organismo, en este caso, para el correcto desarrollo de los ensayos biológicos *in vitro* pues es necesario garantizar que las células utilizadas, se encuentren en un estadio uniforme de su crecimiento en la fase logarítmica y que no sean células que se encuentren en un estado apoptótico o sean necróticas. Las curvas se realizaron por triplicado en placas de 96 pozos a tres densidades celulares así como tres tiempos de incubación como se ilustra en la Figura 13. Se puede observar que la cantidad de 9,500 células por pozo y 72 horas de tiempo de incubación son ideales para obtener curvas de proliferación cuando las células están a un 60-70 % de confluencia y en un rango lineal para la lectura de las placas a 490 nm.

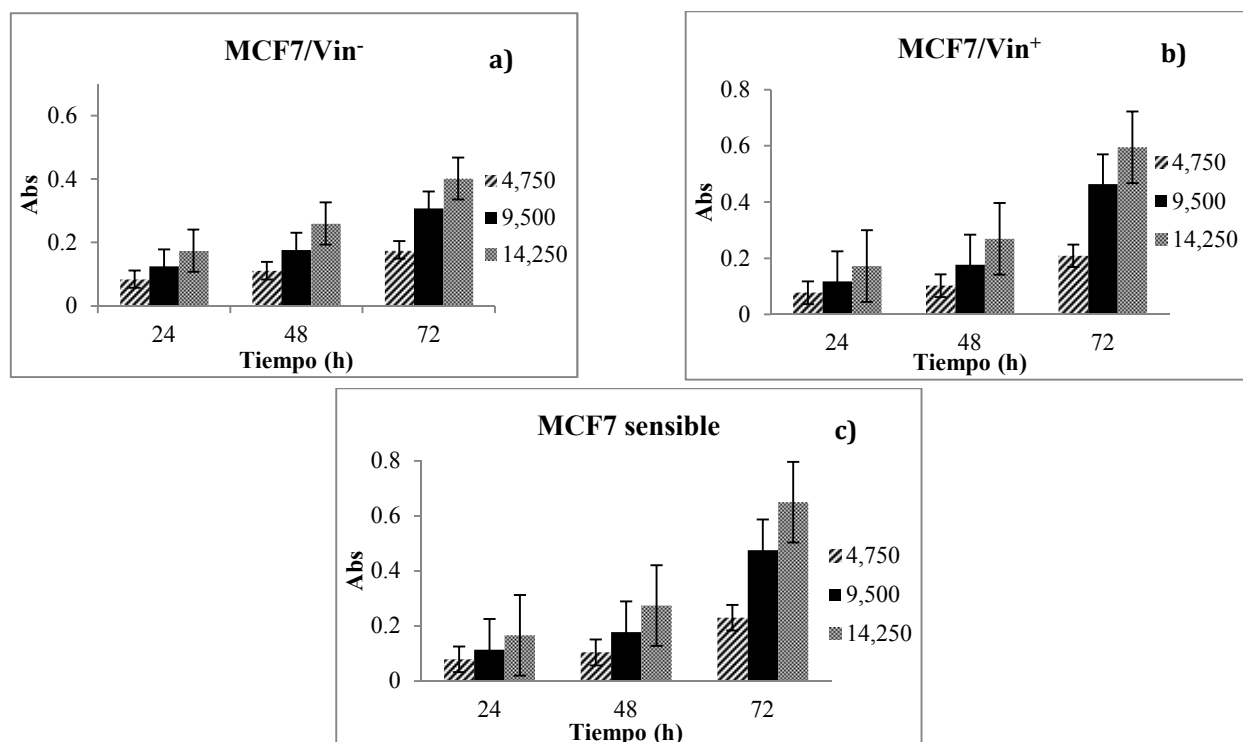


Figura 13. Curvas de proliferación de las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin multifármaco-resistentes a tres cantidades iniciales de células y tres tiempos diferentes. (a) MCF-7 resistente a vinblastina que crece en ausencia de vinblastina en el medio. (b) MCF-7 resistente a vinblastina en la cual el medio es suplementado con 0.192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vinblastina. (c) MCF-7 sensible a vinblastina. Los datos son expresados como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

6.2 Selección de la línea celular resistente

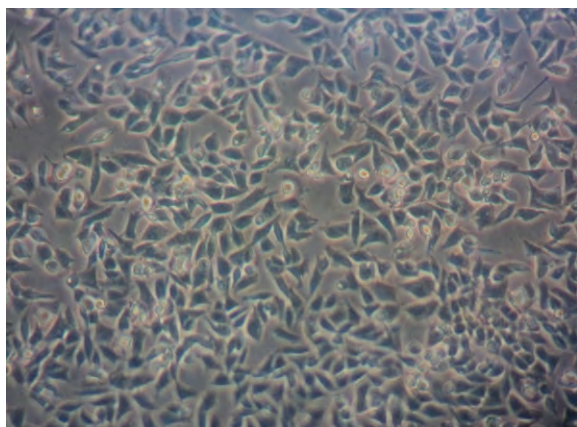
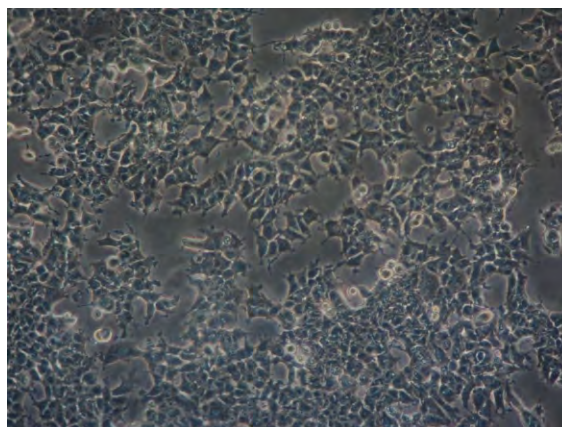
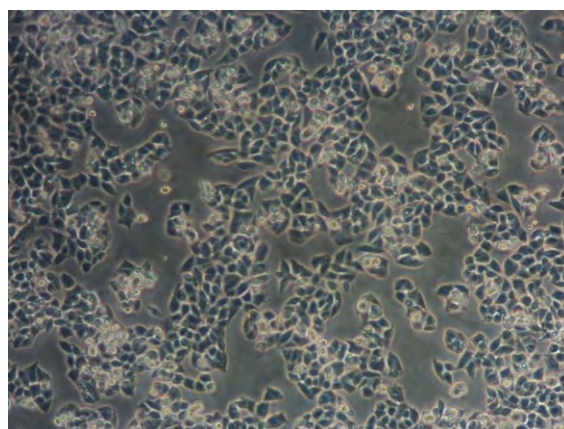
Se realizó la selección de la línea celular resistente a vinblastina a partir de la línea parental MCF-7 mediante exposición creciente y continua a este agente antitumoral durante tres años consecutivos. Como se esperaba, la línea resistente desarrollada (MCF-7/Vin) mostró una menor susceptibilidad a la vinblastina que las parentales, además se considera que estas células expresan el fenotipo MDR, debido a que mostraron una resistencia cruzada con adriamicina, colchicina y elipticina como se resume en el Cuadro 1.

Esta resistencia cruzada es una de las principales características de la MDR, pues las células seleccionadas son también resistentes a otros agentes que no poseen ningún tipo de analogía funcional o estructural, ya que unos actúan como intercalantes y otros como inhibidores de las topoisomerasas y de la polimerización de la tubulina.⁶⁵ Lo único que tienen en común estos compuestos es que son anfipáticos y que poseen anillos aromáticos hidrofóbicos. Para conservar la resistencia al fármaco, la línea MCF-7/Vin⁺ se mantuvo en medio suplementado con 0.192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vinblastina. Al mismo tiempo, se mantuvieron en crecimiento células MCF-7/Vin⁻ en medio libre de vinblastina. Se mantuvo un monitoreo mensual de la CI_{50} de las tres líneas así como de su morfología durante el tiempo de experimentación. Aunque las tres líneas son células de morfología epitelial, se observa claramente en la Figura 14 que hay diferencias en cuanto al tamaño y forma de crecimiento en monocapa, es decir, las células MCF-7 sensibles son más pequeñas, menos estrelladas en su forma y la capa que forman en la superficie no es muy homogénea como en el caso de las MCF-7/Vin⁻. El estudio de la morfología de las células actúa como un bioindicador, ya que un cambio en ésta nos puede sugerir un mal estado de las mismas.

Cuadro 1. Citotoxicidad de vinblastina y resistencia cruzada en las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin resistentes.

	Línea Celular				
	MCF-7sens	MCF-7/Vin ⁻		MCF-7/Vin ⁺	
	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Valor Resistencia	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Valor Resistencia
vinblastina	0.047 ± 0.01	1.02 ± 0.18	22-veces	1.22 ± 0.14	26- veces
adriamicina	0.644 ± 0.05	4.52 ± 1.3	7- veces	2.42 ± 0.48	4- veces
colchicina	0.016 ± 0.003	1.05 ± 0.06	66- veces	0.90 ± 0.19	56- veces
camptotecina	<0.00064	<0.00064	--	<0.00064	--
elipticina	0.359 ± 0.04	0.38 ± 0.02	1- vez	0.43 ± 0.07	1-vez

Cada valor representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

A. MCF-7/Vin⁻B. MCF-7/Vin⁺

C. MCF-7 sensible

Figura 14. Monitoreo de la morfología de las líneas celulares por microscopía óptica.

6.3 Citotoxicidad de los glicolípidos de prueba

En los ensayos de citotoxicidad para todos los glicolípidos se identificaron aquellos compuestos no citotóxicos ($CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$) que, posteriormente, se evaluaron como inhibidores de las bombas de eflujo en las células resistentes (Cuadro 2). La mayoría de los compuestos fueron ligeramente citotóxicos ($CI_{50} = 10\text{-}25 \mu\text{g/mL}$) o inactivos. Sólo los

miembros de la serie de las orizabinas (**22** - **28**) mostraron una citotoxicidad moderada contra las líneas evaluadas ($CI_{50} = 1.5-10 \mu\text{g/mL}$).

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,^{18,22} por lo que se considera como el principal criterio de selección para ensayos posteriores.

Cuadro 2. Citotoxicidad de los glicolípidos **1 – 35**.

No.	Compuesto	CI ₅₀ (µg/mL) ^a		
		MCF-7 sens	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺
1	MurucoidinaV	21.1 ± 3.34	>25	>25
2	Murucoidina IV	16.33 ± 2.66	22.51 ± 0.38	23.75 ± 1.4
3	Murucoidina VIII	5.85 ± 1.3	17.07 ± 2.02	18.23 ± 1.65
4	Intrapilosina I	>25	>25	>25
5	Intrapilosina IV	>25	>25	>25
6	Intrapilosina VII	>25	>25	>25
7	Simonina II	>25	>25	>25
8	Batatinosido IV	5.01 ± 0.61	10.2 ± 0.24	11.85 ± 1.4
9	Purginosido I	>25	>25	>25
10	Purginosido II	>25	>25	>25
11	Purginosido III	>25	>25	>25
12	Purginosido IV	>25	>25	>25
13	Pescaprosido A	18.33 ± 2.77	24.54 ± 0.02	22.85 ± 0.2
14	Pescaprosido B	10.9 ± 1.25	>25	23.94 ± 0.2
15	Pescapreina II	16.38 ± 1.77	>25	24.31 ± 0.02
16	Pescapreina III	5.73 ± 1.92	25.69 ± 0.07	>25
17	Pescapreina V	10.53 ± 0.11	>25	23.75 ± 0.4
18	Pescapreina VIII	13.82 ± 3.29	22.76 ± 3.22	23.57 ± 0.4
19	Murucoidina XVI	18.53 ± 0.06	>25	21.59 ± 1.21
20	Tricolorina A	23.67 ± 1.59	18.35 ± 0.62	23.85 ± 1.02
21	Tricolorina E	23.51 ± 1.64	24.27 ± 0.035	23.8 ± 1.26
22	Orizabina X	11.72 ± 0.28	10.8 ± 0.96	4.62 ± 0.35
23	Orizabina XI	10.89 ± 2.39	10.39 ± 0.55	0.999 ± 0.001
24	Orizabina XIV	19.76 ± 3.46	11.96 ± 0.82	6.78 ± 0.32
25	Orizabina XVI	8.34 ± 1.66	10.61 ± 2.28	1.6 ± 0.52
26	Orizabina XVII	22.54 ± 0.35	10.55 ± 0.55	14.65 ± 3.01
27	Orizabina XX	2.34 ± 0.24	3.21 ± 0.36	2.57 ± 0.3
28	Orizabina XXI	8.55 ± 0.24	7.52 ± 0.47	0.999
29	Tricolorina I	>25	25.53 ± 0.18	>25
30	Tricolorina J	>25	>25	>25
31	Batatina I	23.92 ± 0.04	>25	>25
32	Batatina II	11.39 ± 0.76	>25	>25
33	Purgina I	>25	>25	>25
34	Purgina II	>25	>25	>25
35	Purgina III	>25	>25	>25

^aCada valor representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

6.4 Ensayos preliminares de modulación de la glicoproteína P

Se realizaron ensayos preliminares de modulación de los treinta y cinco glicolípidos sobre la línea resistente MCF-7/Vin^r ya que crece en ausencia de vinblastina y presenta la mejor tasa de proliferación. En estos ensayos se observó que con todos los compuestos de prueba hubo un incremento en la susceptibilidad de las células a la vinblastina desde 1 a >2140 veces (Cuadro 3). Estos resultados permitieron la selección de seis glicolípidos (**1, 2, 3, 19, 20 y 34**) que resultaron positivos como agentes de reversión de la resistencia (Cuadro 4). Sin embargo, de esta selección hay que tomar en cuenta que aunque resultaron activos como moduladores, algunos de ellos son ligeramente citotóxicos y, por lo tanto, sólo dos se eligieron por no ser tóxicos: la muruoidina V (**1**) y la purgina II (**34**) (Ver apéndice 1 para estructuras). También, se consideró como un factor decisivo para esta selección la abundancia de estos productos en su fuente natural ya que ésta permitió su purificación en cantidades suficientes para realizar los experimentos propuestos para la caracterización de su comportamiento como inhibidores de la Gp-P.^{54,59}

En términos de la relación entre la estructura química y la actividad moduladora no específica, se determinó que ni el tamaño de la macrolactona, ni el largo de la cadena oligosacárida o azúcares que la conforman, ni el tipo y posición de acilación del núcleo sacárido fueron cruciales para la potenciación de la actividad. Por lo tanto, las resinas glicosídicas pueden considerarse como compuestos inespecíficos en su acción, desde un punto de vista estructural, debido a que pueden presentar actividades biológicas similares como la citotoxicidad y modulación con estructuras distintas.⁴⁰

Cuadro 3. Ensayo preliminar de modulación sobre la línea MCF-7/Vin⁻.

Grupo ^a	CI ₅₀ (µg/mL)		Factor de Reversión ^d	
	Vinblastina + C1 ^c	Vinblastina + C2 ^c	FR _{C1}	FR _{C2}
VINBLASTINA	1.02 ± 0.18			
1	0.004 ± 0.002	0.219 ± 0.01	255	4.7
2	<0.00064	0.013 ± 0.003	>1593.8	78.5
3	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1593.8
4	0.055 ± 0.05	0.131 ± 0.07	18.5	7.8
5	0.528 ± 0.2	0.502 ± 0.08	1.9	2
6	0.512 ± 0.09	0.904 ± 0.1	2	1.1
7	0.368 ± 0.2	0.653 ± 0.2	2.8	2
8	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1593.8
9	0.384 ± 0.2	0.306 ± 0.3	2.7	3.3
10*	0.88 ± 0.3	0.980 ± 0.2	1.2	1.1
11*	0.92 ± 0.07	1.01 ± 0.08	1.2	1.1
12*	0.325 ± 0.08	0.548 ± 0.07	3.3	1.9
13	0.488 ± 0.04	0.46 ± 0.08	2.1	2.2
14	<0.00064	0.498 ± 0.1	>1593.8	2.1
15	0.256 ± 0.1	0.656 ± 0.01	4	1.6
16	0.025 ± 0.04	0.686 ± 0.04	40.8	1.5
17	0.046 ± 0.03	0.589 ± 0.1	22.2	1.7
18	<0.00064	0.567 ± 0.05	>1593.8	1.8
19	<0.00064	0.015 ± 0.005	>1593.8	68
20	<0.00064	0.096 ± 0.01	>1593.8	10.6
21	0.015 ± 0.02	0.17 ± 0.1	68	6
22	0.065 ± 0.01	0.212 ± 0.08	15.7	4.8
23	0.166 ± 0.05	0.808 ± 0.1	6.1	1.3
24	0.019 ± 0.005	0.075 ± 0.02	53.7	13.6
25	0.125 ± 0.06	0.342 ± 0.03	8.16	3
26	<0.00064	0.014 ± 0.01	>1593.8	72.9
27	<0.00064	0.005 ± 0.004	>1593.8	204
28	0.087 ± 0.04	0.143 ± 0.03	11.7	7.1
29	0.007 ± 0.003	0.176 ± 0.01	145.7	5.8
30	0.258 ± 0.05	0.174 ± 0.01	4	5.9
31	0.258 ± 0.05	0.797 ± 0.2	4	1.3
32	0.13 ± 0.05	0.539 ± 0.1	7.8	1.9
33	0.229 ± 0.04	0.236 ± 0.1	4.5	4.3
34*	<0.00064	0.0169 ± 0.02	>1687.5	63.9
35*	0.168 ± 0.01	0.354 ± 0.08	6.4	3.1
Reserpina^b	0.037 ± 0.01		27.57	

^a Diluciones seriadas desde 0.00064 a 10 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia de glicolípido. ^b Reserpina = 5 µg/mL como control positivo, ^c C1= 25 µg/mL de glicolípido y C2= 5 µg/mL. ^d FR= CI₅₀ Vinblastina/ CI₅₀ Vinblastina en presencia de glicolípido. * Para **10**, **11**, **12**, **34** y **35** los valores de CI₅₀ Vinblastina para MCF-7/V⁻ = 1.08 ± 0.06 µg/mL y para MCF-7/V⁺ = 1.37 ± 0.23 µg/mL.

Cuadro 4. Ensayos de modulación de la actividad de la vinblastina con glicolípidos selectos sobre las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin.

compuesto ^a	CI ₅₀ (µg/mL)			Factor de Reversión ^c		
	MCF-7/V ⁻	MCF-7/V ⁺	MCF-7 sens	FR	FR	FR
				MCF-7/V ⁻	MCF-7/V ⁺	MCF-7 sens
vinblastina	1.02 ± 0.18	1.22 ± 0.14	0.047 ± 0.01			
1-C1	0.004 ± 0.002	0.156 ± 0.13	0.001 ± 0.002	255	7.8	47
1-C2	0.219 ± 0.01	0.75 ± 0.06	0.007 ± 0.009	4.7	1.6	6.7
2-C1	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1906.3	>73.4
2-C2	0.013 ± 0.003	1.19 ± 0.09	0.0031 ± 0.002	78.5	1	15.2
3-C1	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1906.3	>73.4
3-C2	<0.00064	0.606 ± 0.08	0.003 ± 0.001	>1593.8	2	15.7
19-C1	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1906.3	>73.4
19-C2	0.015 ± 0.005	0.974 ± 0.08	0.002 ± 0.001	68	1.3	23.5
20-C1	<0.00064	<0.00064	0.001 ± 0.0003	>1593.8	>1906.3	47
20-C2	0.096 ± 0.01	0.904 ± 0.07	0.002 ± 0.001	10.6	1.3	23.5
34-C1	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1687.5*	>2140.6*	>73.4*
34-C2	0.0169 ± 0.02	1.26 ± 0.14	0.002 ± 0.001	63.9	1.1	23.5
reserpina^b	0.037 ± 0.01	0.31 ± 0.19	0.003 ± 0.001	27.6	3.9	15.7

^a Diluciones seriadas desde 0.00064 a 10 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia de glicolípido (C1= 25 µg/mL o C2= 5 µg/mL), ^b Reserpina = 5 µg/mL como control positivo, ^c FR = CI₅₀ Vinblastina/ CI₅₀ Vinblastina en presencia de glicolípido. Cada valor representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes. * Para **34**, los valores de CI₅₀ Vinblastina para MCF-7/ V⁻ = 1.08 ± 0.06 µg/mL y para MCF-7/V⁺ = 1.37 ± 0.23 µg/mL.

6.5 Evaluación de la Mururoidina V y Purgina II sobre la actividad de la glicoproteína P

6.5.1 Captación intracelular de rodamina 123

La Figura 15 ilustra el efecto de la mururoidina V (**1**) en la captación intracelular de rodamina 123 (Rh123) en la línea parental MCF-7 y en dos resistentes MCF-7/Vin. De esta forma, se determinó el tiempo de acumulación máximo de 30 min donde se observó la mayor captación de Rh123 en el interior de las células para el estímulo de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Es importante mencionar que no se aprecia claramente un aumento de la fluorescencia en el interior celular con respecto al tiempo debido a que las proteínas sintetizadas en la superficie celular son degradadas y resintetizadas, es decir, existe un recambio protéico y su tiempo de vida media va a depender de las necesidades del organismo y la composición de los aminoácidos que la forman, además del daño que puedan sufrir ya sea por un defecto en la traducción o por algún agente tóxico o xenobiótico en la célula.⁶⁶

Para la purgina II (**34**), las curvas de captación intracelular de Rh123 muestran una tendencia lineal en aumento con respecto al tiempo. Se decidió considerar al tiempo de 120 min como el de la máxima captación de Rh123 según se ilustra en la Figura 16. Esta diferencia en los tiempos de captación entre la mururoidina V (**1**) y la purgina II (**34**) se debe posiblemente a que la velocidad de unión de la mururoidina V (**1**) con la glicoproteína sea más rápida que la unión con la purgina II (**34**) como una consecuencia de las diferencias estructurales que existen entre ambos glicolípidos. También, se puede observar

que en el caso del compuesto **34** aunque hay un aumento de la captación con respecto al tiempo, proporcionalmente la acumulación de Rh123 es menor que la observada para **1**.

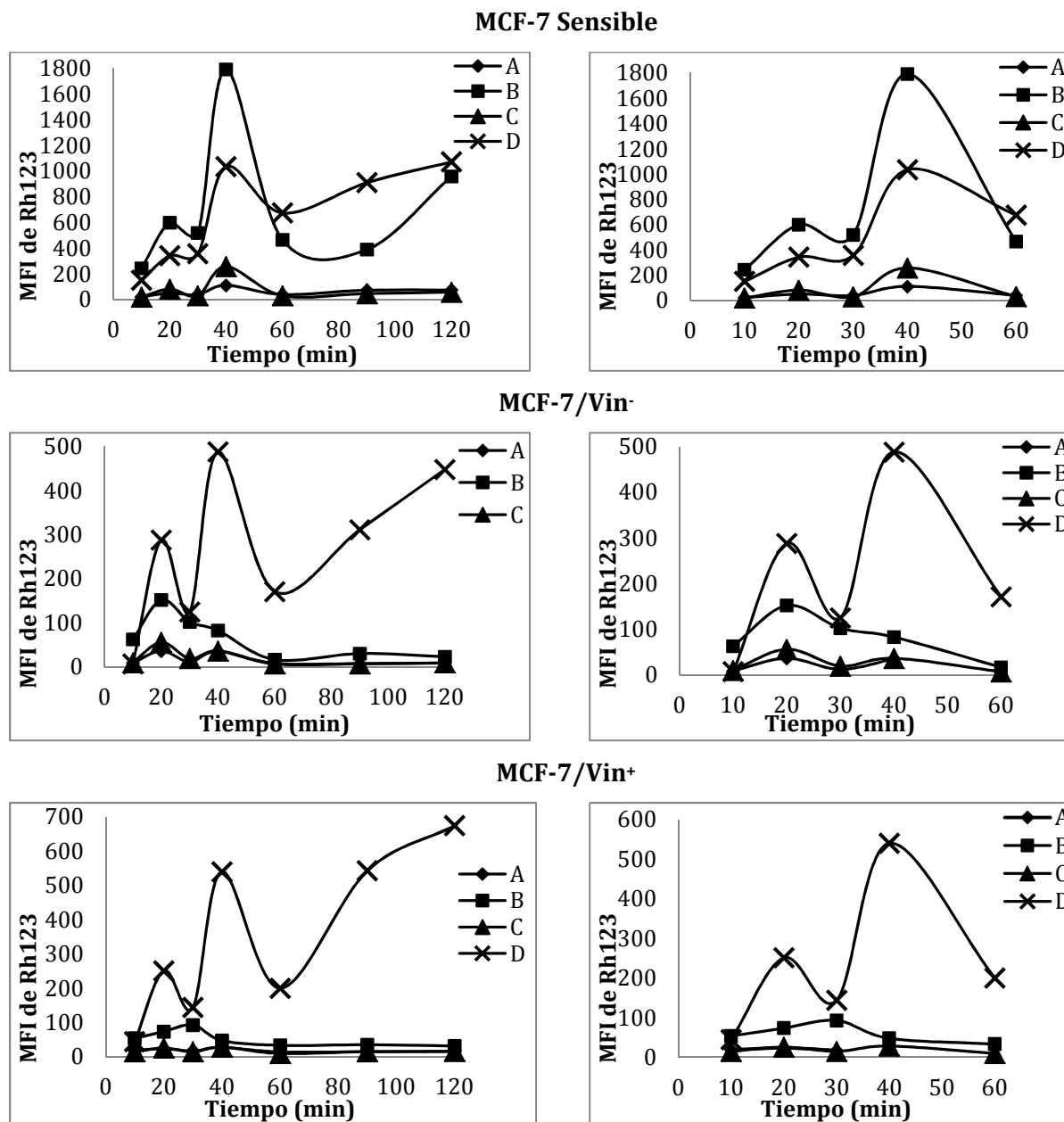


Figura 15. Efecto de la murucoidina V en la captación intracelular de Rh123 en la línea parental MCF-7 y en las dos resistentes MCF-7/Vin. A: Sin tratamiento como control negativo, B: 25 µg/mL de murucoidina V, C: 5 µg/mL de murucoidina V y D: 5 µg/mL de reserpina en todos los casos. Cada punto representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

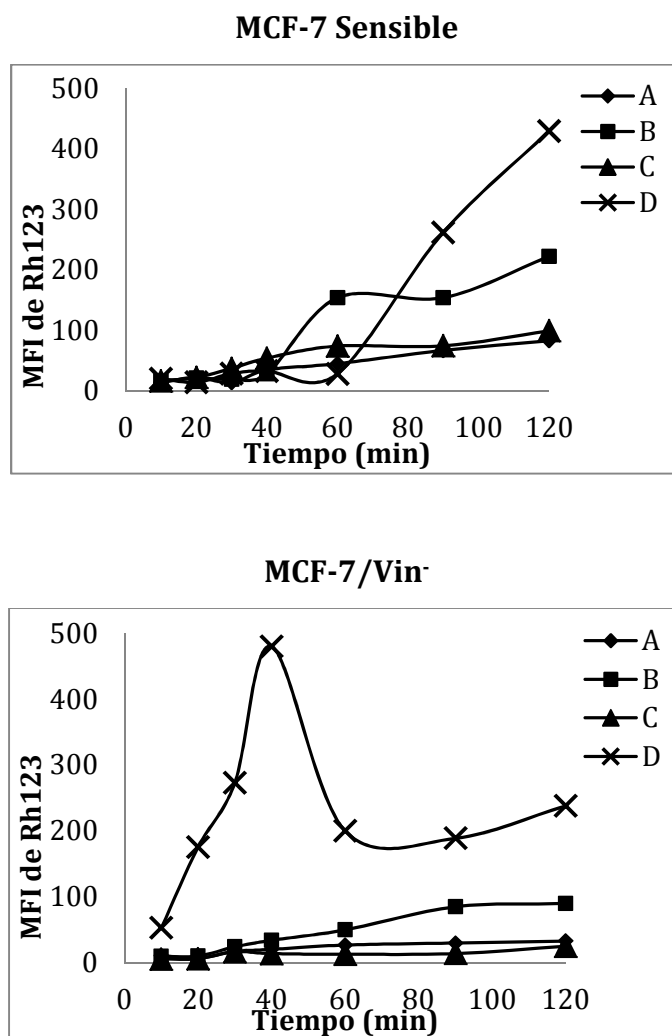


Figura 16. Efecto de la purgina II en la captación intracelular de Rh123 en la línea parental MCF-7 y en las células resistentes MCF-7/Vin^r. A: Sin tratamiento como control negativo, B: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de purgina II, C: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de purgina II y D: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de reserpina en todos los casos. Cada punto representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

6.5.2 Acumulación intracelular de rodamina 123

Una vez determinado el tiempo de acumulación máxima de Rh123 en presencia de murucoidina V (**1**) para todas las líneas celulares, se obtuvo la Figura 17 donde se puede observar, como se esperaba para el fenotipo MDR, que la acumulación de rodamina a los 30 min en las células MCF-7/Vin preincubadas con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue menor a la tercera parte que la registrada para la línea sensible. Esta acumulación fue comparable a la observada para la reserpina que se utilizó como un control positivo de inhibición de la glicoproteína P.

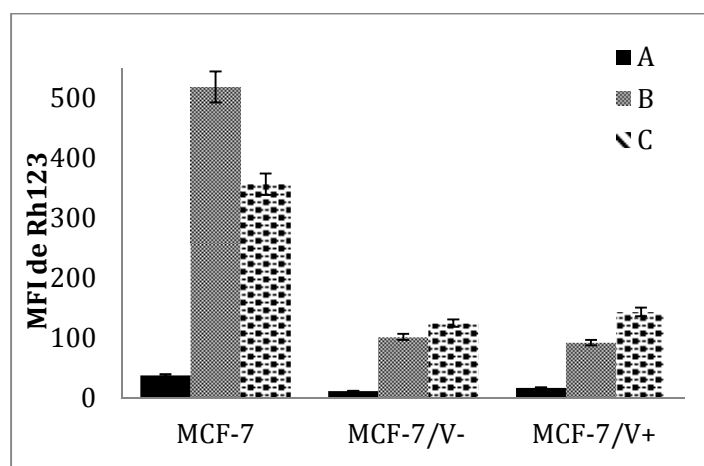


Figura 17. Efectos de la murucoidina V (**1**) en la acumulación de rodamina 123 en las células MCF-7 sensibles y en las MCF-7/Vin resistentes. Las células fueron pretratadas respectivamente con: A: sin tratamiento, B: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **1**, C: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de reserpina. Cada barra representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

Para la acumulación de Rh123 en presencia de purgina II (Figura 18), se puede observar que en las líneas resistentes corresponde a un tercio de la acumulación presentada para la sensible; sin embargo, en presencia de glicolípido, esta acumulación se

ve aumentada casi al doble para la línea MCF-7/Vin⁻ en contraste con la observada para las células MCF-7/Vin⁺. En los tres casos, esta acumulación para el control positivo se vio aumentada en forma considerable debido, posiblemente, a la diferencia estructural y el modo de unión a las glicoproteína P existentes entre la purgina II (dímero tipo éster de un pentasacárido) y la reserpina (alcaloide indólico).

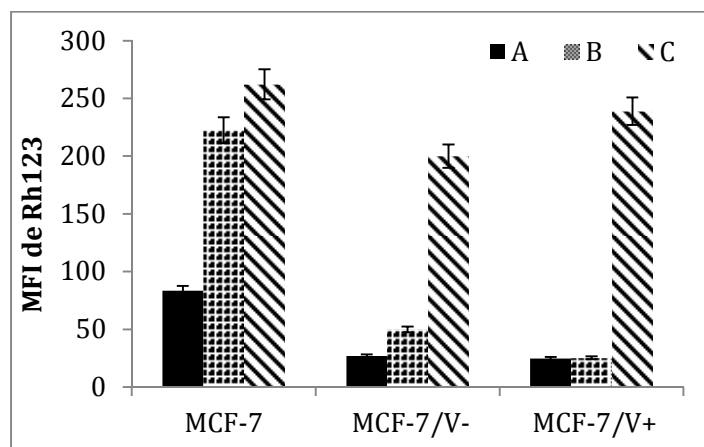


Figure 18. Efectos de la purgina II (**34**) en la acumulación de rodamina 123 en las células MCF-7 sensibles y en las MCF-7/Vin resistentes. Las células fueron pretratadas respectivamente con: A: sin tratamiento, B: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **34**, C: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de reserpina. Cada barra representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

6.5.3 Ensayos de Eflujo y Persistencia de la Rodamina 123

En el experimento de eflujo para la murucoidina V (Figura 19), se observó un rápido descenso de los niveles intracelulares de rodamina 123 en la línea MCF-7/Vin. Sin embargo, en presencia del glicolípido, este descenso fue suprimido casi de la misma manera que con el control positivo. La inhibición continuó por más de 90 min incluso después de que se removió el compuesto de prueba del medio (Figura 20), permitiendo especular que el

efecto inhibitorio del glicolípido sobre la función de la glicoproteína P fue reversible e incluso con una duración mayor que el desarrollado por el control positivo.

Para el eflujo con purgina II (34), como se muestra en la Figura 21, hay una rápida disminución de los niveles intracelulares de rodamina para las células MCF-7/Vin después de la incubación de las células en medio libre de glicolípido. Sin embargo, el eflujo de rodamina fue suprimido en presencia de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este compuesto de prueba para la línea MCF-7/Vin, indicando que la actividad de transporte hacia el exterior de la célula fue inhibida. Después de remover el compuesto de prueba del medio y transcurrido un periodo de 90 min (Figura 22), se observó que el efecto inhibitorio del glicolípido sobre la función de la glicoproteína P fue reversible. Estos ensayos de eflujo y persistencia sirvieron para sustentar el hecho de que las resinas glicosídicas tienen un efecto inhibitorio de la Gp-P, devolviendo así la sensibilidad de las células tumorales resistentes a la vinblastina, con la ventaja de que no son tóxicos, a diferencia de algunos otros productos de origen natural como la misma reserpina retirada de la clínica por ser neurotóxica⁶⁷ y utilizada en esta investigación como control positivo pues es un conocido inhibidor de las bombas de eflujo.

La inhibición de transporte hacia el exterior de la célula mediada por diversos productos naturales como las ciclosporinas,⁷ flavonoles,⁸ polímeros naturales y sintéticos,⁶⁸ así como algunas melbicinas⁶⁴ reportadas previamente, mostraron que una manera sencilla de identificar aquellos productos que puedan ser sustatos de la Gp-P y así puedan inhibir su función es mediante estos ensayos de eflujo y persistencia por medio de citometría de flujo. De esta manera, se encontró que los compuestos **1** y **34**, son moduladores de esta

glicoproteína disminuyendo el eflujo hacia el exterior de la célula, además de que esta inhibición sobre la función de la Gp-p mostró ser de manera reversible en ambos casos.

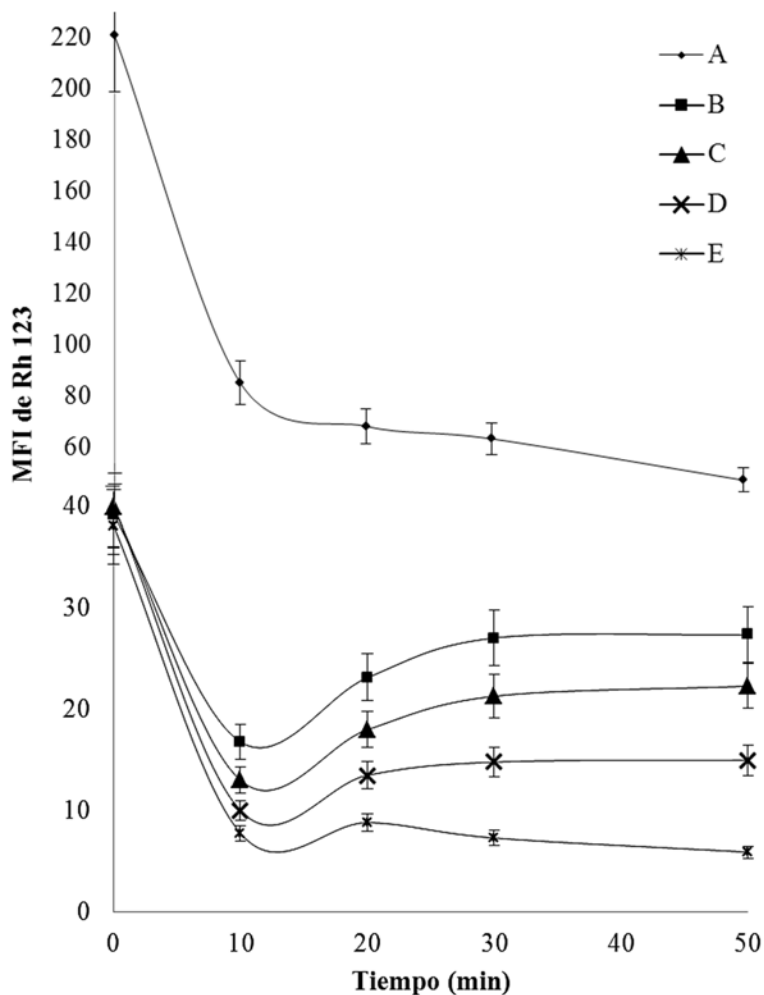


Figura 19. Efecto de la muruoidina V (**1**) en el ensayo de eflujo de Rh123 en las células MCF-7 sensibles y las MCF-7/Vin⁺ resistentes. A: MCF-7 sensibles sin tratamiento, B: MCF-7/Vin⁺ con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de reserpina, C: MCF-7/Vin⁺ con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **1**, D: MCF-7/Vin⁻ con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of **1** y E: MCF-7/Vin⁺ sin tratamiento como control negativo. Cada punto representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

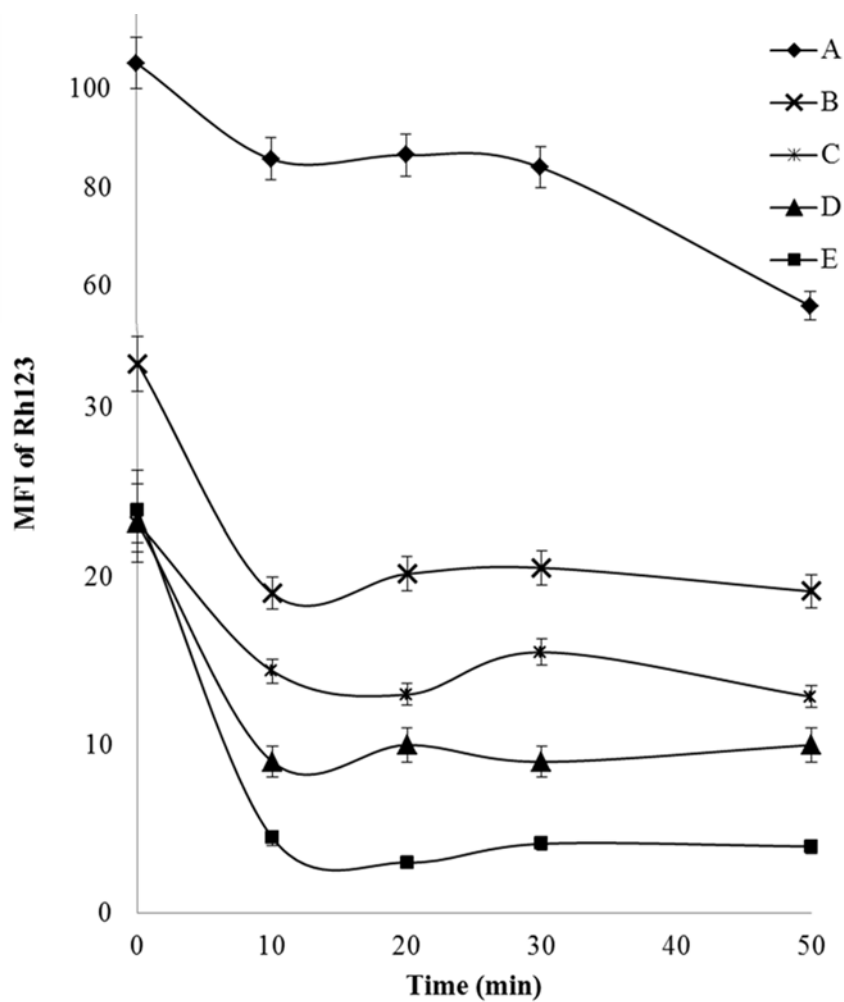


Figure 21. Efecto de la purgina II (**34**) en el ensayo de eflujo de Rh123 en las células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin resistentes. A: MCF-7 sensibles sin tratamiento, B: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **34** en MCF-7/Vin- C: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de reserpina en MCF-7/Vin⁺, D: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **34** en MCF-7/Vin⁺ y E: MCF-7/Vin⁺ sin tratamiento como control negativo. Cada punto representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

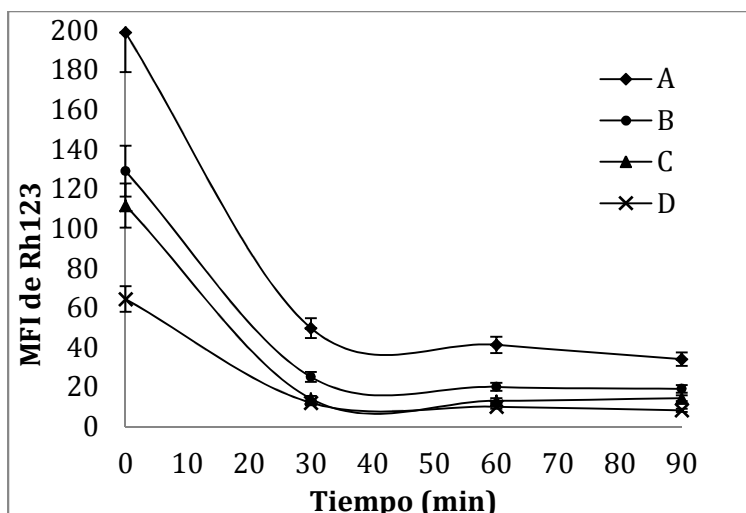


Figura 20. Efecto de la murucoidina V (**1**) en la persistencia de la actividad en células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin resistentes. A: 25 µg/mL de **1** en MCF-7/Vin+, B: 5 µg/mL de reserpina en MCF-7/Vin+, C: 25 µg/mL de **1** en MCF-7/Vin- y D: MCF-7 sensibles sin tratamiento como control negativo. Cada punto representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

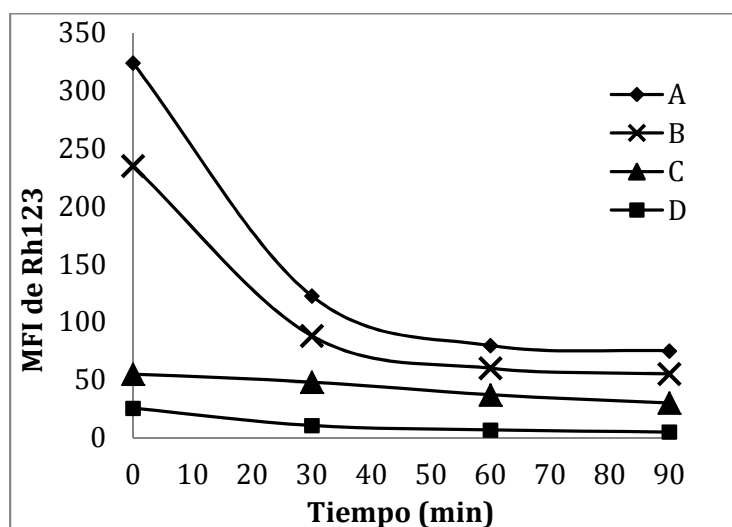


Figura 22. Efecto de la Purgina II (**34**) en la persistencia de la actividad en células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin resistentes. A: MCF-7 sensibles sin tratamiento como control negativo, B: 5 µg/mL de reserpina en MCF-7/Vin+, C: 25 µg/mL de **34** en MCF-7/Vin+ y D: 25 µg/mL de **34** en MCF-7/Vin-. Cada punto representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

6.6 Expresión de la glicoproteína P

La disminución en la expresión de la glicoproteína P por la muruoidina V (1) fue detectada por inmunofluorescencia y medida por citometría de flujo después de incubar con un anticuerpo monoclonal anti-Gp-P. La intensidad de fluorescencia obtenida para la línea MCF-7 sensible se utilizó como blanco. En estos experimentos, la expresión de la Gp-P se entiende como una reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo entre la glicoproteína expresada en las membranas celulares con su anticuerpo específico y, por lo tanto, la disminución de la fluorescencia será un reflejo de la inhibición de esta interacción debida a los cambios conformacionales inducidos por los glicolípidos de prueba como posibles sustratos de la bomba de eflujo.⁶⁹ Bajo este contexto, se utilizó el anticuerpo UIC2 que es específico para una conformación sensible al epítoto extracelular de la Gp-P, de esta forma, la línea MCF-7/Vin⁺ mostró una gran intensidad en la fluorescencia que corresponde a la expresión de la glicoproteína P en grandes cantidades en estas células resistentes. Después de 30 minutos de incubación con el compuesto 1 a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el nivel de expresión de la glicoproteína disminuyó en un 30% con respecto a las células MCF-7/Vin⁺ sin tratamiento (Figura 23-C). Este porcentaje es significativo al compararse con el 38% obtenido con la reserpina como control positivo a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 23-E) mientras que a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ prácticamente no se observó una disminución (Figura 23-D).

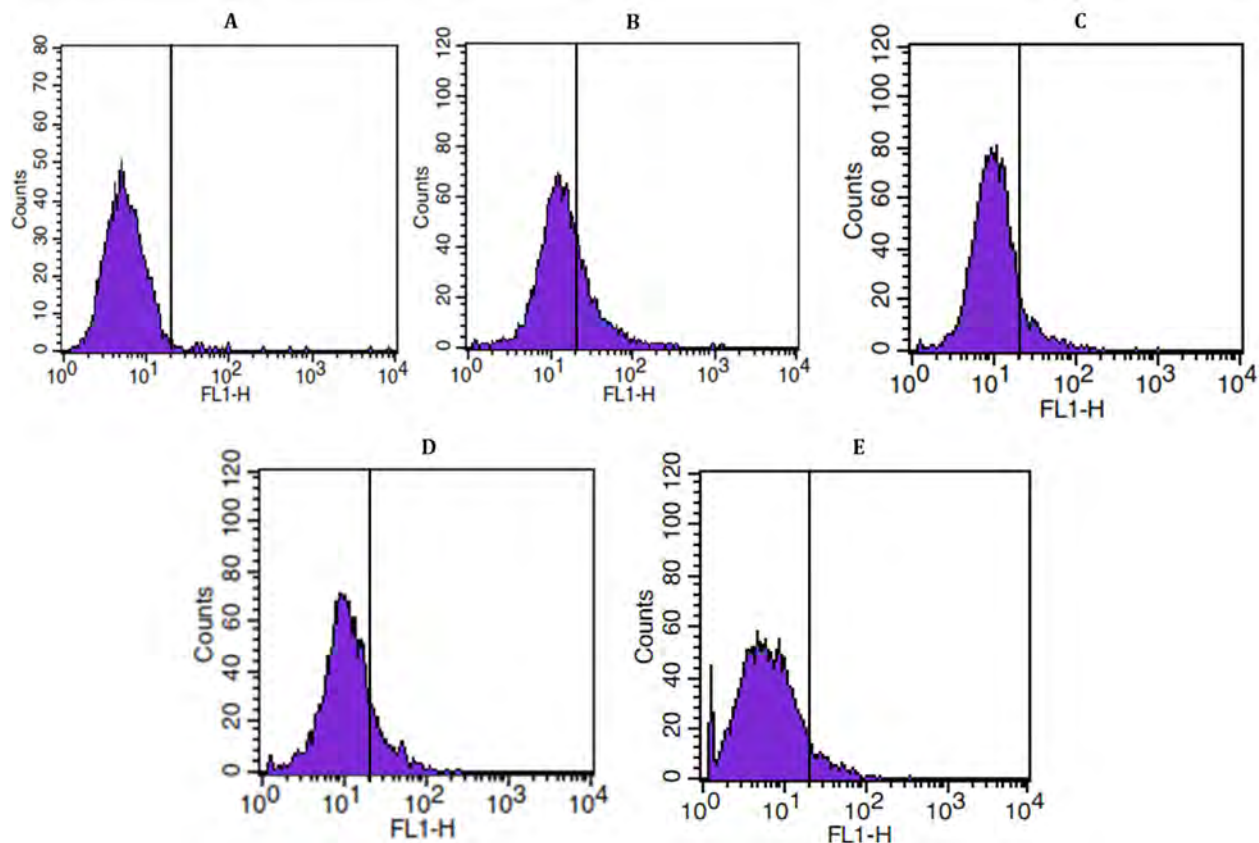


Figura 23. Expresión de la glicoproteína P mediada por la muruoidina V (**1**) en las células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin⁺ resistentes. A: MCF-7 sin tratamiento; B: MCF-7/Vin⁺ sin tratamiento; C: MCF-7/Vin⁺ tratadas con 25 µg/mL de **1**, D: MCF-7/Vin⁺ tratadas con 5 µg/mL de **1** y E: MCF-7/Vin⁺ tratadas con 5 µg/mL de reserpina. El porcentaje de área a la derecha indica la cantidad relativa de glicoproteína expresada en la superficie de las células.

Al igual que con la muruoidina V (**1**), la disminución en la expresión de la glicoproteína P mediada con purgina II (**34**) fue detectada por inmunofluorescencia y medida por citometría de flujo después de incubar con el mismo anticuerpo monoclonal anti-Gp-P. La intensidad de fluorescencia obtenida para la línea MCF-7 sensible también se utilizó como blanco. La línea MCF-7/Vin⁺ mostró una mayor fluorescencia que corresponde a la expresión de la glicoproteína P. Sin embargo, después de 30 minutos de incubación con el compuesto **34** a una concentración de 25 y 5 µg/mg como con la reserpina a 5 µg/mg, el

nivel de expresión de la glicoproteína aumentó a más del doble con respecto a las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin⁺ sin tratamiento (Figura 24). Este incremento es bastante significativo pues se esperaba como en el caso de la muruoidina V (**1**) una disminución en la expresión de la Gp-P. Estos resultados son interesantes desde el punto de vista estructural entre los glicolípidos, pues con respecto a las líneas celulares, todos los ensayos y procedimientos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales dando resultados opuestos. Podría pensarse que la Gp-P expresada a nivel membranal es una proteína que se somete a endocitosis y se recicla entre el citoplasma y la membrana plasmática.⁶⁶ Por lo tanto, una hipótesis de esta inhibición del eflujo (inhibición de Gp-P) pero con un aumento en la expresión de la Gp-P reconocida por el anticuerpo en la superficie de membrana (Figura 24) puede ser que bajo las condiciones experimentales el tránsito vesicular se vea afectado, además apoyando el conocimiento de que existen otros mecanismos de resistencia e inhibición involucrados.

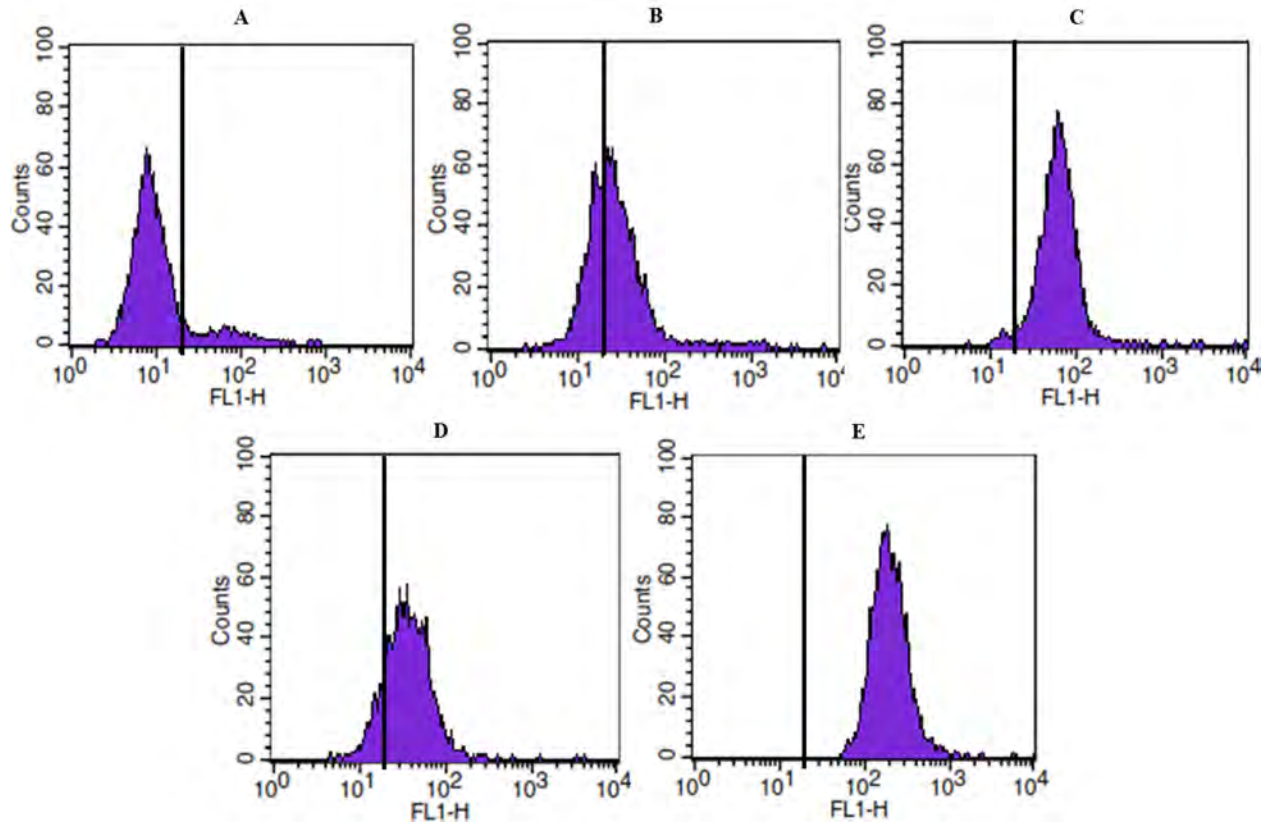


Figura 24. Expresión de la glicoproteína P mediada por la purgina II (34) en las células MCF-7 sensibles y MCF-7/Vin⁺ resistentes. A: MCF-7 sin tratamiento; B: MCF-7/Vin⁺ sin tratamiento; C: MCF-7/Vin⁺ tratadas con 25 µg/mL de purgina II, D: MCF-7/Vin⁺ tratadas con 5 µg/mL de purgina II y E: MCF-7/Vin⁺ tratadas con 5 µg/mL de reserpina. El porcentaje de área a la derecha indica la cantidad relativa de glicoproteína expresada en la superficie de las células.

7 CONCLUSIONES

- I. Se seleccionaron las líneas celulares resistentes al agente antitumoral vinblastina (MCF-7/Vin) a partir de la línea parental MCF-7. Se realizó la evaluación de la actividad citotóxica y moduladora de treinta y cinco resinas glicosídicas de la familia de las convolvuláceas sobre estas líneas celulares, permitiendo la identificación de algunos de estos compuestos, en especial la murucoidina V y la purgina II como una nueva clase de agentes no tóxicos moduladores de la Gp-P.

- II. Se demostró mediante experimentos de inmunofluorescencia que la murucoidina V (1) y la purgina II (34) son sustratos de la Gp-P y, por lo tanto, moduladores del transporte transmembranal de los agentes antineoplásicos revirtiendo así el fenómeno de la resistencia a fármacos en células humanas aisladas de cáncer de mama. Este tipo de productos naturales representan una clase prometedora de novedosos prototipos más seguros y eficaces para la inhibición de las bombas de eflujo y así vencer la resistencia adquirida a los agentes antineoplásicos de uso común en la clínica, disminuyendo sus dosis terapéuticas efectivas y, por lo tanto, los efectos tóxicos indeseables.

- III. Estos resultados también indican 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.

8 REFERENCIAS

- (1) Krishan, A.; Arya, P.; *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2002**, *16*, 357-372.
- (2) Gottesman M. M. *Annu. Rev. Med.* **2002**; *53*: 615-627.
- (3) Gottesman, M. M. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 747-754.
- (4) Goldstein, L. J.; Galski, H.; Fojo, A.; Willingham, M.; Lai, S. L.; Gazdar, A.; Pirker, R.; Green, A.; Crist, W.; Brodeur, G. M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 116-124.
- (5) Borst, P.; Elferink, O. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 537-592.
- (6) Xiao-Fang, C.; Nakajima, Y.; Sumizawa, T.; Ikeda, R.; Xiao-Qin, R.; Chun-Lei, Zheng.; Mukai, M.; Furukawa, T.; Haraguchi, M.; Gao, H.; Sugimoto, Y.; Akiyama, S. *Cancer Lett.* **2002**, *187*, 111-119.
- (7) Zhou, S.; Yong, L.; Chowbay, B. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36*, 57-104.
- (8) Phang, J. M.; Poore, M.; Lopaczynska, J.; Yeh, G. C. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5977-5981.
- (9) Jodoin, J.; Demeule, M.; Béliveau, R. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1542*, 149-159.
- (10) Kong, X.; Haitao, G.; Chen, L.; Liu, Z.; Yin, Z.; Li, P.; Li, M. *Toxicol. In Vitro.* **2009**, *23*, 634-639.
- (11) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Motti, R.; Simon, P. N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 988-992.
- (12) Silva, G. L.; Cui, B.; Chávez, D.; You, M.; Hee-Byung, C.; Rasoanaivo, P.; Lynn, S. M.; O'Neill, M. J.; Lewis, J. A.; Besterman, J. M.; Monks, A.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1514-1520.
- (13) Beck, W. T.; Cirtain, M. C.; Glover, C. J.; Felsted, R. L.; Safa, A. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 959-966.
- (14) Shin, S. Y.; Choi, B. H.; Kim, J. R.; Kim, J. H.; Lee, Y. H.; *Eur. J. Pharm Sci.* **2006**, *28*, 300-306.
- (15) Wang, J. S.; Zhu, H. J.; Markowitz, J. S.; Donovan, J. L.; DeVane, C. L. *Psychopharmacology* **2006**, *187*, 415-423.
- (16) Zhang, S.; Morris, M. E. *J. Pharmacol. Exp.* **2003**, *304*, 1258-1267.
- (17) Pereda-Miranda, R.; Rosas-Ramírez, D.; Castañeda-Gómez, J. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer-Verlag: New York, 2010; Vol. 92, Chapter 2, pp 77-152.

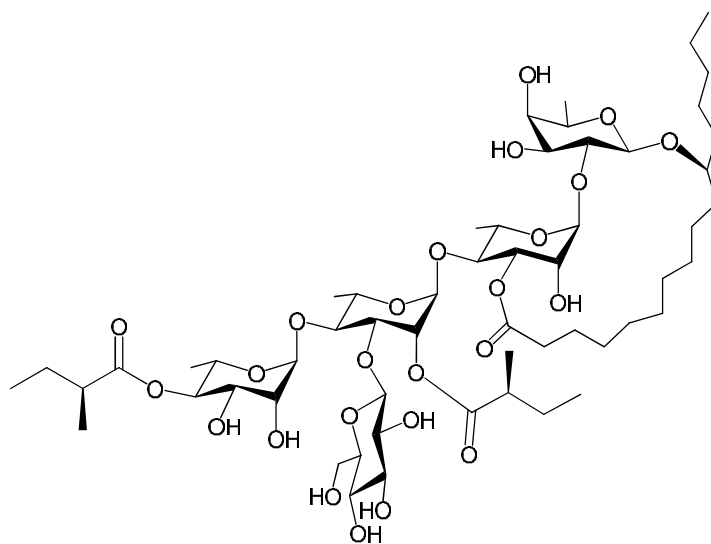
-
- (18) Pereda-Miranda, R.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 406-409.
- (19) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Jacobo-Herrera N.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1037-1045.
- (20) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Gibbons, S. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 222-227.
- (21) Escobedo-Martínez, C.; Cruz-Morales, S.; Fragoso-Serrano, M.; Rahman, M. M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1796-1801.
- (22) Corona-Castañeda, B.; Pereda-Miranda R. *Planta Med.* **2011**, *78*, 128-131.
- (23) Bosch, I.; Croop, J. M. *Cytotechnology* **1998**, *27*, 1-30.
- (24) Janice Gabriel. *The Biology of Cancer*; Jhon Wiley & Sons, Ltd: England, 2007; 2nd Edition, pp 3, 4, 7-9, 115.
- (25) Bradbury, R. H. *Cancer*; Springer-Verlag, Berlin, 2007; Vol. 01, pp 2.
- (26) Brait, M.; Sidransky, D. *Toxicol. Mech. Methods.* **2011**, *21*, 275-288.
- (27) Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Farmacología*; Elsevier: España, 2004; 5a Edición, pp 694.
- (28) Organización Mundial de la Salud. *Cáncer.* 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> Consultado el 19 de septiembre de 2012.
- (29) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Día Mundial contra el Cáncer*; Aguascalientes, 2012. Consultado el 19 de septiembre de 2012.
- (30) National Cancer Institute. *Chemotherapy and You*; USA, www.cancer.gov. Consultado el 19 de septiembre de 2012.
- (31) Katzung, B. G. *Basic and Clinical Pharmacology*; Mc. Graw Hill-Lange, San Francisco, 2006; 10th Edition.
- (32) Ng, J. S. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **2011**, *17*, 209-224.
- (33) Afroz, A. M.; Naik, P. K. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2009**, *23*, 209-225.
- (34) Singla, A. K.; Garg, A.; Aggarwal, D. *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 179-192.
- (35) Pai, V. B.; Nahata, M. C. *Drug. Saf.* **2000**, *22*, 263-302.
- (36) Adams, G. P.; Weiner, L. M. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1147-1157.
- (37) Pastan, I.; Kreitman, R. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *31*, 53-88.
- (38) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335
- (39) Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1002-1037

- (40) Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Elsevier: USA; 2nd Edition, 2004 pp 1-3, 21.
- (41) Horton D. A., Bourne G. T., Smythe M. L. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 893-930.
- (42) (a) Da Rocha, A. B.; Lopes, R. M.; Schwartzmann, G. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, 1, 364-369. (b) Haefner, B. *Drug Discov. Today.* **2003**, 8(12), 536-544. (c) Pan, L.; Chai, H.; Kinghorn, A. D. *Phytochem. Lett.* **2010**, 3, 1-8.
- (43) Gottesman, M. M.; Ambudkar, S. V.; Ni, B.; Aran, J. M.; Sugimoto, Y.; Cardarelli, C. O.; Pastan, I. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1994**, 59, 677-683.
- (44) Sikic, B. I. In *The Molecular Basis of Cancer*; Mendelsohn.; Howley.; Israel.; Gray.; Thomson; Eds.; Saunders-Elsevier: Philadelphia, 2008; Chapter 49, pp 583-585.
- (45) Fernández, A. J.; Crombet, R. O.; Villares, A. I.; Pons, V. R. *Rev. Cubana Oncol.* **1998**, 14(2), 111-120.
- (46) Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. *Science*, **2009**, 323, 1718-1722.
- (47) Chen, L.; Li, Y.; Yu, H.; Zhang, L.; Hou, T. *Drug Discov. Today.* **2012**, 17, 343-351.
- (48) Bikadi, Z.; Hazai, I.; Malik, D.; Jemnitz, K.; Veres, Z.; Hari, P.; Ni, Z.; Loo, T. W.; Clarke, D. M.; Hazai, E.; Mao, Q. *PLoS ONE.* **2011**, 6(10): e25815. doi:10.1371/journal.pone.0025815
- (49) Borges-Walmsley, M. I.; McKeegan, K. S.; Walmsley, A. R. *Biochem. J.* **2003**, 376, 313-338.
- (50) (a) Emmart, E. W. *The Badianus Manuscript (Codex Barberini, Latin 241). An Aztec Herbal of 1552*; The Johns Hopkins Press: Baltimore, 1940; p 319. (b) Miranda, F.; Valdés, J. En *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*; Instituto Mexicano del Seguro Social: Ciudad de México, 1964; pp. 84-85.
- (51) Borges-Walmsley, M. I.; Walmsley, A. R. *Trends Microbiol.* **2001**, 9 (2), 71-79.
- (52) (a) Escalante-Sánchez, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1029-1034. (b) Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 3163-3168. (c) Escalante-Sánchez, E.; Rosas-Ramírez, D.; Linares, E.; Bye, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 9423-9428.
- (53) Bah, M.; Chérigo, L.; Cardoso, A.; Fragoso-Serrano, M.; Hammond, G. B.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1153-1157.
- (54) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 595-599.
- (55) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. *Tetrahedron* **2002**, 58, 3145-3154.

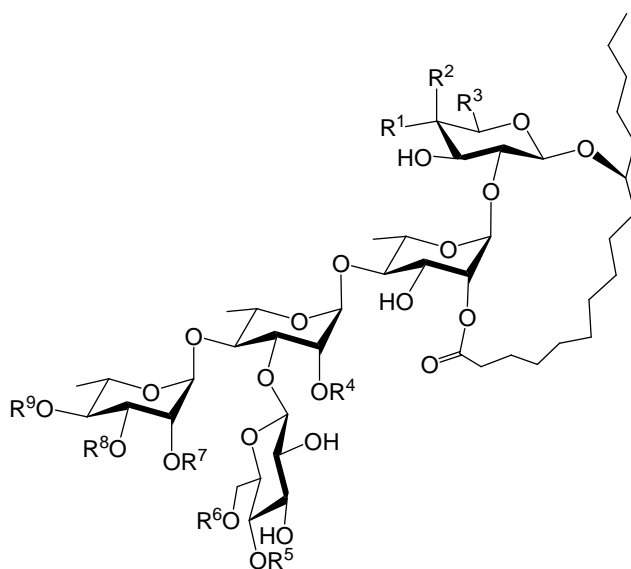
- (56) Pereda-Miranda, R.; Escalante-Sánchez, E.; Escobedo-Martínez, C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 226-230.
- (57) Escobedo-Martínez, C.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 974-978.
- (58) Castañeda-Gómez, J.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1148-1153.
- (59) Castañeda-Gómez, J.; *Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de Ipomoea purga*, Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, México, 2012.
- (60) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13063-13080.
- (61) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9007-9022.
- (62) (a) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116. (b) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112. (c) Angerhofer, C. K.; Guinaudeau, H.; Wongpanich, V.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 59-60.
- (63) Bian-Sheng, J.; Ling, H.; Guo-Qing, L. *Life Sci.* **2005**, *77*, 2221-2232.
- (64) Xiang, W.; Gao, A.; liang, H.; Li, C.; Gao, J.; Wang, Q.; Shuang, B.; Zhang, J.; Yan, Y.; Wang, X. *Toxicol. In Vitro.* **2010**, *24*, 1474-1481.
- (65) Gottesman, M. M. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 747-754.
- (66) Fu, D.; Arias, I. M. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44* (3), 461-464.
- (67) Markham, P. N.; Westhaus, E.; Klyachko, K.; Johnson, M. E.; Neyfakh, A. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2404-2408.
- (68) Werle, M. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (3), 500-511.
- (69) Ghosh, P.; Moitra, K.; Maki, N.; Dey, S.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *450* (1), 100-112.

9 APÉNDICES

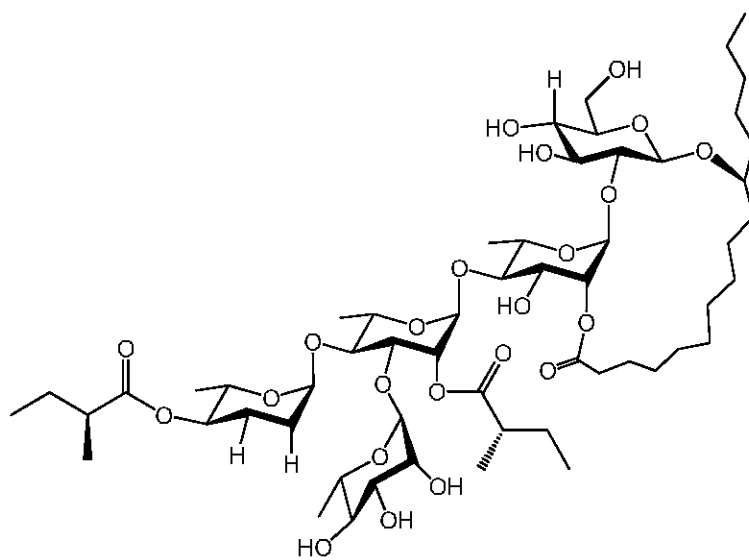
APÉNDICE 1: Estructuras Químicas de los compuestos evaluados.



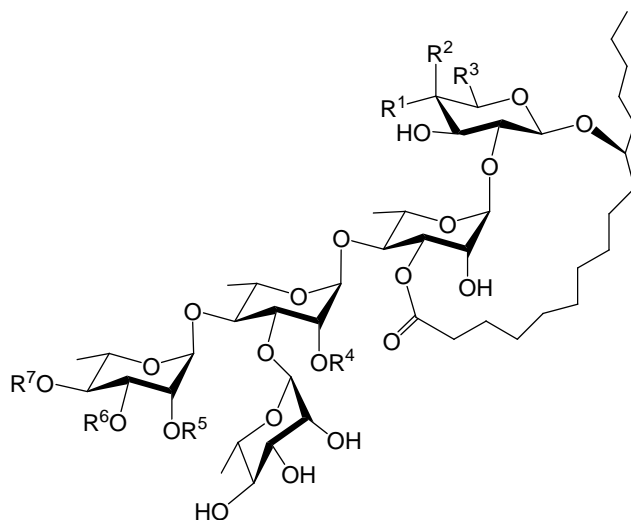
1



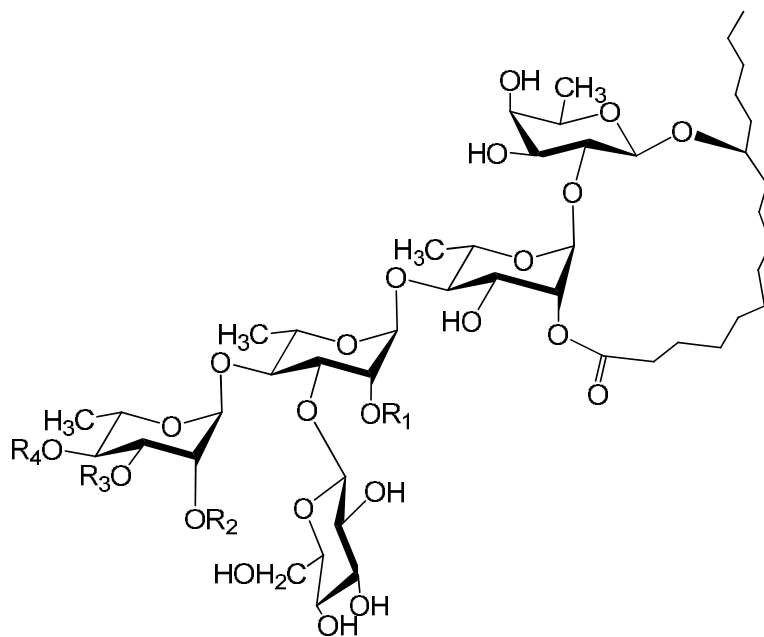
Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
2	H	OH	CH ₃	mba	H	H	H	H	mba
4	H	OH	CH ₃	mba	H	H	H	ca	mba
5	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	ca	(-)-(2R)-mba
6	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	ca	octa



3

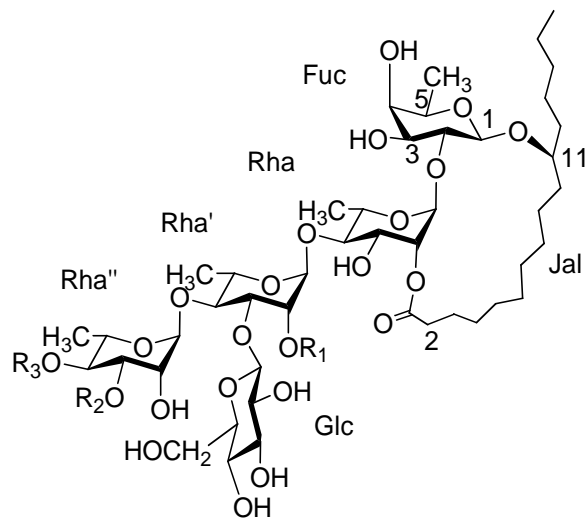


Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
7	OH	H	CH ₂ OH	mba	H	H	dodeca
8	H	OH	CH ₃	mba	H	H	dodeca
15	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	iba
16	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	mba
18	H	OH	CH ₃	iba	H	H	dodeca

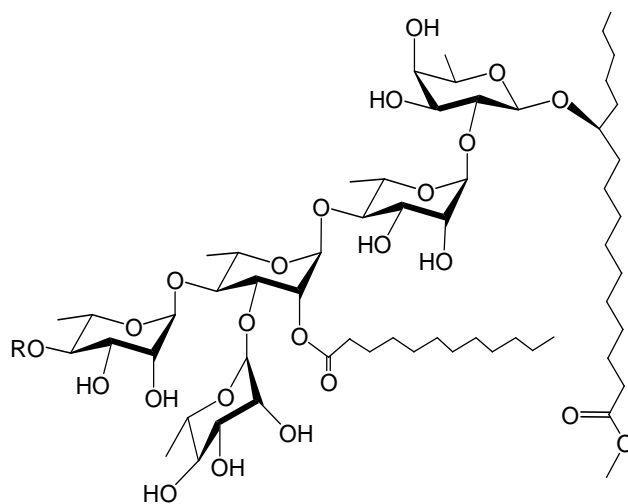


9 y 10

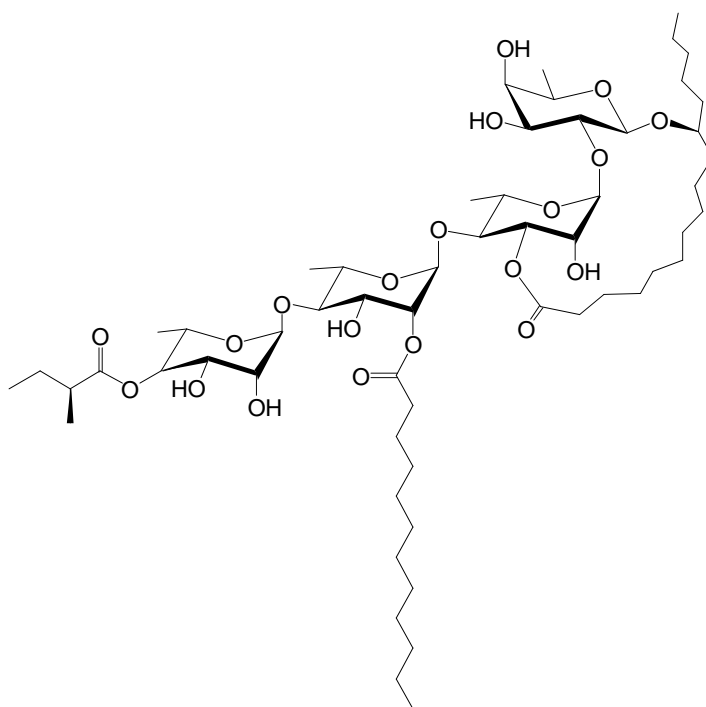
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
9	deca	Cna	H	Mba
10	deca	H	Cna	Hexa



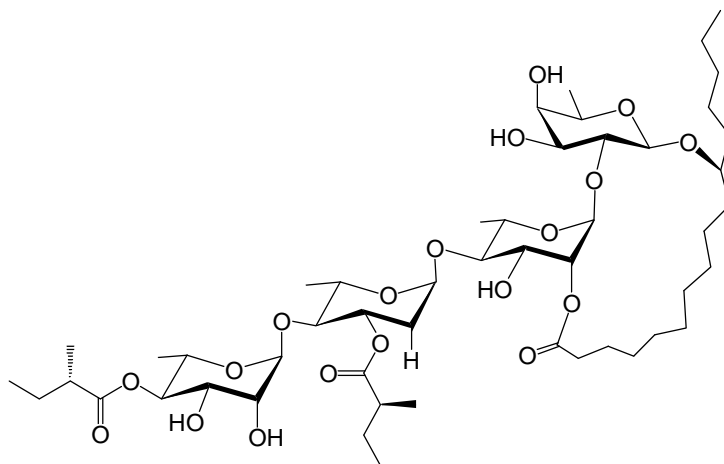
	R ₁	R ₂	R ₃
11	deca	hexa	Cna
12	deca	H	Hexa

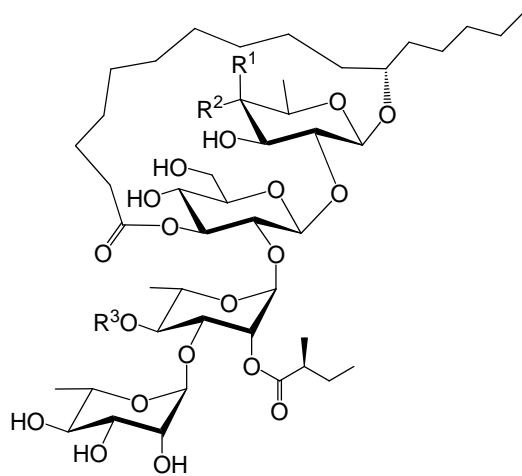


Compuesto	R
13	H
14	mba

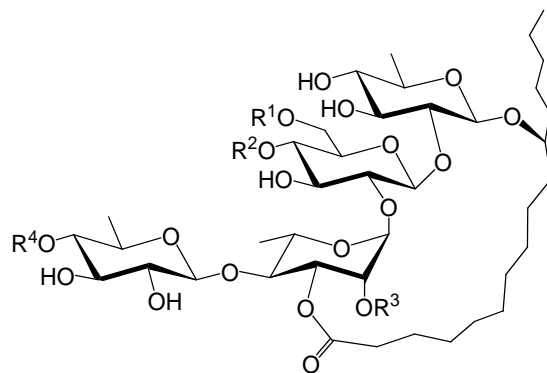


17

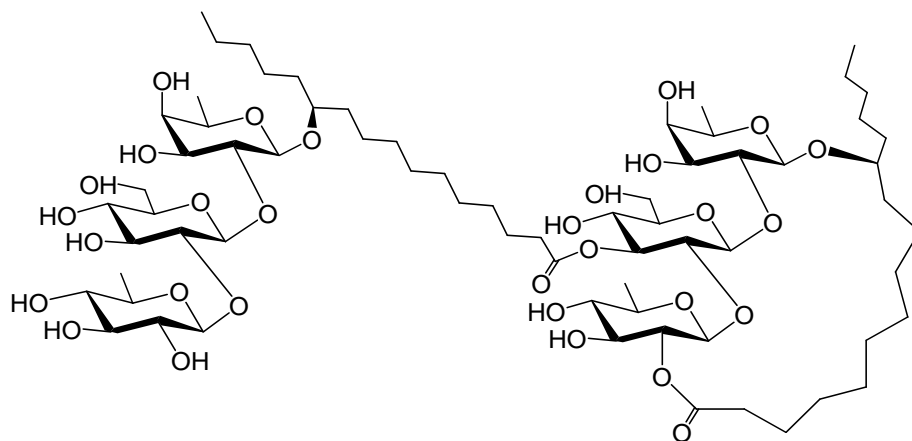
**19**



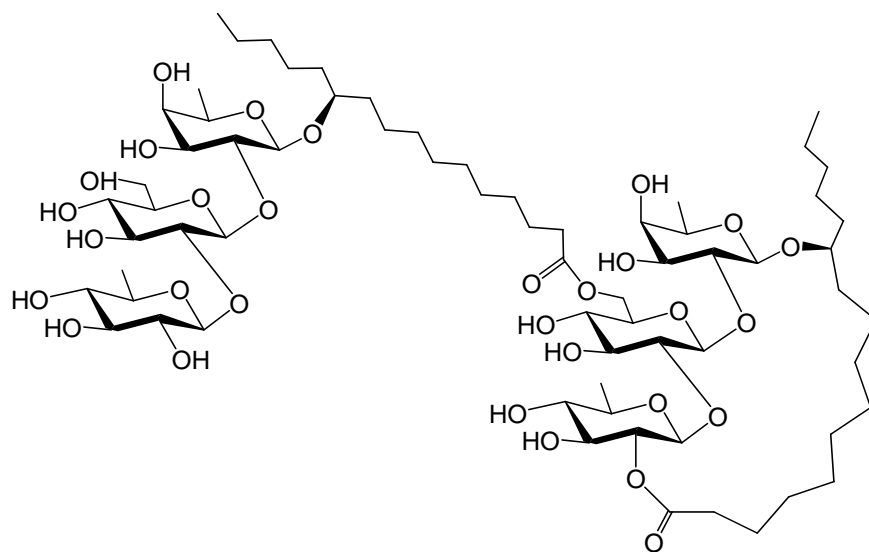
Compuesto	R ¹	R ²	R ³
20	OH	H	mba
21	H	OH	mba



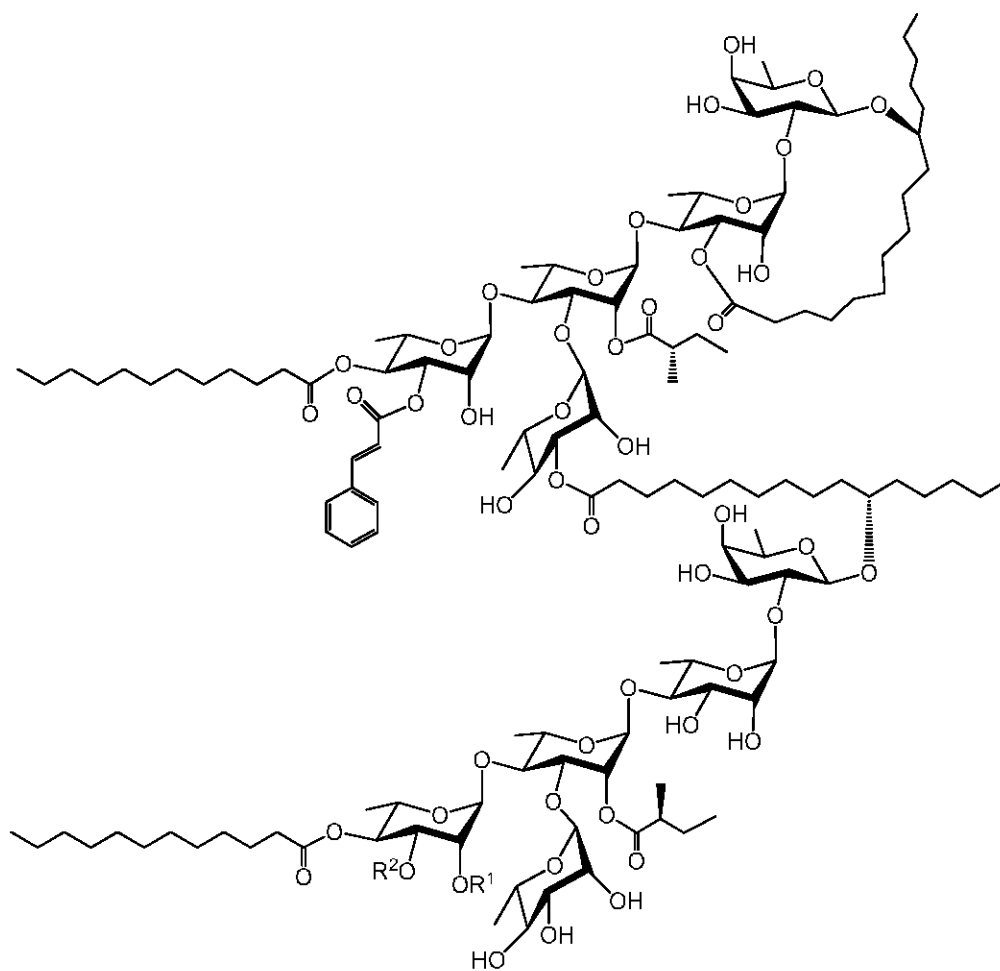
Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
22	H	iba	nla	tga
23	H	iba	(+)-nla	tga
24	H	mba	nla	tga
25	H	nla	mba	tga
26	H	(+)-nla	mba	tga
27	H	nla	mba	mba
28	H	(+)-nla	mba	mba



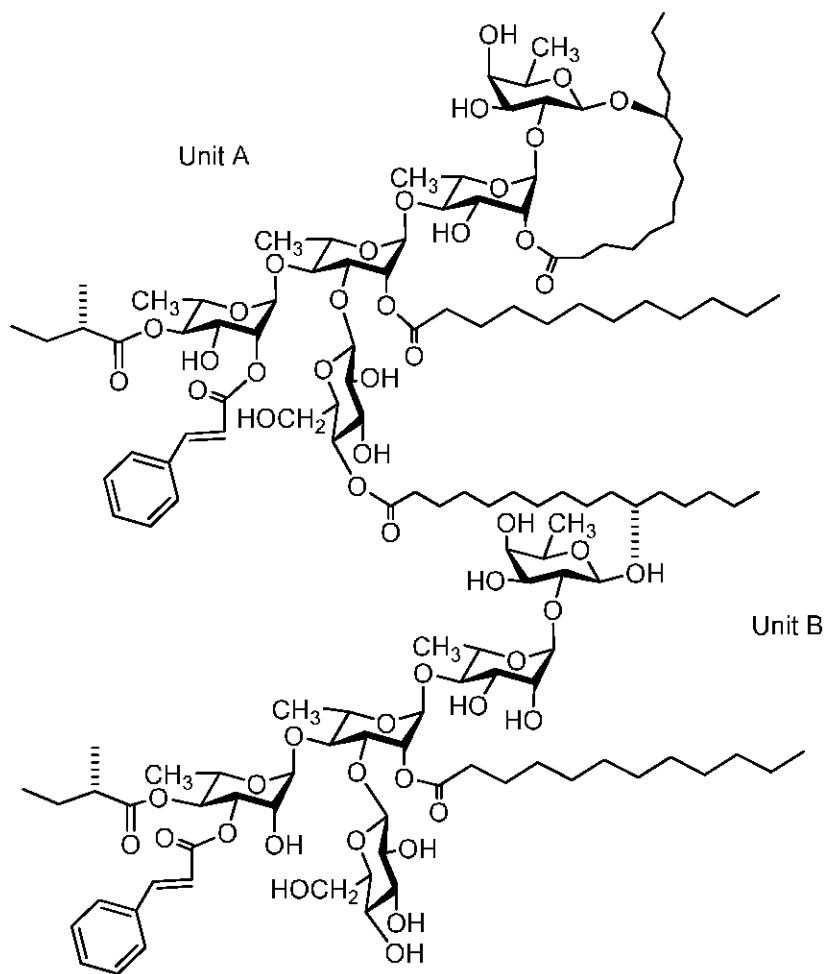
29



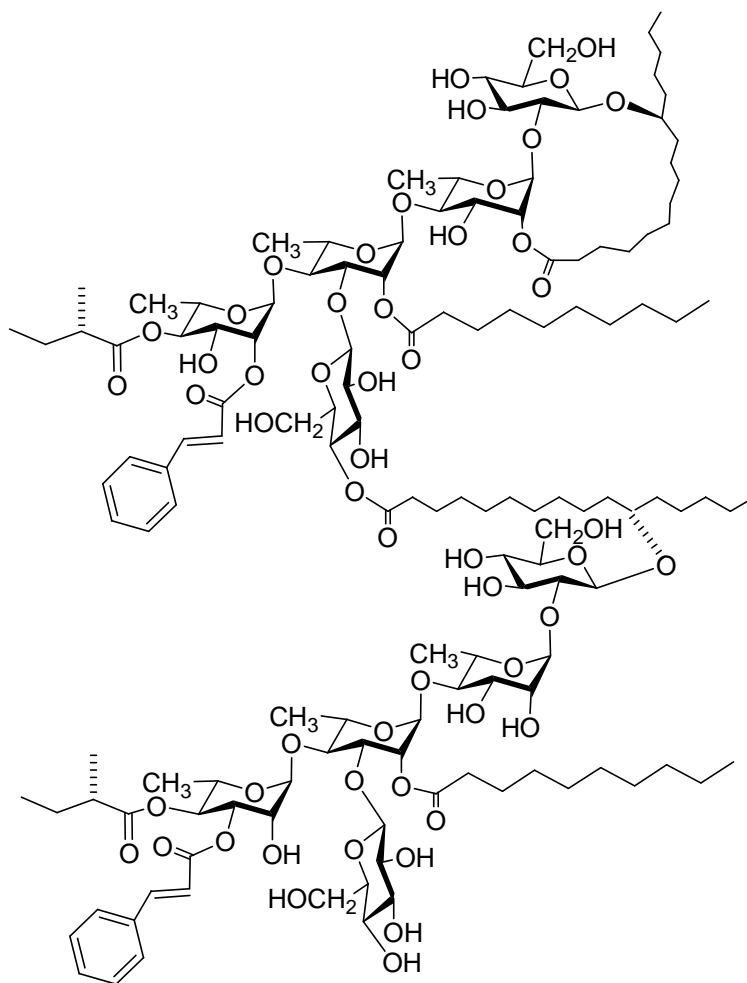
30



Compuesto	R ¹	R ²
31	ca	H
32	H	ca

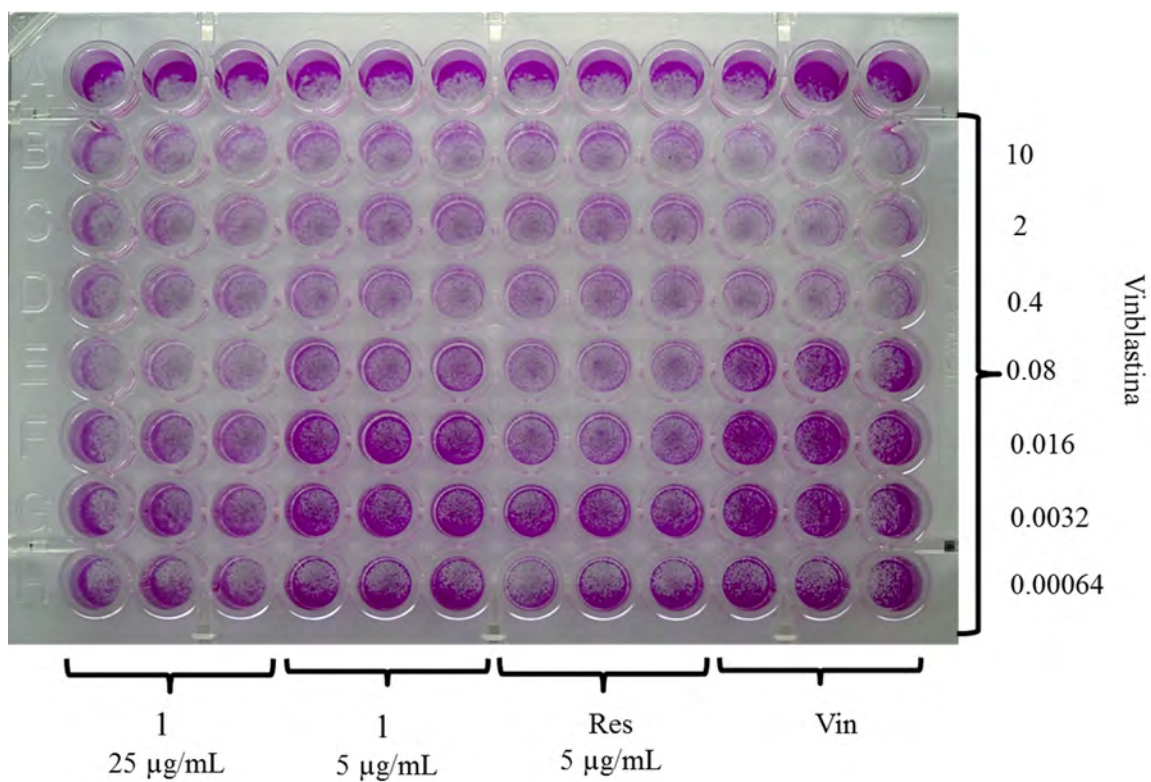


33

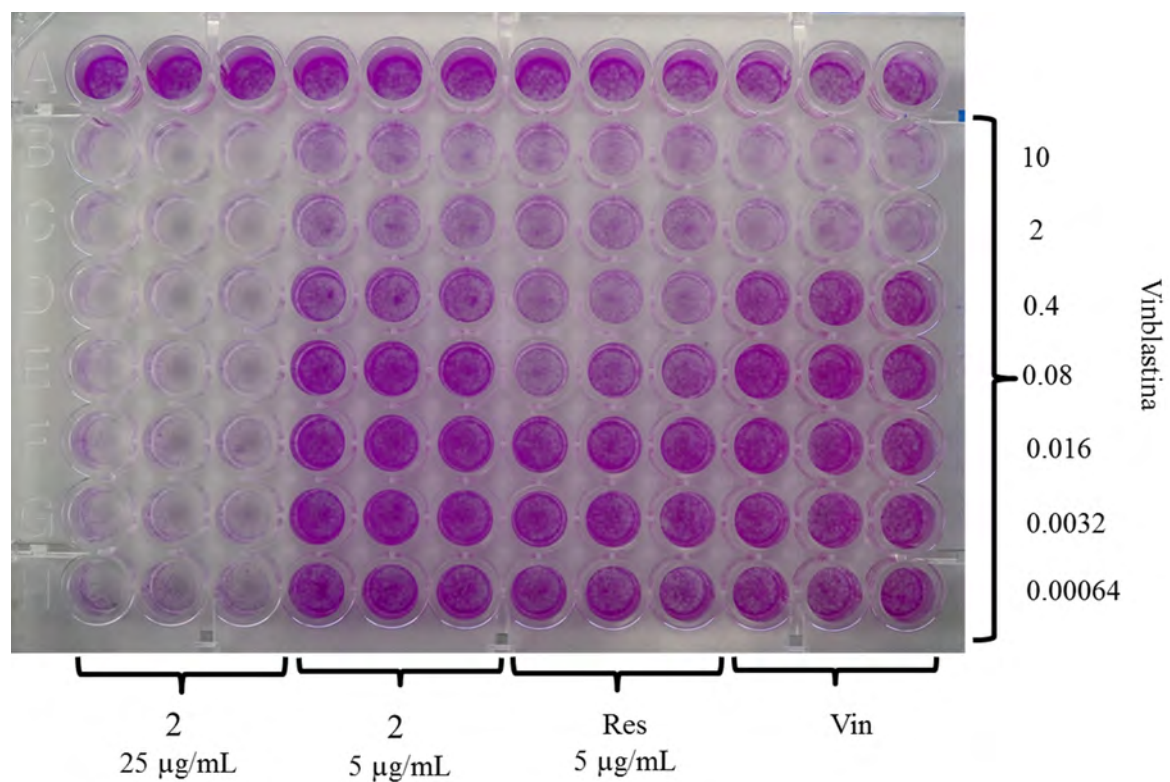


34

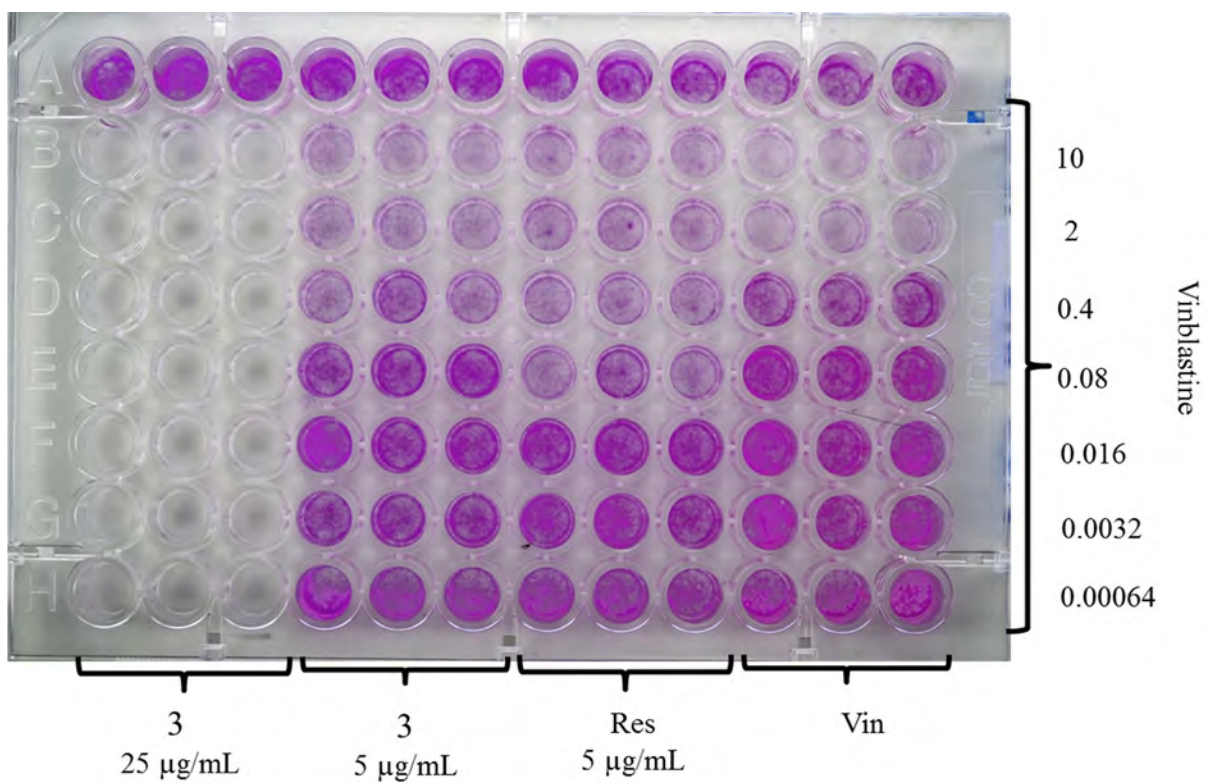
APÉNDICE 2: Ensayos de Modulación.



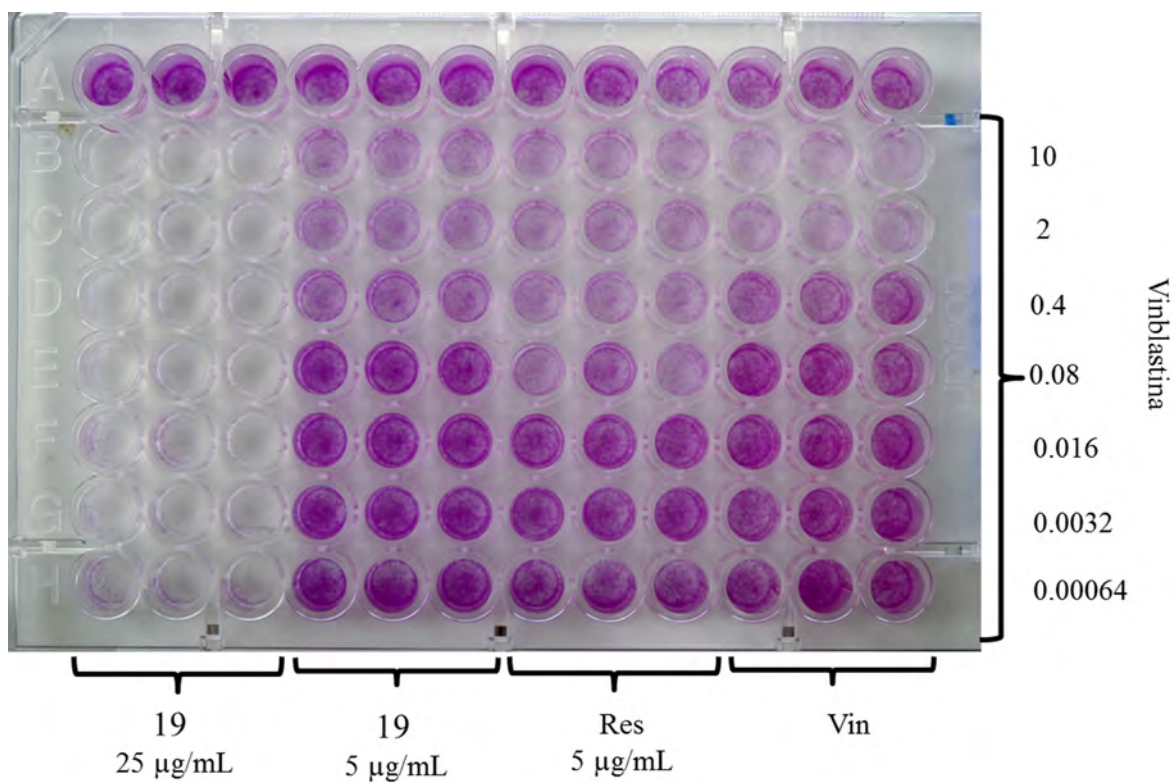
Ensayos de modulación de vinblastina con el compuesto **1** (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺. Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5 µg/mL); Vin, vinblastina.



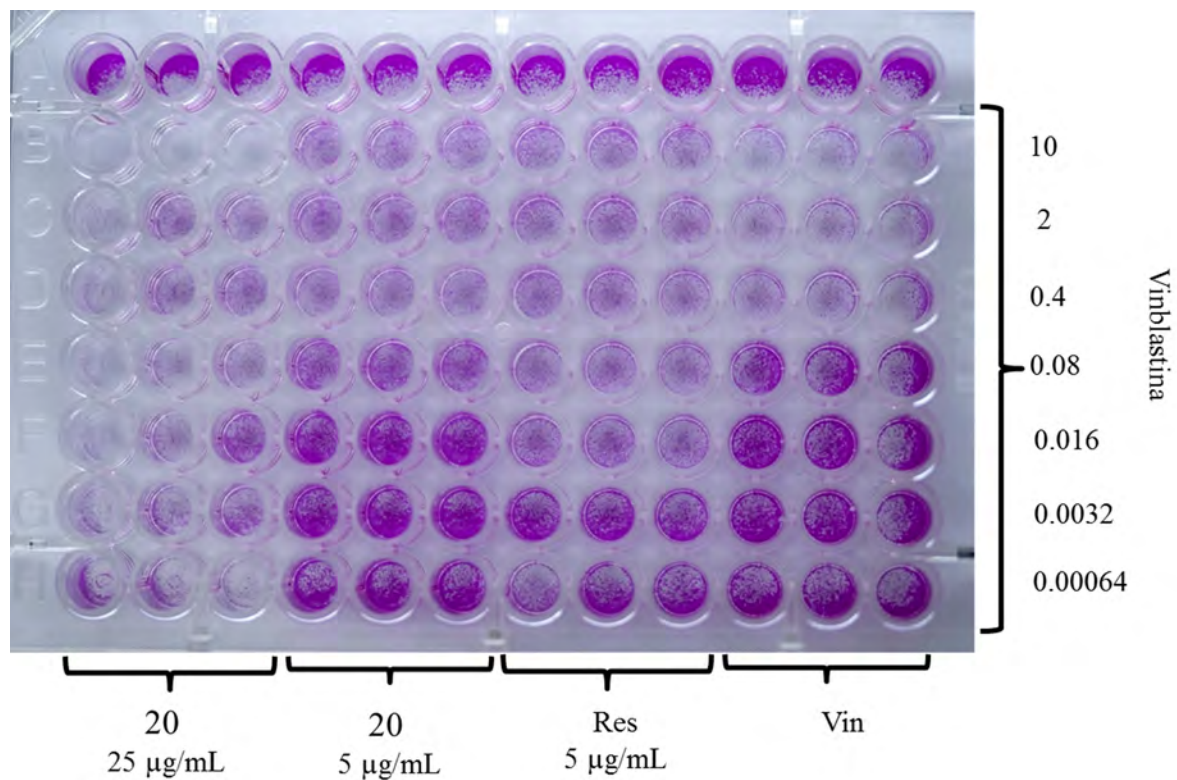
Ensayos de modulación de vinblastina con compuesto **2** (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺.
Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5 µg/mL); Vin, vinblastina.



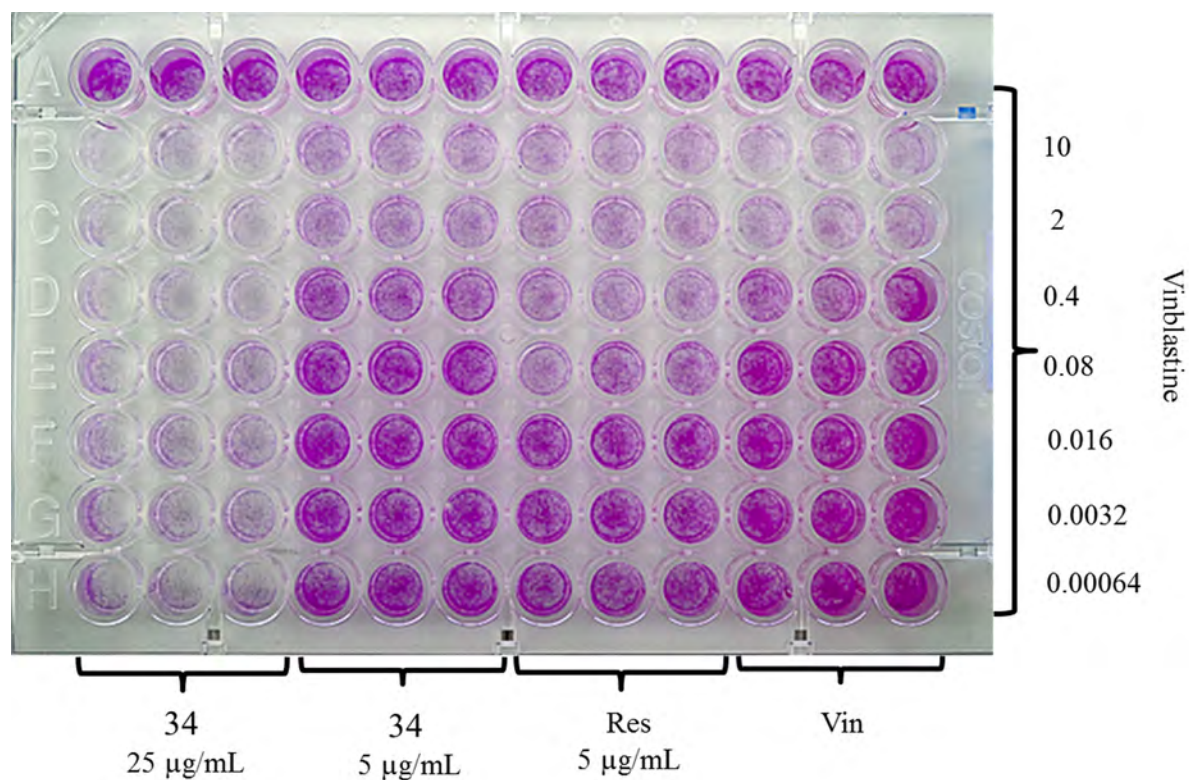
Ensayos de modulación de vinblastina con el compuesto **3** (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺. Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5 µg/mL); Vin, vinblastina.



Ensayos de modulación de vinblastina con el compuesto **19** (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺. Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5 µg/mL); Vin, vinblastina.



Ensayos de modulación de vinblastina con el compuesto **20** (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺. Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5 µg/mL); Vin, vinblastina.



Ensayos de modulación de vinblastina con compuesto **34** (25 y 5 µg/mL) contra MCF-7/Vin⁺. Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5 µg/mL); Vin, vinblastina.

APÉNDICE 3

Publicaciones generadas por esta investigación:

- **Figueroa-González, G.**; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. Reversal of multidrug resistance by morning glory resin glycosides in human breast cancer cells. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 93–97.
- Castañeda-Gómez, J.; **Figueroa-González G.**; Jacobo-Herrera, N.; Pereda-Miranda, R. a Resin Glycoside Ester-Type Dimer and Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps from *Ipomoea purga*. *J. Nat. Prod.* **2012**, en prensa.
- Cruz-Morales, S.; Castañeda-Gómez, J.; **Figueroa-González G.**; Mendoza-García AD.; Pereda-Miranda, R. Mammalian Multidrug Resistance Lipopentasaccharide Inhibitors from *Ipomoea alba* Seeds. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1603-1611.

Presentaciones en Congresos:

- **Figueroa-González, G.**; Jacobo-Herrera, N.; Pereda-Miranda, R.; Zentella-Dehesa, A. “43rd IUPAC World Chemistry Congress”, **Cartel**: Resin Glycosides from the Morning Glory Family modulate chemoresistance in MCF-7/Vin cancer cells. San Juan, Puerto Rico. 31 de Julio de 2011 al 05 de agosto de 2011.
- **Figueroa-González, G.**; Pereda-Miranda, R. “QuimiUNAM 2011”, **Cartel**: Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. Distrito Federal, México. 16 al 18 de noviembre de 2011.
- **Figueroa-González, G.**; Castañeda-Gómez, J.; Pereda-Miranda, R. “International Congress on Natural Products Research”, **Cartel**: Reversal of Multidrug Resistance by Purgin II in Human Breast Cancer Cells. New York, USA. 28 de Julio de 2012 al 01 de agosto de 2012.

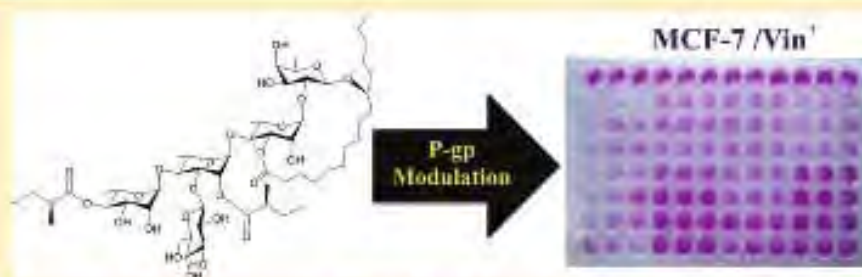
Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells

Gabriela Figueroa-González,¹ Nadia Jacobo-Herrera,² Alejandro Zentella-Dehesa,² and Rogelio Pereda-Miranda^{1*}

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, 04510, DF, Mexico

²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, 14000, DF, Mexico

S Supporting Information



ABSTRACT: Reversal of multidrug resistance (MDR) by thirty resin glycosides from the morning glory family (Convolvulaceae) was evaluated in vinblastine-resistant human breast carcinoma cells (MCF-7/Vin). The effects of these amphipathic compounds on the cytotoxicity and P-glycoprotein (P-gp)-mediated MDR were estimated with the sulforhodamine B colorimetric assay. Active nontoxic compounds exerted a potentiation effect of vinblastine susceptibility by 1- to over 1906-fold at tested concentrations of 5 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Murracoidin V (1) enhanced vinblastine activity 255-fold when incorporated at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and also, based on flow cytometry, significantly increased the intracellular accumulation of rhodamine 123 with the use of reserpine as a positive control for a MDR reversal agent. Incubation of MCF-7/Vin cells with 1 caused an increase in uptake and notably lowered the efflux rate of rhodamine 123. Decreased expression of P-glycoprotein by compound 1 was detected by immunofluorescence flow cytometry after incubation with an anti-P-gp monoclonal antibody. These results suggest that resin glycosides represent potential efflux pump inhibitors for overcoming MDR in cancer therapy.

Multidrug resistance (MDR) is one of the major obstacles and serious problems associated with cancer chemotherapy. Multiple resistance mechanisms in tumor cells complicate treatment and increase both human morbidity and financial cost in healthcare systems.¹ Chemoresistance in cancer cells presents multiple mechanisms, such as loss or inhibition of cell surface drug receptor or transporter, specific drug metabolism, or mutation of specific drug targets.² MDR phenotype is often the overexpression of a 170 kDa plasma membrane associated glycoprotein known as P-glycoprotein (P-gp), encoded by the human MDR1 gene.³ This protein has been found in the intestine, liver, pancreas, kidney, ovary, testicle, and brain.⁴ P-gp belongs to the superfamily of adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters and functions as an energy-dependent multidrug membrane translocase that extrudes a wide range of structurally and functionally diverse lipophilic and amphipathic anticancer drugs, carcinogens, toxins, and other xenobiotics from inside cells and thereby prevents drugs from exerting their cytotoxicity by means of decreasing intracellular accumulation.⁵

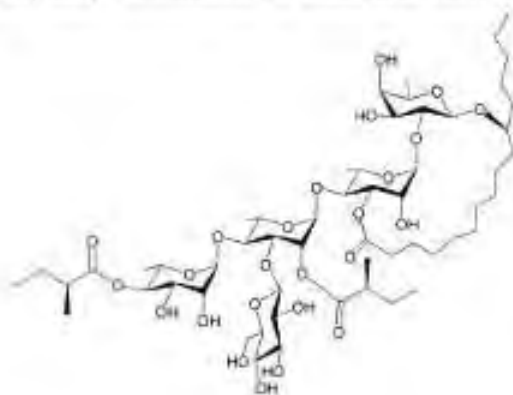
In order to reverse MDR in cancer cells, some studies have focused on inhibiting P-gp function and thus increasing the intracellular drug accumulation.⁶ Many natural and synthetic pharmaceutical agents including calcium channel blockers (e.g., verapamil),⁷ calmodulin antagonists (e.g., trifluoperazine and chlorpromazine),^{8,9} and antimalarial (e.g., chloroquine),⁷ antiarrhythmic (e.g., quinidine),⁷ and immune suppressive drugs (e.g., cyclosporine A)¹⁰ inhibit P-gp function. These findings indicate the need to select natural or synthetic leads for developing new potent efflux pump inhibitors (EPIs). P-gp has also been inhibited by herbal medicines.¹⁰ Some plant flavonols (e.g., kaempferol, quercetin, and galangin),¹¹ ginsenosides,¹¹ polyphenols,¹² omega-6 polyunsaturated fatty acids,¹³ macrocyclic diterpenoids,¹⁴ and alkaloids^{7,15} (e.g., reserpine and yohimbine) have been reported to modulate P-gp activity.¹⁶

The modulatory effect of microbiologically inactive resin glycosides,¹⁷ amphipathic glycolipids, evaluated on multidrug-

Received: October 26, 2011

Published: December 13, 2011

resistant Gram-positive (*Staphylococcus aureus*)^{18–21} and -negative bacteria (*Escherichia coli* Rosetta-gam, *Salmonella typhi*, and *Shigella flexneri*)²² led to the characterization of these compounds as substrates for efflux pumps. Using SA-1199B, an effluxing strain overexpressing the Nor A multidrug transporter, some members of the orizabin and marucoidin series were as inhibitory of ethidium bromide efflux as reserpine (an EPI used as a positive control). It has been suggested that MDR is a variation of a regular translocase that simply broadened its substrate spectrum, providing a cell with a simple defense against toxins.²³ Thus, this similarity in design, and the high incidence of apparently independent evolution of bacterial and eukaryotic MDR pumps,²³ was the rationale for an evaluation of the modulatory activity of resin glycosides from the morning glory family (Convolvulaceae) in human breast cancer cells



1

resistant to vinblastine (MCF-7/Vin^r) as prototypes for effective EPIs.

RESULTS AND DISCUSSION

Thirty convolvulaceous resin glycosides (1–30; Figures S4–S16, Supporting Information) were tested for cytotoxicity and modulatory activity against human breast cancer, using a vinblastine-resistant line (MCF-7/Vin^r) and its parental cells (MCF-7). Proliferation curves were established for each cell line by the sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay²⁴ (Figure S1, Supporting Information). As expected, the developed MDR cell lines MCF-7/Vin^r (cells growing in

vinblastine-free medium) and MCF-7/Vin^r (cells growing in vinblastine-supplemented medium) displayed lower vinblastine susceptibility up to 22- and 26-fold, respectively, than that of MCF-7 drug-sensitive cells. Cross-resistance to adriamycin, colchicine, and ellipticine was also observed (Table 1). Screening for cytotoxicity of all tested glycolipids (1–30) was performed using both vinblastine-sensitive and -resistant cell lines to determine IC₅₀ values (Table S1, Supporting Information). These results identified noncytotoxic compounds (IC₅₀ > 25 μg/mL) for further evaluation as EPIs. Most of the tested compounds were weakly cytotoxic (IC₅₀ = 10–25 μg/mL) or inactive as previously reported for other resin glycosides on various drug-sensitive cell lines.¹⁷ Only members of the orizabin (19–25) series displayed moderate to marginal cytotoxicity against the evaluated MDR cell lines (IC₅₀ = 1.5–10 μg/mL). Lack of cytotoxicity is an important requirement for performing modulation assays with effluxing cell lines to be able to clearly distinguish any potentiation effect (through inhibition of efflux pumps) from possible synergism of an active compound with vinblastine.^{16,25}

Preliminary assays using MCF-7/Vin^r cells showed that all tested compounds displayed modulation of vinblastine susceptibility (Table S2, Supporting Information) and allowed for the selection of five compounds (1, 2, 3, 16, and 17) with a positive response (>20-fold) as MDR reversal agents (Tables 2 and S3, Supporting Information). In terms of the relationship between chemical structure and the observed nonspecific modulatory activity, neither the size of the lactone ring nor the length of the oligosaccharide chain was crucial for activity potentiation. The degree, type, or position of saccharide conjugation also had no clear influence on the activity of these compounds.

Although all selected compounds enhanced the cytotoxicity of vinblastine to MCF-7/Vin^r cells (Table 2), marucoidin V (1) was less toxic and the only compound in adequate supply for further evaluation of its inhibitory effect on both P-gp function and expression by flow cytometry. Intracellular rhodamine 123 (Rh123)-associated mean fluorescence intensity in MCF-7/Vin^r and MCF-7 cells was employed to study the effects of resin glycosides on the inhibition of P-gp function. As expected from their MDR phenotype,¹⁰ the accumulation of Rh123 by MCF-7/Vin^r cells preincubated with compound 1 (25 μg/mL) was less than a third of that registered for the parental cells (Figure 1). This accumulation was comparable to that observed for reserpine, which was used as the EPI control. In the experiment of intracellular Rh123 efflux (Figure 2), a rapid decrease of intracellular Rh123 level was observed in MCF-7/Vin^r cells after incubation in Rh123-free medium. However, in the presence of compound 1, Rh123 efflux was suppressed in

Table 1. Cross-Resistance and Cytotoxicity of Vinblastine against Drug-Sensitive MCF-7 and Multidrug-Resistant MCF-7/Vin^r Cells

	cell line				
	MCF-7 ^{sens}	MCF-7/Vin ^r		MCF-7/Vin ^r	
	IC ₅₀ ^a (μg/mL)	IC ₅₀ ^a (μg/mL)	resistance value	IC ₅₀ ^a (μg/mL)	resistance value
vinblastine	0.047 ± 0.01	1.02 ± 0.14	22-fold	1.22 ± 0.14	26-fold
adriamycin	0.644 ± 0.05	4.52 ± 1.3	7-fold	2.42 ± 0.46	4-fold
colchicine	0.016 ± 0.003	1.05 ± 0.09	66-fold	0.90 ± 0.19	56-fold
camptothecin	<0.00004	<0.00004		<0.00004	
ellipticine	0.359 ± 0.04	0.38 ± 0.02	1-fold	0.43 ± 0.07	1-fold

^aEach value represents the mean ± SD from three independent experiments.

Table 2. Modulation of Vinblastine Cytotoxicity in Drug-Sensitive MCF-7 and Multidrug-Resistant MCF-7/Vin Cells by Selected Resin Glycosides

Compound ^a	IC ₅₀ (μg/mL)			RF _{glycolipid} ^b		
	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺	MCF-7 sens.	RF _{MCF-7/Vin⁻}	RF _{MCF-7/Vin⁺}	RF _{MCF-7 sens.}
vinblastine	1.03 ± 0.18	1.23 ± 0.14	0.047 ± 0.01			
1	0.004 ± 0.002	0.150 ± 0.13	0.001 ± 0.002	253	7.8	47
2	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1006.3	>73.4
3	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1006.3	>73.4
16	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1593.8	>1006.3	>73.4
17	<0.00064	<0.00064	0.001 ± 0.003	>1593.8	>1006.3	47
reserpine ^c	0.037 ± 0.01	0.31 ± 0.18	0.001 ± 0.002	27.6	3.9	13.7

^aSerial dilutions from 0.00064 to 10 μg/mL of vinblastine in the presence or absence of glycolipid (25 μg/mL). ^bReserpine = 5 μg/mL as positive control. ^cRF = IC₅₀ vinblastine/IC₅₀ vinblastine in the presence of glycolipid. Each value represents the mean ± SD from three independent experiments.

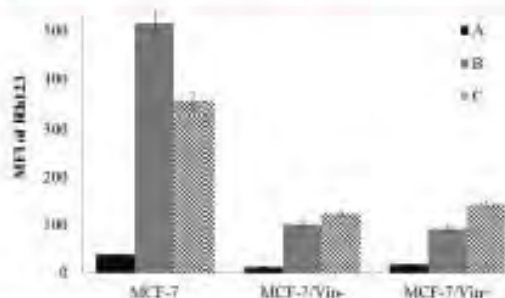


Figure 1. Effects of mucosidin V (1) on Rh123 accumulation in drug-sensitive MCF-7 cells and multidrug-resistant MCF-7/Vin cells. Cells were respectively (A) untreated, (B) pretreated with 25 μg/mL 1, (C) pretreated with 5 μg/mL reserpine. Each bar represents the mean ± SD from three independent experiments.

MCF-7/Vin⁺, which result was almost equipotent to the effect observed for the positive control. This inhibition continued even after the tested compound was removed from the medium for over 90 min (Figure S2, Supporting Information). It would appear that this cellular uptake of resin glycosides is facilitated by their amphipathic properties, resulting in an easy interaction with P-gp.⁴³

Decreased expression of P-gp by compound 1 was detected by immunofluorescence flow cytometry after incubation with an anti-P-gp monoclonal antibody. The fluorescent intensity of labeled antibody in parental MCF-7 cells was used as a blank control. MCF-7/Vin⁺ exhibited a strong fluorescent area that corresponded to the expression of P-gp. After 30 min incubation with compound 1 (25 μg/mL), the expression level of P-gp was decreased by 30% when compared with untreated MCF-7/Vin⁺ (Figure 3). This effect was similar to the one exerted by reserpine (5 μg/mL) with a 38% reduction in the P-gp expression (Figure S3, Supporting Information). Therefore, these data suggest that resin glycosides are substrates of the P-gp transporter and hold promise as leads in the search for more potent EPs. Their inhibitory effects could be used to overcome the acquired resistance to common antineoplastic drugs by lowering current effective therapeutic doses, thereby decreasing toxic side-effects in refractory malignancies. These results also indicate that combining an anticancer agent with a MDR inhibitor is an approach that promises positive possibilities for future cancer treatments.

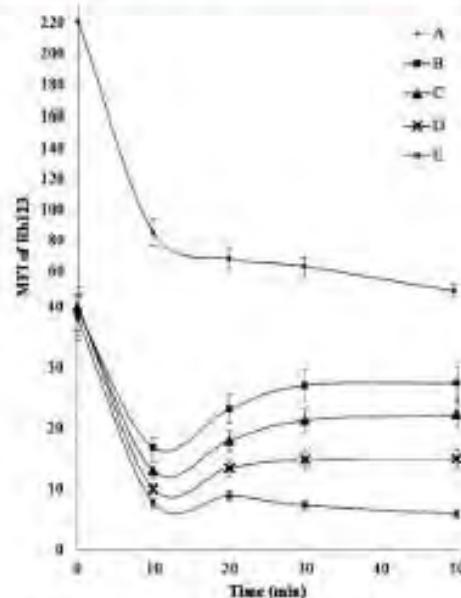


Figure 2. Effect of mucosidin V (1) on the Rh123 efflux assay in the drug-sensitive MCF-7 cells and multidrug-resistant MCF-7/Vin cells. (A) untreated drug-sensitive MCF-7 cells, (B) 5 μg/mL reserpine in MCF-7/Vin⁺, (C) 25 μg/mL 1 in MCF-7/Vin⁺, (D) 25 μg/mL 1 in MCF-7/Vin⁻, and (E) untreated as a negative control in MCF-7/Vin⁺. Each point represents the mean ± SD from three independent experiments.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. RPMI 1640 medium and fetal bovine serum were obtained from Gibco. Fluorescent conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against P-gp Mdr-1 (UIC2) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Sulfobutamide B, reserpine, vinblastine, ellipticine, colchicine, camptothecin, and rhodamine 123 (Rh123) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Test Compounds. Glycolipids 1–36 were isolated as previously described from *Ipomoea batatas*,²⁵ *I. intrapilosa*,⁴⁸ *I. muricoides*,^{10,26,27} *I. orizabensis*,⁴⁸ *I. pes-caprae*,^{24,26} *I. purga*,³¹ and *I. tricolor*.^{12,13} The structures for all tested compounds are included in Figures S4–S16 (Supporting Information).

Cell Lines and Cell Cultures. Drug-sensitive human breast carcinoma cell line MCF-7 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC HTB-22). The resistant counterpart MCF-

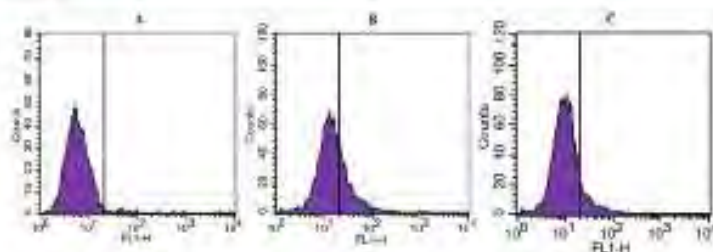


Figure 3. Mediated P-gp expression by maruocidin V (**1**) in drug-sensitive MCF-7 cells and multidrug-resistant MCF-7/Vin⁺ cells: (A) untreated MCF-7 cells; (B) untreated MCF-7/Vin⁺; (C) MCF-7/Vin⁺ treated with 25 µg/mL **1**. The percentage area to the right indicates the relative quantity of P-gp expression.

7/Vin was developed through continuous exposition to vinblastine during three consecutive years. These cells are considered to express the MDR phenotype due to their cross-resistance to adriamycin, colchicine, and ellipticine as displayed in pre-experiments (Table 1). All cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air (100% humidity). To maintain drug resistance, MCF-7/Vin⁺ cells were cultured in medium containing 0.192 µg/mL vinblastine. At the same time, a stock of MCF-7/Vin⁻ cells was maintained in vinblastine-free medium.

Cytotoxicity and Modulation of Multidrug-Resistance Assays. Cytotoxicity and reversal fold of the resin glycosides (**1**–**30**) were determined by using the SRB assay.²⁴ The cells were harvested at log phase of their growth cycle and were treated in triplicate with various concentrations of the test samples (0.2–25 µg/mL) and incubated for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Results are expressed as the concentration that inhibits 50% control growth after the incubation period (IC₅₀). The values were estimated from a semilog plot of the drug concentration (µg/mL) against the percentage of growth inhibition. Vinblastine was included as a positive control drug.

The reversal effects as modulators were further investigated with the same method. MCF-7 and MDR MCF-7/Vin cells were seeded into 96-well plates and treated with various concentrations of vinblastine (0.00064–10 µg/mL) in the presence or absence of glycolipids at 25 and 5 µg/mL for 72 h. The ability of glycolipids to potentiate vinblastine cytotoxicity was measured by calculating the IC₅₀ as described above. In these experiments, reserpine (5 µg/mL) was used as a positive control drug. The reversal fold (RF) value, as a parameter of potency, was calculated from dividing IC₅₀ of vinblastine alone by IC₅₀ of vinblastine in the presence of test compounds.

Intracellular Rh123 Accumulation Assay. MCF-7 and MDR MCF-7/Vin cells were seeded at 4.5 × 10⁵ cells per well in six-well plates and cultured for 24 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. At 60% confluence, fresh media containing 2.5 µg/mL Rh123 and compound **1** (25 or 5 µg/mL) or reserpine (5 µg/mL) was added and incubated at the same conditions for 30 min. At the end of the incubation time, the accumulation of Rh123 was stopped by washing the cells three times with ice-cold PBS; then the intracellular mean fluorescence intensity (MFI) associated with Rh123 was measured with a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Excitation was performed at 485 nm, and the emitted fluorescence was collected through a 530 nm pass filter. Data analysis was performed using Cell Quest software.

Rh123 Efflux Assay and Persistence of Activity. Cells were seeded and cultured in the same manner as described for the accumulation assay during 24 h. At the end of this time, cells were first incubated with fresh medium containing 2.5 µg/mL of Rh123 at 37 °C for 30 min; then they were washed three times with Rh123-free medium and incubated at 37 °C in the presence or absence of **1** (25 or 5 µg/mL) for 0, 10, 20, 30, and 50 min, respectively. For the persistence assay, fresh media was added and cells were incubated again containing 2.5 µg/mL Rh123 in the presence or absence of **1** (25 or 5 µg/mL) for 30 min and washed three times with Rh123-free

medium. The ability of cells to accumulate Rh123 and the remaining inhibitory effect were measured after incubating for 30, 60, and 90 min. T₁ represents the end of the modulator incubation phase.²⁵ Reserpine (5 µg/mL) was used as a positive control for both efflux and persistence of activity assays. The MFI was measured as described for the accumulation assay.

P-gp Expression. To measure the cell surface P-glycoprotein levels by immunofluorescence flow cytometry,²⁶ cell lines were seeded into six-well plates at a density of 4.5 × 10⁵ cells per well and then cultured for 24 h. After this period, cells were harvested, washed twice with ice-cold PBS, and then labeled with fluorescein conjugated mouse anti-human monoclonal antibody against P-gp Mdr-1 (UIC2) according to the manufacturer's instructions. The cells were exposed at the same time to compound **1** (25 µg/mL) or reserpine (5 µg/mL) as well as to the antibody during 30 min of ice-incubation. The MFI was measured as described above.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The structures of tested compounds, their cytotoxicity against drug-sensitive and MDR MCF-7 cell lines, primary screening on modulatory activity in MCF-7/Vin⁻, modulatory activity for selected compounds (**1**, **2**, **3**, **16**, and **17**) at a concentration of 5 µg/mL against the drug-sensitive and MDR MCF-7/Vin cell lines, P-gp expression with 5 µg/mL reserpine, proliferative curves, persistence assays, and pictures of modulation assay plates are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +5255 5622 5280. Fax: +5255 5622 5329. E-mail: peredaj@unam.mx.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (101380-Q) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN217310). We thank Dr. M. Frago-Serrano (Facultad de Química, UNAM) for assistance during purification of the test compounds. G.F.-G. is grateful to CONACYT for a graduate student scholarship (Grant 204852).

■ REFERENCES

- (1) Krishna, A.; Arya, P. *Hemostol. Oncol. Clin. North Am.* **2002**, *16*, 357–372.
- (2) Gottesman, M. M. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627.
- (3) Gottesman, M. M.; Pastan, I. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385–427.
- (4) Goldstein, L. J.; Galsh, H.; Fojo, A.; Willingham, M.; Lai, S. L.; Gasdar, A.; Fisher, R.; Green, A.; Crist, W.; Brodeur, G. M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 116–124.

- (5) Berst, P.; Elferink, O. *Ann. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 537–592.
- (6) Xiao-Fang, C.; Nakajima, Y.; Sumitawa, T.; Ikeda, R.; Xiao-Qin, R.; Chun-Lai, Z.; Mukai, M.; Furukawa, T.; Haraguchi, M.; Gao, H.; Sugimoto, Y.; Akiyama, S. *Cancer Lett.* **2002**, *187*, 111–119.
- (7) Beck, W. T.; Cartain, M. C.; Glover, C. J.; Felsted, R. L.; Safa, A. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 959–966.
- (8) Shin, S. Y.; Choi, B. H.; Kim, J. R.; Kim, J. H.; Lee, Y. H. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 300–306.
- (9) Wang, J. S.; Zhu, H. J.; Minkowitz, J. S.; Domoyan, J. L.; DeVane, C. L. *Psychopharmacology* **2006**, *187*, 415–423.
- (10) Zhou, S.; Yong, L.; Chowbay, B. *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36*, 57–104.
- (11) Piang, J. M.; Pover, M.; Lopaczynska, J.; Yeh, G. C. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5977–5981.
- (12) Jodum, J.; Demeule, M.; Béliveau, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1542*, 149–159.
- (13) Kong, X.; Haitao, G.; Chen, L.; Liu, Z.; Yin, Z.; Li, P.; Li, M. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 634–639.
- (14) Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Motti, R.; Simon, P.; N. Dumontet, C.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 989–992.
- (15) Silva, G. L.; Cui, B.; Chávez, D.; You, M.; Hee-Byung, C.; Rasoanavi, P.; Lynn, S. M.; O'Neill, M. J.; Lewis, J. A.; Besterman, J. M.; Monks, A.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1514–1520.
- (16) Zhang, S.; Morris, M. E. *J. Pharmacol. Exp.* **2003**, *304*, 1256–1267.
- (17) Pereda-Miranda, R.; Rojas-Ramírez, D.; Castañeda-Gómez, J. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer-Verlag: New York, 2010; Vol. 92, Chapter 2, pp 77–152.
- (18) Pereda-Miranda, R.; Kautz, G. W.; Gibbons, S. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 406–409.
- (19) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Jacobo-Herrera, N.; Kautz, G. W.; Gibbons, S. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1037–1045.
- (20) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Gibbons, S. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 222–227.
- (21) Escobedo-Martínez, C.; Cruz-Morales, S.; Fragoso-Serrano, M.; Rahman, M. M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1796–1801.
- (22) Corona-Castañeda, B.; Pereda-Miranda, R. *Planta Med.* **2011**, in press, DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1280292>.
- (23) Bosch, L.; Croup, J. M. *Cytotechnology* **1998**, *27*, 1–30.
- (24) (a) Vichai, V.; Kuntikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116. (b) Sreelata, P.; Störing, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. (c) Angerhofer, C. K.; Guimarães, H.; Wongpanich, V.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 59–60.
- (25) (a) Escalante-Sánchez, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1029–1034. (b) Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 3163–3168. (c) Escalante-Sánchez, E.; Rosas-Ramírez, D.; Linares, E.; Bye, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9423–9428.
- (26) Bah, M.; Chérigo, L.; Cardoso, A.; Fragoso-Serrano, M.; Hammond, G. B.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1153–1157.
- (27) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 595–599.
- (28) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3145–3154.
- (29) Pereda-Miranda, R.; Escalante-Sánchez, E.; Escobedo-Martínez, C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 226–230.
- (30) Escobedo-Martínez, C.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 974–978.
- (31) Castañeda-Gómez, J.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1148–1153.
- (32) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13063–13080.
- (33) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9007–9022.
- (34) Bian-Sheng, J.; Ling, H.; Guo-Qing, L. *Life Sci.* **2005**, *77*, 2221–2232.
- (35) Xiang, W.; Gao, A.; Liang, H.; Li, C.; Gao, J.; Wang, Q.; Shuang, R.; Zhang, J.; Yan, Y.; Wang, X. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1474–1481.

Purgin II, a Resin Glycoside Ester-Type Dimer and Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps from *Ipomoea purga*

Jhon Castañeda-Gómez,[†] Gabriela Figueroa-González,[†] Nadia Jacobo,[‡] and Rogelio Pereda-Miranda^{*†}

[†]Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, 04510, DF, Mexico,

[‡]Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, 14000, DF, Mexico.

ABSTRACT

A reinvestigation of the CHCl₃-soluble extract from the aerial parts of *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), the officinal Jalap root, was carried out to identify mammalian multidrug resistance inhibitors. Preparative-scale recycling HPLC was used to purify four new resin glycosides, purgins II (**1**) and III (**2**) in addition to purginosides III (**3**) and IV (**4**), as well as the known purginosides I (**5**) and II (**6**) and purgin I (**7**). The structures of **1–4** were established through NMR

spectroscopy and mass spectrometry. Purgins II (**1**) and III (**2**) are the first examples of ester-type dimers of operculinic acid B with three different acylating residues in both monomeric units: (2*S*)-methylbutyric acid, *n*-hexanoic, *n*-decanoic, and *trans*-cinnamic acids. The macrolactonization site was located at C-2 of the second saccharide unit. The position for the ester linkage for monomeric unit B on the macrocyclic unit A was established as C-4 of the terminal glucose. The purginosides III (**3**) and IV (**4**) were found to be pentasaccharides of operculinic acid A with a related structure to that previously described for compounds **5–6**. Reversal of multidrug resistance by compounds **1–7** was evaluated in vinblastine-resistant human breast carcinoma cells (MCF-7/Vin). Purgin II (**1**) enhanced vinblastine activity >2140-fold when incorporated at 25 μg/mL. For compounds **2–7**, a moderate activity from 1.4-fold to 6.5-fold was observed.

Resin glycosides from the morning glory family (Convolvulaceae) are amphipathic glycolipids¹ which have previously demonstrated to be substrates for efflux pumps related to the multidrug resistant (MDR) phenotype in prokaryotic² and eukaryotic^{3,4} cells. This class of non cytotoxic glycolipids represents efflux pump inhibitors that could be used to lower current effective therapeutic doses of drugs and, therefore, decreasing toxic-side effects during chemotherapy of refractory malignancies.

As part of an ongoing project to identify resin glycoside inhibitors of multidrug efflux pumps, this paper describes the results of a reinvestigation based on the separation, purification, and structure elucidation of glycolipids isolated from the aerial parts of *Ipomoea purga* (Wender) Hayne (Figure S1, Supporting Information),⁵ a member of the medicinal plant complex of jalaps where it is considered to be the “official” or signature species for its important therapeutic benefits as a purgative.⁶ Four new resin glycosides, purgins II (1) and III (2), structurally characterized as ester-type dimers, and the purginosides II (3) and III (4), macrocyclic pentasaccharides, as well as the known purginosides I (5) and II (6), and purgin I (7), were purified by recycling preparative HPLC technique (Figure S2, Supporting Information).⁷ The cytotoxicity and modulation activity of compounds 1-7 were evaluated by the SRB method against vinblastine-resistant human breast carcinoma cells (MCF-7/Vin).³ The inhibition of P-glycoprotein activity in these effluxing cancer cells was also assessed with compound 1 through flow cytometry experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

A portion of the resin glycoside fraction obtained from the CHCl₃-soluble extract of *I. purga* aerial parts was saponified to give an organic solvent-soluble acidic fraction and a water-soluble product. GC-MS analysis of the organic solvent-soluble acidic fraction permitted the identification of 2-methylbutanoic (mba), *n*-hexanoic (hexa), *n*-decanoic (deca), *n*-dodecanoic (dodeca), and *trans*-cinnamic acids (cna) as the liberated fatty acids by co-elution with authentic samples.^{8,9} The absolute configuration for mba was confirmed through

the preparation and identification of 4-bromophenyacyl (2*S*)-2-methylbutyrate according to a previously reported procedure.^{7,10} A fraction of the water-soluble glycosidic acid mixture was subjected to hydrolysis and analyzed by HPLC for its sugar content to confirm that all monosaccharides (D-glucose, D-fucose, and L-rhamnose) were in their naturally occurring form as established by optical rotation measurements of the acid-liberated individual monosaccharides. In order to isolate the major constitutive glycosidic acids (8 and 9; Figure S5, Supporting Information), the mixture was methylated and resolved by C₁₈ reversed-phase HPLC into two derivatives which were identified as the methyl esters of operculinic acid A, (11*S*)-jalapinic acid 11-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-fucopyranoside, and operculinic acid B, (11*S*)-jalapinic acid 11-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)]-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside. Both derivatives were acetylated and identified by comparison of their physical constants and NMR data with published values for the peracetylated methyl esters 8a and 9a (Figure S5, Supporting Information).^{8,10} Evidences for the configuration of the anomeric linkages as well as the sequence of glycosidation were published when these oligosaccharides were first elucidated.¹¹ Also, they are representative cores commonly found in the morning glory resin glycosides, e.g., sweet potato (*I. batatas*)¹² and the Mexican medicinal arborescent members of the genus *Ipomoea* (*I. murucoides*⁸ and *I. intrapilosa*¹⁰), among others.¹

Resin glycosides are always present as complex mixtures of homologues having the same glycosidic acid core but substituted with alkyl groups differing in chain length.¹ Therefore, they are not very easy to purify. The HPLC techniques of heart-cutting and peak shaving,⁷ singularly or combined, using a preparative reversed-phase C₁₈ column (Figure S2, Supporting Information), were employed in this work. To achieve homogeneity, each peak collected was recycled until overlapped components were separated, as demonstrated by the purification of compound **1-7**. These procedures led to the isolation of four new compounds named purgins II and III (**1** and **2**) and purginosides III and IV (**3** and **4**), in addition to the known purginosides I–II (**5–6**) and purgin I (**7**)⁵ (Figures S3 and S4, Supporting Information). Saponification and derivatization as described above for compounds **1** and **2** produced the same operculinic acid derivative **9a**. The basic hydrolysis of the ester linkage in the dimeric forms has been used to correlate with their constitutive natural monomers,¹³⁻¹⁵ for this case two units of operculinic acid B. Compounds **3** and **4** yielded operculinic acid A derivative **8a** after alkaline hydrolysis.⁸

Purgins II (**1**) and III (**2**) were identified by a combination of spectrometric techniques (FABMS and HRESIMS) and NMR methods allowing the identification of their dimeric nature.^{14,15} In the ESIMS (negative-ion mode), purgin II and III (**1** and **2**) gave a pseudomolecular [M + Cl][−] ion at m/z 2804.4567 (C₁₄₀H₂₂₄O₅₄, calcd error: $\delta = +3.10$) and 2832.4783 (C₁₄₂H₂₂₈O₅₄, calcd error: $\delta = -0.35$), respectively (Figures S4 and S11, Supporting Information). These mass spectra illustrate what can be expected from the analysis of an

ester-type dimer^{5,13-15} in the negative mode: the [M – H][−] anion, the [M/2 – H][−] peak, representing the high-mass fragment ion for the two monomeric units, the fragments for the fatty acid elimination, and the glycosidic cleavage, in particular those peaks in FABMS which confirmed the branched pentasaccharide cores. For compound **1**, the cleavage of ester type dimer resulted in the diagnostic [M/2 – H][−] peak at m/z 1383.7262; while for **2**, this peak was observed at m/z 1397.7474. The observed peaks at m/z 1253 [1383 – 130 (C₉H₆O)], 1099 [1253 – 154 (C₁₀H₁₈O)], and 869 [1099 – 84 (C₅H₈O) – 146 (C₆H₁₀O₄)] suggested the consecutive eliminations of one cinnamoyl, one decanoyl, and one methylbutanoyl moieties in addition to a methylpentose residue for each oligosaccharide monomeric units A and B of compound **1**. The difference of 244 mass units between the peaks at m/z 1113 [1397 – 130 (C₉H₆O) – 154 (C₁₀H₁₈O)] and 869 [1113 – 98 (C₆H₁₀O) – 146 (C₆H₁₀O₄)], indicated the loss of a methylpentose unit and a hexanoyl residue for compound **2**.

The anomeric region of the ¹H NMR (δ_{H} 4.5 ppm – 6.3 ppm) and ¹³C NMR (δ_{C} 95 ppm – 110 ppm) spectra of compounds **1** and **2** (Figures S7, S8, S14, and S15, Supporting Information) showed ten carbon signals which correlated with its proton signals by HSQC experiments (Figures S11 and S18, Supporting Information). COSY, TOCSY, and HSQC studies were employed to assign the ¹H and ¹³C chemical shift of each monosaccharide unit (Table 1; Figures S9-S11 and S16-S18, Supporting Information). In cases, where it was not possible to assign the methine resonances due to spectroscopic overlap, the spectroscopic simulation by the MestRe-C program served to determine the correct assignment for the chemical shifts and coupling constants of all superimposed protons.¹⁵ For these type of

compounds, edited ^1H NMR sub-spectra permitted the assignment of all of the resonances in both monomeric units.^{14,15} Downfield shifted signals were observed for protons at C-2 of the first and second rhamnose units (rha and rha') in addition to C-2 (or C-3) and C-4 of the third rhamnose unit (rha'') in both monomeric units for **1** and **2**, thus indicating acylation at these positions on the oligosaccharide core. The carbonyl resonances at δ_{C} 173.4 ppm for **1**, and δ_{C} 173.2 ppm for **2** were assigned to the unit A lactone functionality due to its $^2J_{\text{CH}}$ coupling with the C-2 diastereotopic methylene protons centered at δ_{H} 2.28–2.50. The macrolactonization site at C-2 of the first rhamnose unit was established by the observed $^3J_{\text{CH}}$ correlation between this carbonyl carbon and its geminal proton (δ_{H} 6.04 for **1**, and δ_{H} 6.05 for **2**). The ester-type linkage established by the acyclic unit B at the macrocyclic unit A was identified by $^3J_{\text{CH}}$ correlation between the carbonyl group for the ester (δ_{C} 173.4; unit B) and H-4 of the terminal glucose unit (Glc', δ_{H} 4.4 ppm). For purgin II (**1**), the decanoyl residue in both units A (δ_{C} 173.8) and B (δ_{C} 173.6) was located at C-2 of the second saccharide unit (rha', 6.28 – 6.33). The *trans*-cinnamoyl residues (δ_{C} 166.9, unit A; δ_{C} 166.4, unit B) were located as the acylating groups at positions C-2 (δ_{H} 6.30, unit A) and C-3 (δ_{H} 5.99, unit B) of the terminal rhamnose unit (rha''). Each of the 2-methylbutanoyl groups showed a $^3J_{\text{CH}}$ cross-peak with the proton H-4 of the terminal rhamnose unit (rha'') at δ_{H} 5.80 (unit A) and at δ_{H} 6.08 (unit B). Purgin III (**2**) showed the same acylation pattern in both saccharide moieties observed for purgin II (**1**), except by the presence of a hexanoic group (δ_{C} 173.6, unit A; δ_{C} 173.2, unit B) instead of the 2-methylbutanoyl residue at position C-4 (δ_{H} 5.83, unit A; δ_{H} 6.09, unit B) of the terminal rhamnose unit (rha''). These results suggested

that compounds **1** and **2** are the first resin glycosides with an ester-type dimer structure that consist of two units of operculinic acid B.

Purginoside III (**3**) afforded a pseudomolecular ion $[\text{M} - \text{H}]^-$ at m/z 1381.7339 ($\text{C}_{71}\text{H}_{113}\text{O}_{26}$, calcd error: $\delta = -12.30$ ppm) in the negative-ion FABMS, in contrast to the ion $[\text{M} - \text{H}]^-$ at m/z 1251.6970 (calcd error: $\delta = -10.46$ ppm) for purginoside IV (**4**) indicating a difference of one cinnamoyl group (130 atomic mass units) between these two macrocyclic pentasaccharide derivatives of operculinic acid A (Figures S20 and S27, Supporting Information). The consecutive losses of one cinnamoyl residue for **3** at m/z 1251 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_9\text{H}_6\text{O} (\text{cinnamoyl})]^-$, one decanoyl at m/z 1097 $[[1251 - \text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O} (\text{decanoyl})]^-]$, and one hexanoyl group plus a methylpentose unit at m/z 853 $[1097 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O} (\text{hexanoyl}) - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 (\text{methylpentose unit})]^-$ were observed for compounds **3** and **4**. Common fragment peaks observed by **3** and **4** were produced by glycosidic cleavage, as previously described for all resin glycosides,⁸⁻¹⁶ which confirmed their branched pentasaccharide cores as previously reported for related pentasaccharides of the murucoidin⁸ and pescaprein series.¹⁶

Common spectrometric features were noted in both ^1H and ^{13}C NMR spectra of **3** and **4** (Table 2, Figures S21, S22, S28, and S29, Supporting Information). ^1H NMR spectra showed significantly downfield shifted signals for the protons located at C-2 of the first and second rhamnose units (rha and rha'), and C-3 and C-4 of the third rhamnose unit (rha'') for **3** indicating acylation at these positions. For **4**, the terminal rhamnose unit (rha'') only exhibited esterification at position C-4. HMBC studies using long-range heteronuclear coupling correlation provided evidence for the location of each ester group at the oligosaccharide core (Figures S26 and S33, Supporting

Information).¹⁸ Thus, for compounds **3** and **4**, the lactonization site was located at position C-2 of the first rhamnose unit by the observed $^3J_{\text{CH}}$ correlation between the carbonyl group for the jalapinic acid (δ_{C} 173.1 and 173.6) and H-2 of Rha (δ_{H} 5.92 and 5.96 ppm). A decanoyl group (δ_{C} 173.5 and 174.0) was located at C-2 of the second rhamnose unit (Rha', δ_{H} 6.34 and 6.30 ppm) for both **3** and **4**. In addition, a hexanoyl residue (δ_{C} 173.1) and a cinnamoyl group (δ_{C} 166.5) at C-3 and C-4 of the terminal rhamnose unit (rha'', $\delta_{\text{H-3}}$ 6.0 and $\delta_{\text{H-4}}$ 6.09) were observed for **3**. While in compound **4**, only one hexanoyl residue (δ_{C} 173.9) was observed at position C-4 of the terminal rhamnose unit (rha'', δ_{H} 5.84).

Cytotoxic screening of compounds **1–7** was evaluated using both vinblastine-sensitive (MCF-7) and vinblastine-resistant human breast carcinoma cells (MCF-7/Vin).³ All compounds displayed non cytotoxic activity at the concentration tested against the drug sensitive and multidrug-resistant cells ($\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$). Therefore, their potential as MDR modulators was also evaluated by the SRB method¹⁷ against vinblastine-resistant human breast carcinoma cells (MCF-7/Vin) and the results are translated as the ability of these non-toxic glycolipids (**1–7**) to potentiate vinblastine cytotoxicity (Figures S36–S42, Supporting Information). All tested compounds at a concentration of $25 \mu\text{g/mL}$ displayed modulation of vinblastine susceptibility (Table 3) as previously observed for other morning glory resin glycosides.^{3,4} Purgin II (**1**) exerted a high potentiation effect by 2140 reversal fold (RF) for MCF-7/Vin⁺ which was stronger to the activity of reserpine (RF 4.4), a plant-derived efflux pump inhibitor used as a positive control. This modulatory activity was also

higher to that previously reported for murucoidin V (RF 255), a resin glycoside substrate of the P-gp transporter.³

Based on flow cytometry, compound **1** significantly increased the intracellular accumulation (Figure S34 and S35, Supporting Information) of rhodamine 123 (Rh123), an efflux pump substrate. Incubation of MCF-7/Vin cells with **1** caused an increase in uptake and notably lowered the efflux rate of Rh123 when compared with untreated MCF-7/Vin (Figure 1), in a similar way as murucoidin V.³ In the presence of compound **1**, Rh123 efflux was suppressed in MCF-7/Vin⁺ in an almost equipotent manner to reserpine. It was also demonstrated that this inhibition was reversible. Therefore, these results provided additional evidences to support the potential of non-cytotoxic resin glycosides as inhibitory substrates of P-glycoprotein for overcoming cross drug resistance in combinatory cancer therapy.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer model 341 polarimeter. ^1H and ^{13}C NMR experiments were registered on a Varian Inova instrument. Negative-ion LRFABMS were recorded using a matrix of triethanolamine on a Thermo DFS spectrometer. Negative-ion HRESIMS experiments were performed on a Bruker MicrOTOF-Q high resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF). The samples were dissolved in HPLC grade MeOH (0.4 mg/mL) and infused directly to the ESI source using a syringe pump at a flow rate of $180 \mu\text{L/h}$. The nebulizer and drying gas was nitrogen and set at 0.4

bar and 4.0 L/min, respectively. Drying gas temperature was set at 180 °C. Capillary voltage was 3.2 kV. Mass spectra were acquired over the range 50–3500 Da. The samples were processed using Bruker Data Analysis software. Waters HPLC equipment (Millipore corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA) was composed of a 600E multisolvent delivery system equipped with a 996 photodiode array detector. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of the chromatographic information were performed by the Empower 2 software (Waters). GC-MS was performed on a Thermo-Electron instrument coupled to a Thermo-Electron spectrometer. GC conditions: DB-5MS (5%-phenyl)-methylpolysiloxane column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.1 μm); He linear velocity, 30 cm/s; 50 °C isothermal for 4 min, linear gradient to 300 at 40 °C/min; final temperature hold, 20 min. MS conditions: ionization energy, 70 eV; ion source temperature, 250 °C; interface temperature, 270 °C; mass range, 45-600 amu.

Chemicals, Cell Lines and Cell Cultures. Drug-sensitive human breast carcinoma cell line MCF-7 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC HTB-22). The resistant counterpart MCF-7/Vin⁺ was developed through continuous exposure to vinblastine during three consecutive years as previously reported.³ All cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air (100% humidity). To maintain drug resistance, MCF-7/Vin⁺ cells were cultured in medium containing 0.192 μg/mL of vinblastine. At the same time, a stock of MCF-7/Vin⁻ cells was maintained in vinblastine-free medium.

Plant Material. Aerial parts of *Ipomoea purga* were collected in Coxmatla, Municipio de Xico, Veracruz, Mexico, in November 2010. The plant material was identified by botanist Alberto Linajes, and a voucher specimen (J. Castañeda and R. Pereda RP-06) has been deposited in the herbarium of the Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, Mexico (XAL ID-365843). Also, voucher specimens were archived at the Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM (sample code: RP-06-XAL) and in the Ethnobotanical Collection of the National Herbarium (MEXU 426765), Instituto de Biología, UNAM, and compared by one of us (R.P.-M.) with previously deposited vouchers housed in the Herbarium of the Instituto de Ecología, A.C. (Ortega 1488; XAL ID-I77366; Martínez-Vázquez 863; XAL ID-94389).

Extraction and Isolation. Stems, leaves, and flowers of *Ipomoea purga* (800 g) were powdered and extracted exhaustively by maceration at room temperature with CHCl₃, to yield after removal of the solvent, a dark brown syrup (28.5 g). The resin glycoside fraction was obtained after fractionation of this extract by open column chromatography over silica gel eluted with a gradient from CHCl₃ until MeOH. A total of 100 fractions (200 mL each one) were generated. Subfractions 40-60 were combined to yield a mixture of lipophilic resin glycosides (3.5 g) which were analyzed by reversed-phase C₁₈ (Waters; 7 μm, 19 × 300 mm) HPLC using an isocratic elution with MeOH, a flow rate of 8 mL/min, and a differential refractometer detector. This procedure confirmed the presence of previously reported resin glycosides through comparison with

reference solutions: purginoside I (19.8 min, peak III), purginoside II (21.9 min, peak IV), and purgin I (29.3 min, peak VI). The eluates across the peaks with t_R values of 16.6 min (peak I), 17.7 min (peak II), 23 min (peak derived from peak IV), and 19 min (peak V) were collected by the technique of “heart cutting” and independently reinjected (sample injection, 500 μ L; concentration, 0.1 mg/mL) to be recycled in order to achieve total homogeneity after twenty consecutive cycles employing an isocratic elution of MeOH with a flow rate of 8 mL/min. These procedures yielded pure compound **1** (13 mg, peak I), **2** (19 mg, peak II), **3** (9 mg, peak IV) and **4** (10.3 mg, peak V).

Purgin II (1): white powder; mp 128-130 °C; $[\alpha]_{589} -58$, $[\alpha]_{578} -60$, $[\alpha]_{546} -68$, $[\alpha]_{436} -108$, $[\alpha]_{365} -154$ (c 0.2, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR, see table 1; negative FABMS m/z 2768 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1383 $[\text{M}/2 - \text{H}]^-$, 1253 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₉H₆O (cinnamoyl)), 1099 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₁₀H₁₈O (decanoyl)), 869 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₅H₈O (methylbutanoyl) – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 707 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₅ (hexose unit)), 561 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 433 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ + H₂O – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 271 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₅ (hexose unit)); negative HRESIMS m/z 2804.4567 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ (calcd for C₁₄₀H₂₂₄O₅₄Cl requires 2804.4480, $\delta = +3.10$), m/z 1383.7262 $[\text{M}/2 - \text{H}]^-$ (calcd for C₇₀H₁₁₁O₂₇ requires 1383.7312).

Purgin III (2): white powder; mp 126-128 °C; $[\alpha]_{589} -89$, $[\alpha]_{578} -92$, $[\alpha]_{546} -104$, $[\alpha]_{436} -164$, $[\alpha]_{365} -228$ (c 0.2, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR, see table 1; negative FABMS m/z 2796 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1397 $[\text{M}/2 - \text{H}]^-$, 1267 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₉H₆O (cinnamoyl)), 1113 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₁₀H₁₈O (decanoyl)), 869 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O (hexanoyl) – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 707 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₅ (hexose unit)), 561 $[\text{M} - \text{H}]^-$

($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 433 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ + H₂O – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 271 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₅ (hexose unit)); negative HRESIMS m/z 2832.4783 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ (calcd for C₁₄₂H₂₂₈O₅₄Cl requires 2832.4793, $\delta = -0.35$), m/z 1397.7474 $[\text{M}/2 - \text{H}]^-$ (calcd for C₇₁H₁₁₃O₂₇ requires 1397.7469).

Purgin IV (3): white powder; mp 136-138 °C; $[\alpha]_{589} -22$, $[\alpha]_{578} -22$, $[\alpha]_{546} -25$, $[\alpha]_{436} -42$, $[\alpha]_{365} -64$ (c 0.2, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR, see table 2; negative FABMS m/z 1381 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1251 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₉H₆O (cinnamoyl)), 1097 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₁₀H₁₈O (decanoyl)), 853 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O (hexanoyl) – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 691 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₅ (hexose unit)), 545 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 417 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ + H₂O – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 271 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)); HRFABMS m/z 1381.7345 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calcd for C₇₁H₁₁₃O₂₆ requires 1381.7515, $\delta = -12.3$).

Purgin IV (4): white powder; mp 130-132 °C; $[\alpha]_{589} -17$, $[\alpha]_{578} -20$, $[\alpha]_{546} -23$, $[\alpha]_{436} -33$, $[\alpha]_{365} -47$ (c 0.03, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR, see table 2; negative FABMS m/z 1251 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1097 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₁₀H₁₈O (decanoyl)), 853 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O (hexanoyl) – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 545 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₅ (hexose unit) – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 417 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ + H₂O – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)), 271 $[\text{M} - \text{H}]^-$ ($[\text{M} - \text{H}]^-$ – C₆H₁₀O₄ (methylpentose unit)); HRFABMS m/z 1251.6970 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calcd for C₆₂H₁₀₇O₂₅ requires 1251.7101).

Alkaline Hydrolysis of the Resin Glycoside Fraction. A solution of the crude resin glycoside mixture (253 mg) in 5 % KOH – H₂O (6.5 mL) was refluxed at 95 °C for 3 h. The reaction mixture was acidified to pH 5.0 and extracted with CHCl₃ (2 × 20 mL) and Et₂O (2 × 20

mL). The organic layers were combined and washed with H₂O, dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated under reduced pressure. The aqueous phase was extracted with *n*-BuOH (40 mL) and concentrated to dryness. The residue from the organic phase was directly analyzed by GC-MS generating three peaks that were identified as 2-methylbutanoic acid (*t_R* 2.0 min): *m/z* [M]⁺ 102 (8), 87 (2), 74 (12), 57 (100); *n*-hexanoic acid (*t_R* 6.5 min): *m/z* [M]⁺ 116 (2), 99 (3), 87 (21), 73 (63), 60 (100), 41 (16), 39 (7); *n*-decanoic acid (*t_R* 7.4 min): *m/z* [M]⁺ 172 (2), 155 (1), 143 (8), 129 (50), 115 (12), 112 (8), 87 (16), 73 (100), 60 (90), 57 (32), 55 (30); cinnamic acid (*t_R* 7.7 min): *m/z* [M]⁺ 148 (84), 147 (100), 131 (22), 103 (42), 102 (21), 77 (28), 74 (5), 51 (12), 50 (5); *n*-dodecanoic acid (*t_R* 8.01 min): *m/z* [M]⁺ 200 (9), 183 (2), 171 (15), 157 (38), 143 (9), 129 (45), 115 (22), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (68), 57 (30), 55 (30). The preparation and identification of 4-bromophenylacetyl (2*S*)-2-methylbutyrate was performed according to previously reported procedures:^{7,10} mp 40-42 °C; [α]_D +18 (c 1.0, MeOH).

The residue obtained from the aqueous phase (12 mg) was methylated with CH₂N₂ to give a residue (45 mg) that was subjected to preparative HPLC on a reverse-phase C₁₈ column (Waters, 7 μm, 19 × 300 mm). The elution was isocratic with MeOH-H₂O (95:5) using a flow rate of 0.4 mL/min affording operculinic acid A methyl ester (4.0 mg, *t_R* 39.25 min; FABMS: [M + H]⁺ *m/z* 1033.5447, C₄₇H₈₄O₂₄) and operculinic acid B methyl ester (1.0 mg, *t_R* 25.14 min; FABMS: [M + H]⁺ *m/z* 1049.5381, C₄₇H₈₄O₂₄). The same mixture (24 mg) was further acetylated (Ac₂O-C₅H₅N, 2:1) and methylated to give a residue that was subjected to preparative HPLC with the same C₁₈ column, an isocratic elution with CH₃CN-H₂O (95:5), and a flow rate of 8.0

ml/min to yield the peracetylated derivatives **8a** (5.0 mg, *t_R* 14.13 min) and **9a** (2.0 mg, *t_R* 10.13 min). These compounds were identified by comparison of their physical and spectroscopic constants NMR with published values.⁸ Individual derivatization as described above for pure compounds **1** and **2** afforded derivative **9a**, while **3** and **4** yielded **8a**.

Sugar Analysis. A solution of the crude resin glycoside (30 mg) in 4N HCl (8 mL) was heated at 90 °C for 2h. The reaction mixture was diluted with H₂O (3 mL) and extracted with Et₂O (20 mL). The aqueous phase was neutralized with 1 N KOH, extracted with *n*-BuOH (20 mL), and concentrated to give a colorless solid (9.0 mg) that was analyzed by HPLC with a standard column for carbohydrate (μBondapak NH₂, 3.9 × 300 mm, 10 μm), using an isocratic elution of CH₃CN-H₂O (17:3), a flow rate of 1 mL/min. Co-elution experiments with standard carbohydrate samples allowed the identification of rhamnose (*t_R* = 5.9 min), fucose (*t_R* = 7.7 min), and glucose (*t_R* = 10.1 min). Each of these eluates was individually collected, concentrated, and dissolved in water for optical activity analysis after stirring the solutions for 2 h at room temperature: L-rhamnose [α]₅₈₉ +8, [α]₅₇₈ +8, [α]₅₄₆ +9, [α]₄₃₆ +15, [α]₃₆₅ +21 (c 0.1, H₂O); D-fucose [α]₅₈₉ +81, [α]₅₇₈ +83, [α]₅₄₆ +94, [α]₄₃₆ +155, [α]₃₆₅ +236 (c 0.1, H₂O); D-glucose [α]₅₈₉ +50, [α]₅₇₈ +51, [α]₅₄₆ +57, [α]₄₃₆ +97, [α]₃₆₅ +150 (c 0.1, H₂O).

Cytotoxicity and Modulation of Multidrug-Resistance Assays. Cytotoxicity and reversal fold of the resin glycosides **1-7** were determined by using the SRB assay.¹⁷ The cells were harvested at log phase of their growth cycle and were treated in triplicate with various

concentrations of the test samples (0.2–25 $\mu\text{g/mL}$) and incubated for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Results are expressed as the concentration that inhibits 50% control growth after the incubation period (IC_{50}). The values were estimated from a semilog plot of the drug concentration ($\mu\text{g/mL}$) against the percentage of growth inhibition. Vinblastine was included as a positive control. The reversal effects as modulators were further investigated with the same method.³ MCF-7 and MDR MCF-7/Vin cells were seeded into 96-well plates and treated with various concentrations of vinblastine (0.00064 – 10 $\mu\text{g/mL}$) in the presence or absence of glycolipids at 25 $\mu\text{g/mL}$ for 72 h as previously described.³ The ability of glycolipids to potentiate vinblastine cytotoxicity was measured by calculating the IC_{50} as described above. In these experiments, reserpine (5 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control. The reversal fold (RF) value, as a parameter of potency, was calculated from dividing IC_{50} of vinblastine alone by IC_{50} of vinblastine in the presence of test compounds.

Intracellular Rh123 accumulation assay. MCF-7 and both MCF-7/Vin cells were seeded at 4.5×10^5 cells per well in 6-well plates and cultured for 24 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO_2 . At 60% of confluence, fresh media containing 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of Rh123, 25 or 5 $\mu\text{g/mL}$ of **1**, and reserpine (5 $\mu\text{g/mL}$) per well, was added and incubated at the same conditions for 120 min. At the end of incubation time, the accumulation of Rh123 was stopped by washing the cells three times with ice-cold PBS, then the intracellular mean fluorescence intensity (MFI) associated with Rh123 was measured with FACScan flow cytometry (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Excitation was performed at 485nm and the emitted fluorescence

was collected through a 530 nm pass filter. Data analysis was performed using Cell Quest software (Figure S35, Supporting Information).

Rh123 efflux assay. Cells were seeded and cultured in the same manner as in the accumulation assay for 24 h. Cells were first incubated with fresh medium containing 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of Rh123 at 37 °C for 120 min, then they were washed three times with Rh123-free medium, and incubated at 37 °C in the presence or absence of **1** (25 or 5 $\mu\text{g/mL}$) and reserpine (5 $\mu\text{g/mL}$) for 0, 10, 20, 30, 50 min. T_0 represents the end of the modulator incubation phase.¹⁸ The MFI was measured as described for the accumulation assay.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Photographs of jalap root (*Ipomoea purga*) (Figure S1). HPLC chromatogram for resin glycoside fraction (Figure S2). Structures for compounds **5-9** as well as for derivatives **8a** and **9a** (Figures S3-S5). ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HMQC and HMBC NMR spectra as well as FABMS and ESIMS of natural products **1-4** (Figures S6-S33). Accumulation and persistence assays (Figures S34 and S35). Modulation assay plates (Figures S36–S42). This material is available free of charge over the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 55 5622-5288. Fax: +52 55 5622 5329. E-mail: pereda@servidor.unam.mx.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN217310) and CONACyT (101380-Q). J. C.-G., and G. F.-G. are grateful to CONACyT for a graduate student scholarship. Thanks are due to Dr. Davinia Mills (BioCentre Facility, University of Reading, UK), Georgina Duarte, and Margarita Guzmán (Facultad de Química, UNAM) for the recording of mass spectra. We also wish to thank Dr. Mabel Fragoso-Serrano (Facultad de Química, UNAM) for HPLC technical assistance.

REFERENCES

- (1) Pereda-Miranda, R.; Rosas-Ramírez, D.; Castañeda-Gómez, J. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer-Verlag: New York, 2010; Vol. 92, Chapter 2, pp 77–152.
- (2) (a) Pereda-Miranda, R.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 406–409. (b) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Jacobo-Herrera, N.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1037–1045. (c) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Gibbons, S. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 222–227. (d) Escobedo-Martínez, C.; Cruz-Morales, S.; Fragoso-Serrano, M.; Rahman, M. M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1796–1801. (e) Corona-Castañeda, B.; Pereda-Miranda, R. *Planta Med.* **2012**, *78*, 128–131.
- (3) Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 93–97.
- (4) Cruz Morales, S.; Castañeda-Gómez, J.; Figueroa-González, G.; Mendoza-García, A. M.; Lorence, A.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1603–1611.
- (5) Castañeda-Gómez, J.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1148–1153.
- (6) Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Escalante-Sánchez, E.; Hernández-Carlos, B.; Linares, E.; Bye, R. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1460–1466.
- (7) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3145–3154.
- (8) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 595–599.
- (9) Pereda-Miranda, R.; Escalante-Sánchez, E.; Escobedo-Martínez, C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 226–230.
- (10) Bah, M.; Chérigo, L.; Taketa, A. T. C.; Fragoso-Serrano, M.; Hammond, G. B.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1153–1157.
- (11) Ono, M.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 3209–3213.

- (12) Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 3163–3168.
- (13) Noda N.; Tsuji K.; Kawasaki T.; Miyahara K.; Hanazono H.; Yang C.R. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1061–1063.
- (14) (a) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9007–9022. (b) Rosas-Ramírez, D.; Escalante-Sánchez, E.; Pereda-Miranda, R. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 773–780.
- (15) Escalante-Sánchez, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1029–1034.
- (16) (a) Escobedo-Martínez, C.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 974–978. (b) Escalante-Sánchez, E.; Rosas-Ramírez, D.; Linares, E.; Bye, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9423–9428.
- (17) (a) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. (b) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.
- (18) Bian-Sheng, J.; Ling, H.; Guo-Qing, L. *Life Sciences.* **2005**, *77*, 2221–2232.

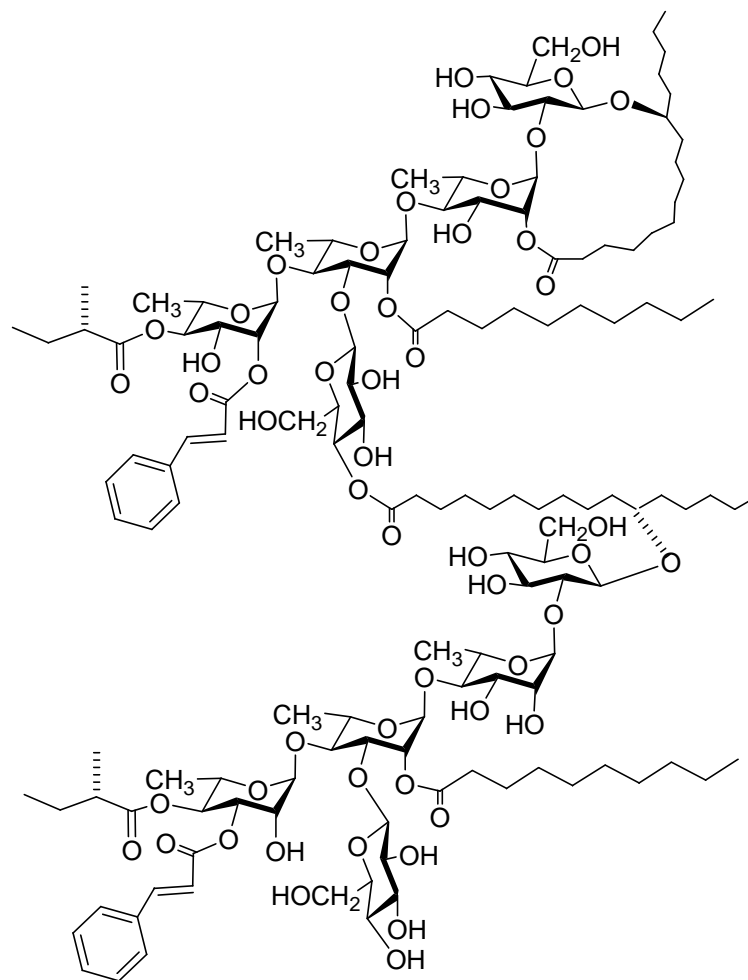


Table 1. ¹H NMR and ¹³C NMR Data of Compounds **1** and **2** (500 MHz)^a

position <i>b</i>	1				2			
	Unit A		Unit B		Unit A		Unit B	
	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C
Glc-1	4.91 d (7.5)	104.4	4.90 d (7.5)	104.4	4.91 d (7.5)	104.5	4.90 d (7.5)	104.5
2	3.88 dd (9.5,7.5)	82.0	3.88 dd (9.5,7.5)	82.0	3.89 dd (9.5,7.5)	82.1	3.89 dd (9.5,7.5)	82.1
3	4.17 t (9.5)	76.6	4.17 t (9.5)	76.6	4.19 t (9.5)	76.6	4.19 t (9.5)	76.6
4	4.1 dd (9.5,9.5)	71.9	4.1 dd (9.0,9.0)	71.9	4.07 dd (8.6,8.6)	71.9	4.07 dd (8.6,8.6)	71.9
5	3.85 ddd (9.5,6.0,3.0)	78.0	3.85 ddd (9.5,6.0,3.0)	78.0	3.80 ddd (3.0,6.0,9.5)	78.3	3.80 ddd (3.0,6.0,9.5)	78.3
6a	4.30 dd (11.5,6.0)	62.8	4.30 dd (11.5,6.0)	62.8	4.30 dd (5.0,11.5)	62.9	4.30 dd (5.0,11.5)	62.9
6b	4.46 dd (11.5,3.0)		4.46 dd (11.5,3.0)		4.43 dd (11.5,3.0)		4.43 dd (11.5,3.0)	
Rha-1	5.59 brs	98.6	5.60 brs	98.5	5.59 brs	98.7	5.60 brs	98.6
2	6.04 dd (3.5,1.0)	73.5	4.5 dd (3.0,1.0)	68.3	6.05 dd (2.0,3.0)	73.5	4.5 dd (1.0,3.5)	68.3
3	5.05 dd (9.5,3.5)	69.5	5.05 dd (9.5,3.5)	69.5	5.05 dd (3.0,9.5)	69.5	5.05 dd (3.5,9.5)	69.5
4	4.17 dd (9.5,9.5)	81.0	4.17 dd (9.5,9.5)	81.0	4.17 dd (9.5,8.5)	81.0	4.17 dd (9.5,8.5)	81.0
5	4.46 dq (9.5,6.0)	69.0	4.46 dq (9.5,6.0)	69.0	4.46 dq (8.5,6.0)	69.0	4.46 dq (6.5,9.5)	69.0
6	1.58 d (6.0)	19.1	1.6 d (6.0)	19.1	1.58 d (6.0)	19.0	1.61 d (6.0)	19.0
Rha'-1	5.94 brs	99.7	5.84 br s	100.2	5.94 d (2.0)	99.8	5.84 brs	100.2
2	6.28 dd (3.0,1.0)	72.8	6.34 d (9.5)	73.3	6.28 dd (3.5,1.0)	72.8	6.35 dd (3.5,2.0)	74.2
3	4.82 dd (9.0,3.0)	79.9	4.82 dd (9.0,3.0)	79.9	4.83 dd (3.5,9.0)	80.0	4.83 dd (3.5,9.0)	80.0
4	4.37 dd (9.5,9.5)	78.1	4.4 dd (9.5,9.5)	78.1	4.4 dd (9.0,9.0)	78.0	4.38 dd (9.0,9.5)	78.0
5	4.37 dq (9.5,6.0)	68.4	4.37 dq (9.5,6.0)	68.5	4.39 dq (9.5,6.0)	68.5	4.39 dd (9.5,6.5)	68.5
6	1.52 d (6.0)	18.0	1.65 d (6.0)	19.0	1.65 brs	19.0	1.54 d (6.5)	18.1
Rha''-1	6.29 br s	99.8	6.27 br s	103.4	6.30 brs	99.8	6.28 brs	103.3

2	6.32 dd (3.0,1.0)	74.2	5.26 (3.0,1.0)	69.2	6.34 dd (3.0,1.0)	73.3	5.26 dd (3.0,1.0)	70.0
3	4.77 dd (10.0,3.0)	68.2	5.99 dd (10.0,3.0)	73.0	4.80 dd (3.0,9.5)	68.2	5.99 dd (3.0,9.5)	73.3
4	5.80 t (10.0,9.5)	74.7	6.08 t (10.0,9.5)	71.7	5.83 t (9.5,9.5)	75.1	6.09 t (10.0,9.5)	72.0
5	4.45 dq (9.5,6.0)	68.2	4.5 dq (9.5,6.0)	68.2	4.5 dq (9.5,6.0)	68.2	4.45 dq (10.0,6.0)	68.2
6	1.67 d (6.0)	19.1	1.43 d (6.0)	17.9	1.68 (6.0)	19.0	1.45 d (6.0)	17.9
Glc'-1	5.11 d (7.5)	105.0	5.12 d (7.5)	105.5	5.11 d (8.0)	105.1	5.12 d (7.5)	105.6
2	3.96 dd (9.0,7.5)	75.0	3.95 dd (9.0,7.5)	75.0	3.96 dd (8.0,8.5)	75.2	3.96 dd (7.5,8.5)	75.2
3	4.10 dd (9.0,9.0)	78.4	4.06 dd (9.0,9.0)	78.4	4.07 dd (8.5,8.5)	78.5	4.07 dd (8.5,8.5)	78.5
4	4.41 dd (9.0,9.0)	78.0	3.96 dd (9.0,9.0)	71.4	4.41 dd (8.5,9.5)	79.0	3.96 dd (8.5,9.5)	71.5
5	3.79 ddd (9.5,6.0,3.0)	78.3	3.79 ddd (9.5,6.0,3.0)	78.3	3.80 ddd (3.0,6.0,9.5)	78.1	3.80 ddd (3.0,6.0,9.5)	78.1
6a	4.09 dd (10.0,6.0)	62.7	4.09 dd (10.0,6.0)	62.7	4.1 dd (5.5,10.0)	63.0	4.1 dd (5.5,10.0)	63.0
6b	4.46 dd (10.0,3.0)		4.46 dd (10.0,3.0)		4.46 dd (10.0,3.0)		4.46 dd (10.0,3.0)	
jal-1		173.4		173.4		173.2		173.4
2a	2.27 ddd (12.5, 8.0, 4.5)	34.4	2.31 ddd (12.5, 8.0, 4.5)	34.4	2.29 ddd (11.0, 7.0, 4.0)	34.3	2.33 ddd (10.5, 6.5, 3.5)	34.3
2b	2.44 m*	34.3	2.48 ddd (14.0, 7.5, 4.5)	34.3	2.44 ddd (12.0, 7.5, 4.0)	34.5	2.49 ddd (13.5, 9.0, 4.0)	34.5
11	3.86*	82.8	3.86*	82.8	3.85*	82.8	3.85*	82.8
16	0.83 t (7.0)	14.3	0.83 t (7.0)	14.3	0.84 t (7.0)	14.4	0.82*	14.4
deca-1		173.8		173.6		173.9		173.6
2	2.37 t (8.0)	34.5	2.33 t (8.0)	34.5	2.35 t (7.5)	34.6	2.28 t (7.5)	34.3
10	0.81 t (7.0)	14.3	0.81 t (7.0)	14.3	0.82 m*	14.4	0.82 m*	14.4
mba-1		176.4		175.9				
2	2.51 tq (7.0, 6.5)	41.5	2.46*	41.6				
2-Me	1.20 d (6.5)	17.0	1.13 d (7.0)	16.9				
3-Me	0.90 t (7.5)	11.7	0.81 t (7.0)	11.8				
hexa-1						173.6		173.2
2					2.43 t (7.5)	34.6	2.32 t (8.0)	34.6
6					0.67 t (7.0)	14.0	0.76 (7.0)	14.0

Cna-1		166.9		166.4		166.9		166.5
2	6.35 d (16)	118.7	6.58 d (16)	118.6	6.38 d (16)	118.7	6.60 d (16)	118.6
3	7.65 d (16)	145	7.84 d (16)	145	7.66 d (15.5)	145.2	7.86 d (16)	145.2

^aData recorded in C₅D₅N. Chemical shifts (δ) are in ppm relative to TMS. The spin coupling (J) is given in parentheses (Hz). Chemical shifts marked with an asterisk (*) indicate overlapped signals. All assignments are based on ¹H-¹H COSY and TOCSY experiments.

^bAbbreviations: fuc = fucose; rha = rhamnose; glc = glucose; jal = 11-hydroxyhexadecanoyl; dec = decanoyl; hex = hexanoyl; mba = 2-methylbutanoyl; Cna = *trans*-cinnamoyl.

Table 2. ¹H NMR and ¹³C NMR Data of Compounds **3-4** (400 and 500 MHz)^a

Position ^b	3		4						
	δ H	δ C	δ H	δ C					
Fuc-1	4.73 d (7.5)	104.3	4.74 d (7.2)	104.7	2	5.26 t (2.5)	69.9	5.0*	69.9
2	4.17 dd (7.5,9.5)	79.9	4.15 dd (9.5,7.2)	80.4	3	6.0 dd (10.0, 3.0)	73.2	4.60 dd (9.2,2.8)	70.8
3	4.04 dd (7.0,2.5)	73.4	4.05*	73.8	4	6.09 t (10.0)	72.0	5.84 t (9.2)	75.9
4	3.95 brs	72.9	3.98 brs	73.3	5	4.48 dq (10.0,5.5)	68.1	4.40 m*	68.6
5	3.74 q (6.0)	70.8	3.77 q (6.0)	71.3	6	1.44 d (6.5)	17.9	1.69 d (4.4)	18.5
6	1.49 d (6.5)	17.3	1.45 d (6.0)	17.8	Glc-1	5.10 d (7.5)	105.5	5.05*	105.9
Rha-1	5.50 d (1.5)	98.5	5.53 brs	98.9	2	3.95 t (9.0)	75.2	4.02 t (7.2)	75.6
2	5.92 dd dd (3.0,1.5)	73.6	5.96 brs	74.1	3	4.10 dd (9.0,9.0)	78.5	4.04*	79.0
3	5.02 dd (3.0, 9.5)	69.3	5.0*	72.9	4	3.94 t (9.0)	71.5	4.0 t (8.8)	72.0
4	4.15 dd (9.5,9.5)	82.0	4.20 t (9.5)	81.8	5	3.80 ddd (2.0,5.5,8.5)	78.1	3.79 ddd (8.4, 5.6,4.0)	78.6
5	4.48 dq (5.5,10.0)	68.9	4.50 dq (6.4,9.5)	69.4	6 ^a	4.10 m*	63.0	4.10 m*	63.3
6	1.64 d (6.5)	19.1	1.67 d (6.4)	19.3	6b	4.40 m*		4.44 m*	
Rha'-1	5.83 brs	100.2	5.95 brs	100.4	jal-1		173.1		173.6
2	6.34 dd (3.5,2.5)	73.4	6.30 brs	73.6	2a	2.26 ddd (15.5,7.5,4.5)	34.3	2.26 m*	34.8
3	4.81 dd (10.0,3.0)	79.9	4.81*	80.6	2b	2.46 ddd (15.0,8.5,4.5)		2.44 m*	
4	4.37 m*	78.9	4.40 m*	79.0	11	3.85 m*	82.3	3.86 m*	82.8
5	4.40 m*	68.9	4.44 m*	68.9	16	0.86 t (7.0)	14.3	0.89 t (6.5)	14.5
6	1.65 d (6.5)	19.0	1.53 d (6.4)	19.6	deca-1		173.5		174.0
Rha''-1	6.29 d (1.5)	103.3	6.29 brs	103.7	2	2.32 t (7.0)	34.5	2.36 m*	35.0
					10	0.84 t (7.0)	14.3	0.89 t (6.5)	14.7
					mba-1				
					2				
					2-Me				
					3-Me				
					hexa-1		173.1		173.9

2	2.43 t (7.5)	34.4	2.47 t (7.2)	34.9
6	0.67 t (7.0)	13.8	0.79 t (7.2)	14.7
Cna-1		166.5		
2	6.60 d (16)	118.6		
3	7.86 d (16)	145.4		

^aData recorded in C₅D₅N. Chemical shifts (δ) are in ppm relative to TMS. The spin coupling (J) is given in parentheses (Hz). Chemical shifts marked with an asterisk (*) indicate overlapped signals. All assignments are based on ¹H-¹H COSY and TOCSY experiments. ^bAbbreviations: fuc = fucose; rha = rhamnose; glc = glucose; jal = 11-hydroxyhexadecanoyl; dec = decanoyl; hex = hexanoyl; mba = 2-methylbutanoyl; Cna = *trans*-cinnamoyl

Table 3. Modulation of Vinblastine Cytotoxicity in Drug Sensitive MCF-7 and Multidrug-Resistant MCF-7/Vin by Resin Glycosides **1-7**.

compound ^a	IC ₅₀ (μ g/mL)				reversal fold ^c	
	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺	MCF-7 sens	RF _{MCF-7/Vin⁻}	RF _{MCF-7/Vin⁺}	RF _{MCF-7 sens}
vinblastine	1.08 \pm 0.06	1.37 \pm 0.23	0.047 \pm 0.01			
1	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1687.5	>2140.6	>73.4
2	0.168 \pm 0.01	0.210 \pm 0.11	0.01 \pm 0.05	6.4	6.5	4.7
3	0.92 \pm 0.07	0.75 \pm 0.03	0.022 \pm 0.16	1.2	1.8	2.1
4	0.325 \pm 0.08	0.46 \pm 0.16	0.019 \pm 0.09	3.3	3.0	2.5
5	0.384 \pm 0.2	0.472 \pm 0.02	0.062 \pm 0.3	2.8	2.9	0.8
6	0.88 \pm 0.3	0.98 \pm 0.19	0.034 \pm 0.02	1.2	1.4	1.4
7	0.229 \pm 0.04	0.362 \pm 0.01	0.016 \pm 0.02	4.7	3.8	2.9
reserpine ^b	0.037 \pm 0.01	0.31 \pm 0.19	0.003 \pm 0.001	29.2	4.4	15.7

^aSerial dilutions from 0.00064 to 10 μ g/mL of vinblastine in the presence or absence of glycolipid (25 μ g/mL). ^bReserpine = 5 μ g/mL as positive control. ^cRF = IC₅₀ Vinblastine/IC₅₀ Vinblastine in the presence of glycolipid. Each value represents the mean \pm SD from three independent experiments.

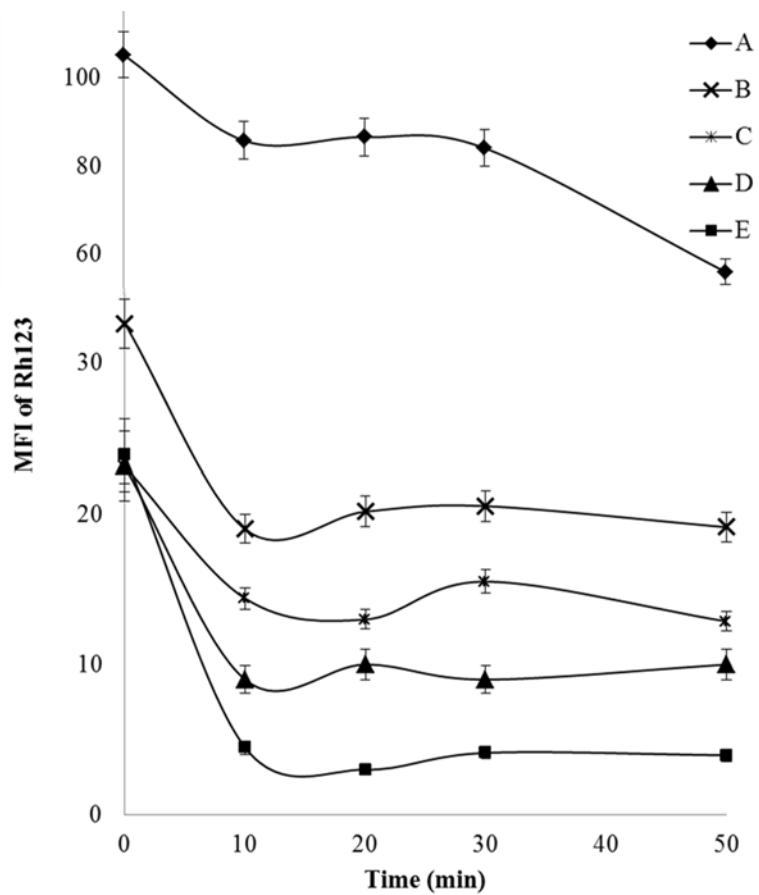


Figure 1. Effect of purgin II (**1**) on the Rh123 efflux assay in the MCF-7 drug sensitive and MCF-7/Vin cell lines. A: untreated MCF-7 drug sensitive cells, B: 25 $\mu\text{g/mL}$ of **1** in MCF-7/Vin⁻ C: 5 $\mu\text{g/mL}$ of reserpine in MCF-7/Vin⁺, D: 25 $\mu\text{g/mL}$ of **1** in MCF-7/Vin⁺ and E: Untreated as a negative control in MCF-7/Vin⁺. Each point represents the mean \pm S.D from three independent experiments.