



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**DITERPENOS DERIVADOS DE *Jatropha dioica* MODULAN
LA MULTIRESISTENCIA A FÁRMACOS EN LÍNEAS
CELULARES DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO**

Tesis que presenta

Miriam Sarahi Lozano Gamboa

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda

San Luis Potosí, S.L.P., junio 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Terpenos derivados de *Jatropha dioica* modulan la multiresistencia a fármacos en líneas celulares de carcinoma mamario humano” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por

Miriam Sarahi Lozano Gamboa y aprobada el **día de mes de año** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Codirector de la tesis

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda

Codirector de la tesis

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Miembro del Comité Tutorial



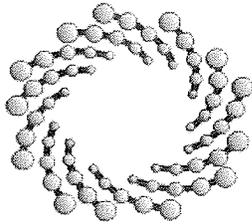
Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de Química de Productos Naturales
(CIIDZA)

y Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la
codirección los doctores Luis Antonio Salazar Olivo y Francisco Elihú Bautista
Redonda.

La tesis se redactó en el formato de un artículo de investigación original siguiendo
las instrucciones para autor de la revista Journal of Natural Products, editada por
The American Chemical Society.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (893409) y del Instituto Potosino de
Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 209 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de diciembre del año 2020, se reunió a las 12:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Presidente	IPICYT
Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Miriam Sarahi Lozano Gamboa

sobre la Tesis intitulada:

*Terpenos derivados de *Jatropha dioica* modulan la multiresistencia a fármacos en líneas celulares de carcinoma mamario humano*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

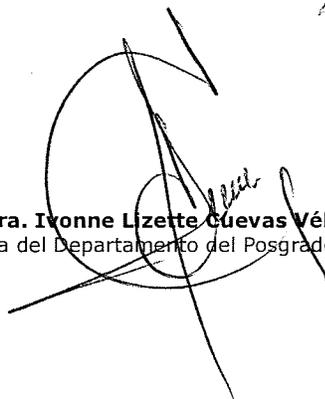
El Jurado, después de deliberar, determinó

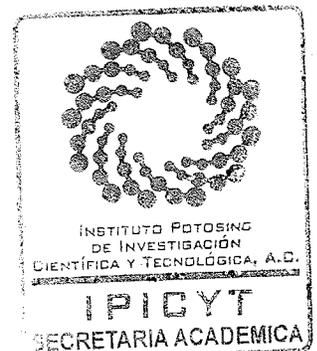
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de diciembre de 2020.


Dr. Manuel Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado





CARTA DE AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ TUTORAL

División de Biología Molecular

Maestría en Ciencias en Biología Molecular

San Luis Potosí, S.L.P., a 17 de noviembre de 2020

Dr. J. Sergio Casas Flores

Coordinador Académico del Programa de
Maestría en Ciencias en Biología Molecular

PRESENTE

Por medio de la presente, le informamos que después de haber revisado el trabajo de Tesis de Maestría del (la) estudiante Miriam Sarahi Lozano Gamboa, no encontramos inconveniente alguno para que pueda llevarse a cabo el Examen de Grado ante un jurado.

Atentamente,

COMITÉ TUTORAL	
Nombre de Investigador	Firma de Aceptación
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	
Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda	

*Este formato será entregado por el alumno en el Departamento del Posgrado.

Dedicatorias

A mi familia y amigos que me apoyaron durante todo el proceso, a pesar de la distancia y el poco tiempo, gracias por impulsar este sueño.

A mis tutores, gracias por el esfuerzo invertido en este proyecto y por creer en mí.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (893409) otorgada.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por la oportunidad de estudiar en sus instalaciones, así como a todo el personal administrativo y en especial a los profesores del departamento de biología molecular por todo el apoyo y las enseñanzas.

Gracias en especial al Dr. Luis Salazar Olivo y al Dr. Elihú Bautista Redonda por la confianza que me dieron al incluirme en su equipo de trabajo y guiarme durante todo el desarrollo personal y académico que necesite para lograr este proyecto.

Muchas gracias al Dr. Rogelio Pereda Miranda y a la Dra. Mabel Fragoso Serrano por permitirme trabajar en su laboratorio, gracias por el tiempo y la paciencia, así como a los compañeros del laboratorio 123 de la facultad de química de la UNAM.

Estoy muy agradecida por las personas que conocí durante estos 2 años y principalmente quisiera agradecer a mis compañeros ahora amigos del laboratorio CIIDZA, por los buenos momentos que vivimos, el tiempo y los consejos que compartimos.

Por último pero no menos importante quisiera agradecer a mi familia y amigos de Aguascalientes que me brindaron su apoyo incondicional.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de Figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv

INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	7
_Purificación y caracterización de diterpenos de <i>Jatropha dioica</i>	7
_Derivados de citlaltitrona	8
_Reacción con tonsil	9
_Reacción con DBU	9
_Reacción con cianoborohidruro de sodio	9
_Ensayos de citotoxicidad	9
_Ensayos de modulación de MDR	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
_Caracterización de los diterpenos	12
_Derivados de citlaltitrona	17
_Ensayos de citotoxicidad	19
_Ensayos de modulación de la MDR	20
CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS	27
MATERIAL SUPLEMENTARIO	35

Lista de tablas

Tabla 1. Citotoxicidad de los compuestos en distintas líneas celulares	19
--	----

Lista de Figuras

1. Espectros de RMN ^{13}C y ^1H de la citlalitriona	13
2. Espectros de RMN ^{13}C de las Jatrolonas A y B	14
3. Espectros de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto JDM-2	15
4. Espectros de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto JDM-3	16
5. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C del compuesto JDM-3 con la citlalitriona	16
6. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C de los derivados de citlalitriona.	17
7. Efecto de la citlalitriona sobre la CI50 de líneas celulares resistentes MCF-7.	21
8 Efecto de las Jatrolonas A y B sobre la CI50 de líneas celulares resistentes MCF-7.	22
9 Efecto de los derivados de citlalitriona sobre la CI50 de líneas celulares resistentes MCF-7.	23
10 Efecto de las de los compuestos JDM-2 y JDM-3 sobre la CI50 de líneas celulares resistentes MCF-7.	24
11. Diversidad de Diterpenos de tipo Jatrofano.	25

Anexos

Tablas de los disolventes utilizados como fases móviles en las columnas de las diferentes fracciones	35
Espectro de ^1H obtenidos por RMN del compuesto JDM-5	42
Espectro de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto JDM-5	42
Espectro de ^1H obtenidos por RMN del compuesto JDM-7	43
Espectrometría de masas JDM-2	43
Espectrometría de masas JDM-3	44
Espectrometría de masas DC-1	44
Espectrometría de masas DC-2	45
Espectrometría de masas DC-4	45
Espectros de correlación (COSY) del compuesto JDM-2	46
Espectros de correlación (COSY) del compuesto DC-1	47
Espectros de correlación (COSY) del compuesto DC-2	48
Espectros de correlación (COSY) del compuesto DC-4	49
Tabla. Ci_{50} de la vinblastina con los compuestos aislados sobre las líneas MCF-7 sensible y los fenotipos resistentes MCF-7/Vin+ y MCF-7/Vin –.	50

Abreviaturas

MDR	Resistencia A Múltiples Fármacos
P-gp	Glicoproteína P
MRP1	Proteína De Resistencia A Múltiples Fármacos 1
BCRP	Proteína De Resistencia Al Cáncer De Mama
ABC	Casete De Unión A ATP
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
CI₅₀	Concentración Inhibitoria 50

Resumen

Dierpenos derivados de *Jatropha dioica* modulan la multiresistencia a fármacos en líneas celulares de carcinoma mamario humano

La multiresistencia a fármacos (MDR, *multidrug resistance*) es la principal causa de fracaso de la quimioterapia en cáncer, por lo que nuevas moléculas farmacológicamente activas pueden contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos que resuelvan este problema. Estudios previos muestran que los terpenos naturales modulan positivamente la MDR. *Jatropha dioica* (Euphorbiaceae), una planta usada en la medicina tradicional mexicana, contiene diterpenos cuyas propiedades terapéuticas aún se desconocen. A partir de un extracto de raíces de *Jatropha dioica* obtenido con diclorometano:metanol (1:1) mediante procesos cromatográficos aislamos citlalitrona, las jatrofolonas A y B, y dos nuevos compuestos a los que designamos JDM-2 y JDM-3; todos ellos se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas. Sintetizamos derivados de la citlalitrona utilizando como catalizadores los reactivos tonsil (arcilla bentonítica), DBU (1,8-Diazabicycloundec-7-eno) y Cianoborohidruro de sodio. La citotoxicidad de los metabolitos y derivados aislados se determinó sobre células MCF-7, RAW, Hela, PC3, HCT15 y HCT116 y su efecto sobre MDR se evaluó en células MCF-7 resistentes a vinblastina. Los metabolitos aislados y los derivados de la citlalitrona resultaron inocuos para todas las líneas celulares a 25 µg/ml. Todos los compuestos mostraron valores de IC₅₀ menores que la vinblastina, pero mayores a los obtenidos con reserpina, el compuesto de referencia para MDR. Las jatrofolonas (A y B) y el derivado 1 de citlalitrona fueron los compuestos más eficientes al exhibir valores de reversión 15.4 y 24.917 en la línea celular (V-). Nuestros resultados muestran que *Jatropha dioica* contiene diterpenos de tipo jatrofano que modulan la MDR y pueden ser útiles para la elaboración de nuevos fármacos anticancerígenos.

PALABRAS CLAVE.

Resistencia a fármacos, cáncer de mama, diterpenos, *Jatropha dioica*, quimioterapia.

Abstract

Diterpenes derived from *Jatropha dioica* modulate multidrug resistance in human mammary carcinoma cell lines

Multidrug resistance (MDR) is the main cause of chemotherapy failure in cancer, so new pharmacologically active molecules can contribute to the development of new treatments that solve this problem. Previous studies show that natural terpenoids positively modulate MDR. *Jatropha dioica* (Euphorbiaceae), a plant used in traditional Mexican medicine, contains diterpenes whose therapeutic properties are still unknown. From an extract of *Jatropha dioica* roots obtained with dichloromethane: methanol (1: 1), by chromatographic processes we isolated citlalitrione, jatropholones A and B, and two new compounds which we designated JDM-2 and JDM-3; all of them were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry. We synthesized citlalitrione derivatives using the reagents tonsil (bentonite clay), DBU (1,8-Diazabicycloundec-7-ene) and sodium cyanoborohydride as catalysts. The cytotoxicity of metabolites and derivatives was determined on MCF-7, RAW, HeLa, PC3, HCT15 and HCT116 cells and their effect on MDR was evaluated in vinblastine resistant MCF-7 cells. The isolated metabolites and those derived from citlalitrione were innocuous for all cell lines at 25 µg / ml. All compounds showed IC₅₀ values lower than vinblastine, but higher than those obtained with reserpine, the reference compound for MDR. Jatropholones (A and B) and citlalitrione derivative 1 were the most efficient compounds, exhibiting reversion values 15.4 and 24.917 in the cell line (V-). Our results show that *Jatropha dioica* contains jatrophane-type diterpenes that modulate MDR and may be useful for the development of new anticancer drugs.

KEY WORDS.

Drug resistance, breast cancer, diterpenes, *Jatropha dioica*, chemotherapy

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la primera neoplasia maligna en el mundo [1]; según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (15,0%). En México se estima un incremento cercano a 16 500 nuevos casos anuales para 2020 [2].

El éxito en el tratamiento contra el cáncer de mama depende de su diagnóstico temprano, el tratamiento consiste principalmente en terapias locales y sistémicas pero en cánceres más avanzados, se requiere de tratamientos sistemáticos, combinados y agresivos que incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la terapia anti-hormonal. De estos, la quimioterapia es el tipo de tratamiento más comúnmente usado [3]

Desafortunadamente, el riesgo de que los tumores adquieran resistencia a la quimioterapia sigue siendo un obstáculo significativo para el tratamiento exitoso de varios tipos de cáncer [4]. La resistencia a múltiples fármacos (MDR, *multidrug resistance*) es un fenómeno por el cual las células cancerosas desarrollan resistencia a fármacos anticancerígenos, disminuyendo la eficiencia de éstos [5].

La MDR constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el cáncer.

Actualmente el 90% de los fracasos en el tratamiento de cáncer, se atribuyen a cánceres relacionados con MDR [6].

El desafío principal en la quimioterapia es administrar una dosis de medicamento que maximice la eficacia y minimice la toxicidad del compuesto, un fenotipo de cáncer resistente implica un mayor número de fármacos a administrar, y dosis mayores se vuelven necesarias, teniendo mayores efectos adversos en el paciente sin que el cáncer pueda ser eliminado. La MDR puede presentarse en una diversidad de cánceres humanos, en el caso del cáncer de mama ocurre con frecuencia durante el tratamiento del carcinoma avanzado de mama, donde los tumores generalmente consisten en poblaciones mixtas de células malignas, algunas de las cuales son sensibles a los anticancerígenos, mientras que otras son

resistentes, consiguiendo que los fármacos logren eliminar únicamente a las células sensibles, dejando una mayor proporción de células resistentes en el cuerpo, que, a medida que se multiplican y el tumor empieza a crecer nuevamente, provocando la regresión del cáncer [7].

Las células se vuelven resistentes por diferentes mecanismos, de forma intrínseca o extrínseca. En el primer caso encontramos la naturaleza explícita o a varias características genéticas de las células que exhiben resistencia a la quimioterapia en su exposición inicial al anticancerígeno, mientras que, en el segundo caso, se atribuyen alteraciones genéticas seguidas de la exposición a la quimioterapia. Esta última es la forma más problemática de MDR, ya que conduce al fracaso de la quimioterapia, incluso después de una escalada de dosis de antitumorales hasta niveles tóxicos. En el caso de la MDR intrínseca, no se utilizan métodos de detección o fármacos que puedan revertirla o prevenirla en conjunto con la quimioterapia [8,6].

Probablemente, el mecanismo de resistencia más estudiado es la expulsión del fármaco en las células a través del transporte activo [4]. La aparición del fenotipo resistente en células cancerígenas es mediado por una proteína transmembranal, miembro de la superfamilia de transportadores ABC (Casete de unión a ATP) llamada glicoproteína-p (P-gp) [9]. Si bien el flujo de salida a través de transportadores ABC es un proceso fisiológico normal, posteriormente se descubrieron otras proteínas transportadoras relacionadas con el fenotipo celular multiresistente como la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) [10,11]. Estos tres transportadores son considerados promiscuos debido a su in-especificidad, por lo que pueden expulsar una amplia gama de xenobióticos de las células y de fármacos, los cuales incluyen alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina), podofilotoxinas, antraciclinas, taxanos e inhibidores de quinasas. Este mecanismo, protege a las células cancerosas de quimioterapias de primera línea [12-15]. Desde entonces, al menos 49 transportadores relacionados estructuralmente, conocidos colectivamente como la superfamilia ABC, han sido identificados y categorizados en siete subfamilias en mamíferos. De estos, 16 están principalmente relacionados a enfermedades en humanos [16]. Estas proteínas están compuestas por dos

dominios citoplasmáticos que se unen al ATP (ABC) altamente conservados y dos dominios transmembranales menos conservados [17]. Existe una alta homología especialmente entre transportadores de una subfamilia en particular. Los transportadores se asignan a una subfamilia específica, si, la proteína comparte al menos un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con otros miembros. [18] La mayor parte de la similitud de secuencia se encuentra dentro de los dominios de unión a nucleótidos, que generalmente se conservan entre los miembros de la superfamilia ABC [19].

Pese a que comúnmente los transportadores ABC han sido el mecanismo de MDR más estudiado, diferentes investigaciones han relacionado a otros mecanismos celulares y moleculares de MDR que no involucran a estos transportadores, adquiridos en la célula cancerosa mediante el daño del ADN y modificaciones epigenéticas, alteración del blanco farmacológico, alteración del punto de control del ciclo celular y la detención del ciclo celular, la heterogeneidad intratumoral, el secuestro de fármacos en lisosomas y otras vesículas intercelulares, y el microambiente tumoral por mencionar algunos [20-22, 6].

Para mejorar la eficacia de la quimioterapia, las estrategias para revertir la MDR se han estudiado ampliamente en las últimas décadas, principalmente se han identificado sustratos específicos para cada transportador y la relación entre la sobreexpresión de los transportadores ABC y los genotipos resistentes [23]. Por lo que el desarrollo de inhibidores de las bombas de extrusión, se perfilan como una alternativa que coadyuve el tratamiento de este padecimiento. Los primeros inhibidores de los transportadores ABC descritos como el verapamilo y la ciclosporina presentan diferentes desventajas, pues una eliminación y metabolismo deficientes hicieron que estos agentes fueran demasiado tóxicos para la aplicación clínica [24].

A pesar del pesimismo sobre el uso de inhibidores de P-gp, la búsqueda de inhibidores no tóxicos continua, y la principal fuente de estos han sido los productos naturales. En este contexto, el uso de preparaciones medicinales con productos derivados de plantas es antiguo; sin embargo, para el año 2005 el 57% de todos los medicamentos en ensayos clínicos para el cáncer fueron productos naturales y/o

sus derivados [25]. En el caso de la MDR se han probado productos naturales de diferentes orígenes químicos como los alcaloides, flavonoides, glicósidos de carotenoides y terpenos, entre otros [26]. De estos, destacan los diterpenos, que han mostrado efectos promisorios como moduladores de la MDR, debido a su baja toxicidad, y a que funcionan como sustratos, inhibidores o supresores de la transcripción de los genes que codifican para transportadores de membrana en las células cancerosas [27]. La disminución en los niveles de transcripción de diferentes transportadores, sugiere que estos comparten factores de transcripción similares, los cuales pueden ser modulados [28].

Para el 2002 ya se habían reportado 10,541 compuestos diterpenos [29]; por lo que es uno de los grupos con mayor diversidad química y que más ha sido estudiado como moduladores de la multiresistencia en cáncer de mama. Diferentes grupos de investigación han trabajado con diterpenos provenientes del metabolismo secundario de plantas de la familia Euphorbiaceae. Desde 1994, se han aislado 65 diterpenos de 11 especies del género *Euphorbia* [30]. Estos diterpenos comparten similitudes estructurales únicas, siendo uno de los compuestos más destacados el eufosorofano A, un diterperno de tipo jatrofano de *Euphorbia sororia*, el cual tiene alta potencia para revertir la resistencia mediada por P-gp y una baja citotoxicidad [31]. De *Euphorbia lathyris* se lograron aislar dos nuevos diterpenos Euphorbia factor L 7a y Euphorbia factor L 2, que resultaron ser potentes moduladores de la MDR. La relación de su estructura con la actividad biológica se discutió desde el aspecto de diferentes esqueletos y sustituyentes, y se propusieron moduladores de 5 tipos (jokinol, isolatirol, epoxilatirol, 7-hidroxiatirol, latirol). Seis años después describieron el factor Euphorbia L 3, un diterpeno tipo latirol, que debe su potente inhibición de P-gp a las interacciones hidrófobas y los enlaces de hidrógeno en la cavidad flexible de la proteína P-gp [32,33]. Por el contrario, pubesceno B aislado de *Euphorbia pubescens* logró la inactivación de la proteína MPR1 [34]. El diterpeno nombrado J196-9-4 de *Euphorbia prolifera* también es un inhibidor competitivo de P-gp [35]. Los diterpenos de tipo jatrophano de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. (otra planta perteneciente a las Euforbiáceas), mediante la inhibición de P-gp lograron revertir la MDR de diferentes líneas celulares [36]. Todos estos diterpenos presentan características en común como una estructura bicíclica.

La familia Euphorbiaceae cuenta con 300 géneros y alrededor de 7500 especies, entre las que comprenden especies de interés para el humano como *Jatropha dioica* o Sangre de Drago perteneciente al género *Jatropha*. *Jatropha dioica* es un arbusto de aproximadamente 70 cm de altura, con tallos oscuros, tienen savia que al contacto con el ambiente, se torna rojiza (látex rojizo) [37]. En México, habita en matorrales xerófilos del Noroeste hasta el centro del país [38]. Esta planta es comúnmente considerada como medicinal, sus usos etnobotánicos más conocidos son como tónico capilar, en la ayuda de problemas dentales y de piel [39-41]. Se han realizado estudios con el extracto de esta planta que ha mostrado ser una fuente de agentes antimicrobianos, también tiene un efecto quimioprotector y actividad antioxidante [42-44].

Diversos diterpenos han sido caracterizados del extracto preparado de las raíces, entre los más destacables se encuentran la citlalitriona [45], con una estructura química similar a la jatrofatriona aislada de *Jatropha microrhiza* [46] entre sus similitudes estructurales se incluye un núcleo tricíclico [47], la jatrofatriona posee actividad inhibidora hacia el sistema de prueba de leucemia linfocítica P-388 (3PS) [46]; otros diterpenos aislados de esta planta son las jatrolonas A y B [48]; de ellos se ha reportado que la jatrolona B tiene un efecto gastroprotector [49].

El extracto alcohólico de *J. gossypifolia* mostró una actividad inhibidora contra las células KB y antitumoral en modelos animales, de este extracto se aisló la jatrolona [50]; de *Jatropha dioica* se aisló la riolozatriona, otro diterpeno destacable en esta planta porque tiene actividad quimioprotectora y antiviral. [51-54].

Para evaluar la efectividad de los medicamentos contra el cáncer, es esencial utilizar un sistema de prueba viable que realmente represente la enfermedad tal como aparece en humanos. Actualmente los modelos *in vitro* más utilizados incluyen líneas uni y multicelulares, así como células madre. Las líneas celulares son un fuerte pilar en el cribado de fármacos contra el cáncer. Además, es relativamente fácil realizar la manipulación genética de estas células, lo que puede proporcionar información sobre las mutaciones genéticas que ocurren en las células cancerosas, correlacionando así con los tejidos tumorales. Esencialmente, los enfoques *in vitro*

refinan los resultados preclínicos antes de avanzar a ensayos en animales y humanos; reduciendo preocupaciones éticas, tiempo y costo [55,56].

Algunas líneas celulares han probado ser mejores modelos para estudiar la resistencia a quimioterapia, debido a algunas características como la expresión generalizada de P-gp tanto en cánceres intrínsecamente resistentes a los fármacos como los de colon, páncreas, hígado, adrenocortical y riñón, así como en algunos cánceres que adquieren resistencia fácilmente, como leucemias, linfomas, cáncer de mama y neuroblastoma. [57,58]

En cuanto al cáncer de mama resistente a fármacos, la línea celular MCF-7 es la más comúnmente utilizada como modelo, debido a que se han desarrollado líneas celulares derivadas resistentes a diferentes fármacos como colchicina, doxorubicina, vinblastina, docetaxel, paclitaxel, etoposido y flavopiridol. Estas sublíneas han sido producidas mediante de selecciones de uno o varios pasos y en su mayoría se ha encontrado la sobreexpresión de los genes ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MPR1) y ABCG2 (BCRP). [59] Por lo que demuestra ser una línea celular modelo adecuada para las investigaciones relacionadas con los medicamentos contra el cáncer y tiene la gran ventaja de estar muy bien caracterizada, debido a la impresionante cantidad de artículos que la han descrito. [60]

El objetivo de este trabajo fue la extracción y purificación de diterpenos a partir del extracto de raíz de *Jatropha dioica* y el análisis de su capacidad para modular la multiresistencia a vinblastina en dos fenotipos de la línea celular de cáncer de mama MCF- 7

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Los tallos y raíces de *Jatropha dioica* fueron recolectadas en las afueras de Mexquitic de Carmona en el estado de San Luis Potosí, en el año 2016 se localiza al oeste del estado entre las coordenadas geográficas 22° 16' de latitud norte y 101° 07' de longitud oeste.

Purificación y caracterización de diterpenos de *Jatropha dioica*. Con el fin de aislar terpenos de *Jatropha dioica*, las raíces secas y molidas (800 g) se sometieron a extracción por maceración con una mezcla CH₂Cl₂/MeOH 1:1 (3 x 4 L) durante 3 días. Posterior a esto el extracto resultante (94 g) se sometió a partición entre hexano (1 L) y una mezcla MeOH/H₂O 4:1 (1 L). La fracción hexánica dejó un residuo de 21.4 g y a la porción hidroalcohólica se le eliminó el MeOH por destilación a presión reducida, se adicionó agua (800 mL) y se particionó con AcOEt. La fracción de AcOEt dejó un residuo de 69.8 g. Una porción de la fr hexánica (14 g) se adsorbió en sílica gel (Merck, 63-200 µm) y se sometió a cromatografía en columna (CC) por gravedad a (5 cm diámetro (D), 10.0 cm altura (h), fracciones (frs) de 250 mL) eluyendo de la siguiente manera: hexano/CH₂Cl₂ 1:1 (frs. 1-6), CH₂Cl₂ (frs. 7-12), CH₂Cl₂/acetona 95:5 (frs. 13-21), CH₂Cl₂/acetona 90:10 (frs. 22-28), CH₂Cl₂/acetona 80:20 (frs. 29-35), CH₂Cl₂/acetona 70:30 (frs. 36-43), CH₂Cl₂/acetona 50:50 (frs. 44-51), acetona (frs. 52-56). Las fracciones se concentraron por destilación a presión reducida y se analizaron por cromatografía en capa fina (Ccf) en placas de sílica gel utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las placas se revelaron con sulfato sérico en ácido sulfúrico 2N. Las fracciones se agruparon de la siguiente manera: frs 1-2 (A), frs 3-6 (B), frs 7-10 (C), frs 11-16 (D), frs 17-25 (E), frs 26-33 (F), frs 34-37 (G), frs 38-42 (H), frs 43-45 (I) y frs 46-52 (J).

En base a los perfiles cromatográficos de las fracciones, algunas de ellas fueron nuevamente fraccionadas por cromatografía en columna (Cc).

La fr A (0.87 g) se sometió a cc (2.5 (D) x 8.5 cm (h), frs 50 mL) eluyendo con una mezcla hexano/AcOEt 90:10 (frs. 1-11) y hexano/AcOEt 80:20 (frs 12-16). La fr. B (500 mg) se sometió a cc de sílice (2.5 x 7.5 cm, 50 mL) eluyendo con mezclas

hexanos/AcOEt 90:10 (frs. 1-14), hexanos/AcOEt 80:20 (frs. 15-25). De la fr C se obtuvo un sólido cristalino, se lavó con hexano caliente y los cristales fueron recristalizados de CH₂Cl₂ para dar 700 mg de JDM-1. Las Frs c (7-8) se sometieron a cc de sílice (2.2 x 10.8 cm, 25 ml) eluyendo con hexano: AcOEt 95:5 (frs 1-12), hexano: AcOEt 92.5:7.5 (13-34), hexano: AcOEt 90:10 (35-46). La fr D (1.33 g) se sometió a cc de sílice (3.0 x 9.0, 50 mL) eluyendo con CHCl₃-AcOEt 98:2 (frs 1-10), CHCl₃-AcOEt 95:5 (frs. 11-18), CHCl₃-AcOEt 90:10 (frs. 19-26). La fr. E (0.96 g) se sometió a cc de sílice (2.7 x 9.5 cm, 25 mL) eluyendo con CH₂Cl₂-acetona 98:2 (frs. 1-10), CH₂Cl₂-acetona 95:5 (frs. 11-17), CH₂Cl₂-acetona 90:10 (frs. 18-26). La fr F (0.61 g) se sometió a cc de sílice (2.0 x 9.5 cm, 25 ml) eluyendo con CHCl₃-acetona 95:5 (frs. 1-10), CHCl₃-acetona 90:10 (frs. 11-39). Las frs 14-19 (0.23 g) se sometió a cc de sílice fase reversa (1.8 x 7 cm, 25 ml) eluyendo con MeOH H₂O 90:10 (frs 1-6) MeOH (frs 7-14). De acuerdo al análisis por ccf la frs 7 (0.0104 g) se pesó y nombró JDM-4. Las frs 25-37 (0.144 g) se sometieron a cc de sílice (2 x 10 cm, 25 ml) eluyendo con Hexano- AcOEt 50:50 (frs 1-5) Hexano- AcOEt 30:70 (frs 6-12). De acuerdo al análisis por ccf se reunieron las frs 6-9. Estas frs 6-9 (0.129 g) se sometieron a cc de sílice fase reversa (2 x 9 cm, 25 ml) eluyendo con MeOH H₂O 70:30 (frs 1-5) MeOH H₂O 80:20 (frs 6-11). De acuerdo al análisis por ccf se reunieron las frs 5-7 (25.7 mg) se nombró JDM-5. La fr G (0.63 g) se sometió a cc de sílice (2.0 x 7.8 cm, 25 ml) eluyendo con hexano- AcOEt 30:70 (frs 1-21). De la fr H se obtuvo un sólido blanco (16.5 mg) el cual se nombró JDM-6. Las fr I-J (0.488 g) se sometieron a cc de sílice (2 x 8.7 cm, 25 ml) eluyendo con CHCl₃: MeOH 98:2 (frs 1-7) CHCl₃: MeOH 95:5 (frs 8 -18) CHCl₃: MeOH 90:10 (frs 19-27).

Derivados de citlaltiriona. Buscando encontrar compuestos moduladores de la MDR y obtener información sobre la interacción de los transportadores de membrana y los terpenos se probaron tres metodologías diferentes para derivatización de la citlaltiriona.

Reacción con tonsil (Arcilla Bentonítica). Fueron sometidos 25 mg (75.75 μ mol) de citlaltiriona a una reacción con 44.6 mg de tonsil, en 5 ml de CHCl_3 durante 24 horas a temperatura ambiente (25°C) y agitación constante, la reacción se filtró con 5 ml de CHCl_3 y 5 ml de acetona, obteniendo una fracción de 28.5 mg la cual se sometió a CC de sílice (1 cm (D) x 8.2 cm (h), frs 5 ml) eluyendo con hexano:AcOEt 99:1 (frs 1-5), 97:3 (Frs 5-10), 95:5 (Frs 11-20), 90:10 (Frs 21-30) 80:20 (frs 31-37). De acuerdo al análisis por ccf se reunieron las frs 2-6 (8.5 mg) se nombró DC-1 y las frs 35-37 (29.1 mg) nombrada DC-2.

Reacción con DBU (1,8-Diazabicycloundec-7-eno). Diluidos en 2 ml de MeOH, 25 mg (75.75 μ mol) de citlaltiriona se pusieron a reaccionar con 25 μ l de DBU (base no nucleofílica) durante 24 horas a 50°C en agitación constante, obteniendo una fracción de 72.3 mg la cual se sometió a cc de sílice (2.2 cm (D) x 7 cm (h), frs 25 ml) eluyendo con hexano: AcOEt 80:20 (frs 1-10), 70:30. De acuerdo al análisis por ccf se reunieron las frs 11-13 (7.4 mg) la cual se identificó como DC-3 y la fr 18 (20.5 mg) conocida como DC-4.

Reacción con cianoborohidruro de sodio. Se pesaron 25 mg de citlaltiriona disueltos en 10 ml de MeOH. A la mezcla resultante se le adicionaron 28.7 mg de cianoborohidruro de sodio disuelto en 10 ml de ácido acético al 10% (v/v), la adición se realizó en frío, después se dejó durante 30 horas a 50°C , la reacción se detuvo con 3 ml de una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo utilizando 40 ml de acetato de etilo y se destiló a presión reducida para obtener un residuo final de, 81.3 mg los cuales fueron sometidos a cc (2.5 cm (D) x 8 cm (h), frs 20 ml) eluyendo con hexano:AcOEt 90:10 (frs 1-7), 80:20 (Frs 8-14), 70:30 (Frs 15-21), 60:40 (Frs 22-26), 10:90 (Frs 27-32).

Ensayos de citotoxicidad. Con base a los resultados obtenidos de la resonancia magnética nuclear, se probó la citotoxicidad de los compuestos que resultaron de interés en diferentes líneas celulares de carcinomas humanos, las líneas celulares

utilizadas en este proyecto fueron donadas por el laboratorio del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM. Las células se descongelaron y cultivaron en medio RPMI1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (Invitrogen); 10,000 unidades / mL de penicilina G sódica, 10,000 µg / mL de sulfato de estreptomina, bicarbonato de sodio 4.4% gasificado con CO₂, agua desionizada estéril (369.5 ml) y con un pH de 7.3 -7.5. Las células se guardaron en cajas para cultivo de polipropileno en estufa con 5% de CO₂ en el aire (100% humedad) y a 37° C.

Para conservar las células en buen estado se realizaron cambios de medio todos los días y cada 3 días las células se resembraron en cajas nuevas, la resiembra consistió de retirar el medio de cultivo y lavar el sobrante utilizando PBS, después se añadió 2 ml de tripsina por 5 minutos para despegar las células de la caja y se realizó un conteo celular para trasladar las células a una caja nueva con medio limpio.

Cada tercer resiembra se realizó el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer (1x10⁶ cel/mL) y se probaron por triplicado las muestras a concentraciones de 0.2, 1, 5 y 25 µg/ml y los controles DMSO al 10% y vinblastina a concentraciones de 0.0032, 2 y 0.4 µg/ml en cajas de 96 pocillos; al tercer día se fijaron las células con ácido tricloroacético por 30 minutos y se tiñeron con sulforodamina por 30 minutos, se lavaron con ácido acético al 5% y se añadió TRIS en agitación. La absorbancia de las placas fue leída con Chromate, El ensayo se llevó a cabo en condiciones estáticas y los resultados se expresan como la concentración que inhibe el crecimiento al 50% después del período de incubación (IC₅₀). La CI 50 para cada muestra se calculó con el programa TableCurve 2D.

Ensayos de modulación de MDR. De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad se probó la capacidad para modular la MDR de todos los compuestos en las líneas celulares MCF7 (parental) y sus fenotipos resistentes (V+) y (V-). Estas se descongelaron y cultivaron en medio RPMI1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (Invitrogen); 10,000 unidades / mL de penicilina G sódica, 10,000 µg / mL de sulfato de estreptomina, bicarbonato de sodio 4.4% gasificado con CO₂, agua desionizada estéril (369.5 ml) y con un pH de 7.3 -7.5. Las células

se guardaron en cajas para cultivo de polipropileno en estufa con 5% de CO₂ en el aire (100% humedad) y a 37° C.

Se cultivaron células MCF-7 / Vin + en medio que contenía 211,2 µM de vinblastina. También se mantuvo una reserva de células MCF-7 / Vin en medio sin vinblastina (MCF-7 / Vin -). Las células desarrollaron resistencia durante 5 años según el protocolo Figueroa et. al 2011.

Cada tercer resiembra se realizó el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer (1x10⁶ cel/mL) y se probaron por triplicado las muestras a concentraciones de 5 y 25 µg/ml y los controles DMSO al 10% y vinblastina a concentraciones de 0.000128, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4 y 2, µg/ml en cajas de 96 pocillos al tercer día se fijaron las células con ácido tricloroacético por 30 minutos y se tiñeron con sulforodamina por 30 minutos, se lavaron con ácido acético al 5% y se añadió TRIS en agitación. La absorbancia de las placas fue leída con Chromate, Con base en estos resultados y a las placas iniciales de cada línea celular se pudieron calcular las CI₅₀ para cada muestra con el programa tableCurve 2D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los diterpenos.

Los espectros obtenidos por RMN de ^1H y ^{13}C se analizaron para determinar la estructura de los compuestos aislados del extracto de raíz de *Jatropha dioica*. En algunos casos fue necesario adquirir los espectros de RMN bidimensionales COSY y de Espectrometría de masas por ionización con impacto electrónico para ayudar a dilucidar las estructuras (ver material suplementario).

El compuesto 1 fue aislado en forma de cristales (423 mg) obtenidos de las fracciones 9 y 10 (C), este fue identificado como citlalitriona por comparación de sus espectros ^1H y ^{13}C (figura 1) con los obtenidos por Villarreal et al. 1988. Las jatrolonas A y B también se aislaron en forma de cristales (277 mg) de las fracciones 7-8 (C) como una mezcla epimérica con proporción 50:50. La estructura de estos dos compuestos se estableció con base en los resultados descritos por Burgueño et al. 2006.

Entre las fracciones separadas destacan la fr (A4) de donde se logró aislar a manera de un sólido blanco (12 mg) el compuesto 2 (JDM-2) este compuesto llamo la atención por su pureza y el tipo de señales observadas en los resultados de RMN (figura 3); mientras que el compuesto 3 (JDM-3) se obtuvo de las fracciones (A13-16) en forma de aceite (27 mg) (figura 4). El compuesto JDM-4 (10.4 mg) debido a la escases de señales encontradas en los espectros obtenidos, se caracterizó como una cera y se descartó como un compuesto interesante.

Según los resultados de los espectros obtenidos por RMN de ^1H y ^{13}C , los aceites denominados como JDM-5 (25.7 mg) y JDM-(747.1 mg), podrían caracterizarse como sesquiterpenos según el número de señales encontradas pese a no encontrarse totalmente puros. (ver material suplementario)

Las estructuras de los compuestos purificados (citlalitriona y jatrolonas A y B) y su abundancia propicio el estudio de su bioactividad contra líneas celulares así como la derivatización de la citlalitriona utilizando 3 catalizadores diferentes.

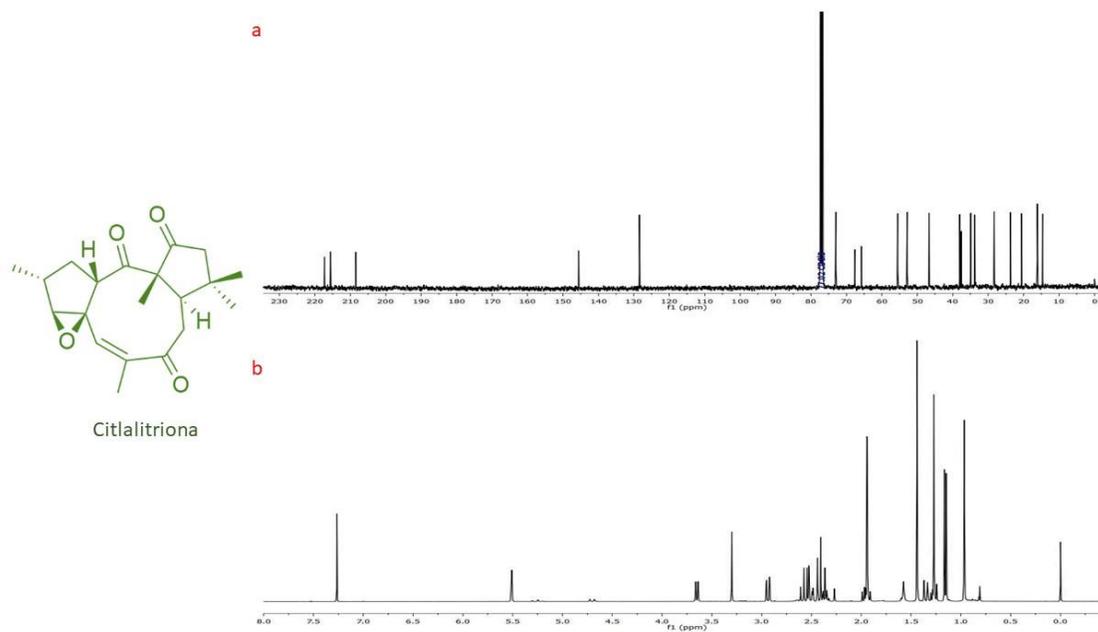


Figura 1. Espectros de RMN ¹³C y ¹H de la citlalitriona

Espectros obtenidos por RMN de ¹³C (a) y ¹H (b) del compuesto aislado 1 (JDM-1) que permitieron determinar la estructura química de la citlalitriona.

El compuesto obtenido fue caracterizado como citlalitriona, la estructura se confirmó por su comparación con los datos obtenidos por Villarreal y colaboradores (1988), quienes aislaron e identificaron la citlalitriona por primera vez de las raíces de *Jatropha dioica* recolectada en Reynosa, Tamaulipas con un rendimiento de 136 mg, 0.02% por gramo de extracto, mientras la planta utilizada en este estudio recolectada en San Luis Potosí mostró un rendimiento de 423 mg, 3% en masa de extracto. Al comparar los extractos se puede apreciar que la planta que fue recolectada en San Luis Potosí produce más citlalitriona que las plantas recolectadas al norte del País, por lo que factores como el clima y el suelo influyen en la producción de los metabolitos secundarios. [61] Por lo que podemos deducir

que el clima encontrado en el área de Mexquitic de Carmona favorece la producción de citlalitriona en *Jatropha dioica*.

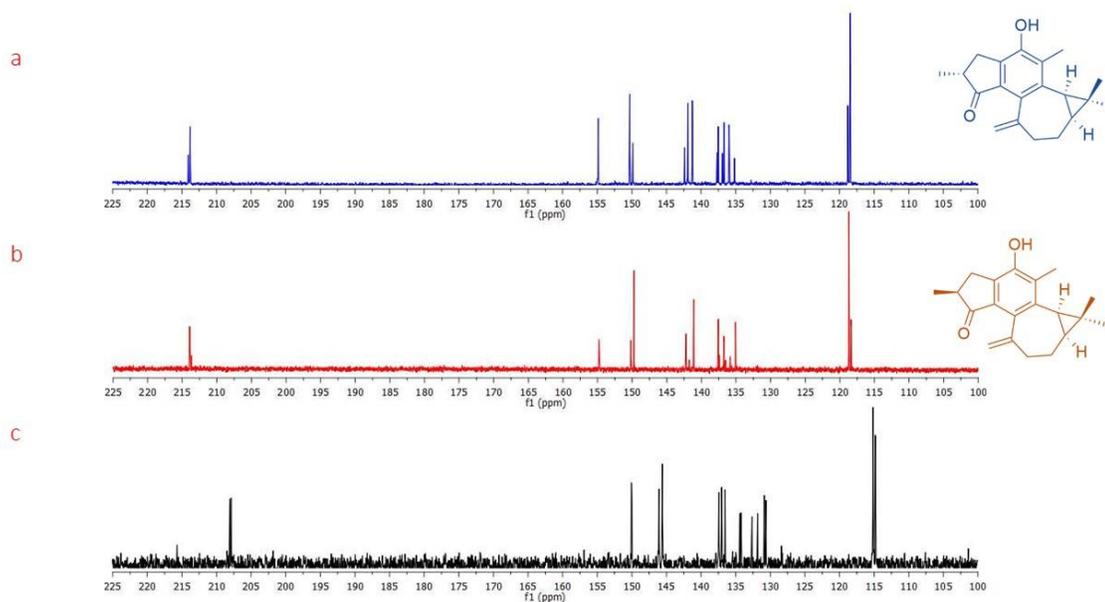


Figura 2. Espectros de RMN ^{13}C de las Jatrofolonas A y B

Mediante el método de separación descrito anteriormente se logró cambiar la proporción de la concentración de inicial (c) A: B 50:50 a las proporciones (a) A: B 31.5:68.5 y (b) A: B 74:26.

En las estructuras de la (figura 2) se encuentran las jatrofolonas A (rojo) y B (azul) diferenciadas únicamente por la posición de un grupo CH_3 . Los espectros obtenidos de ^{13}C y ^1H de las dos sustancias fueron comparados con los descritos por Burgueño y colaboradores (2016), quienes describieron su purificación y la configuración absoluta de ambas jatrofolonas a partir de las raíces de la planta recolectada en el estado de Querétaro, obteniendo alrededor de 53 mg de la mezcla de ambas jatrofolonas, en comparación con la planta recolectada en San Luis Potosí con 277 mg.

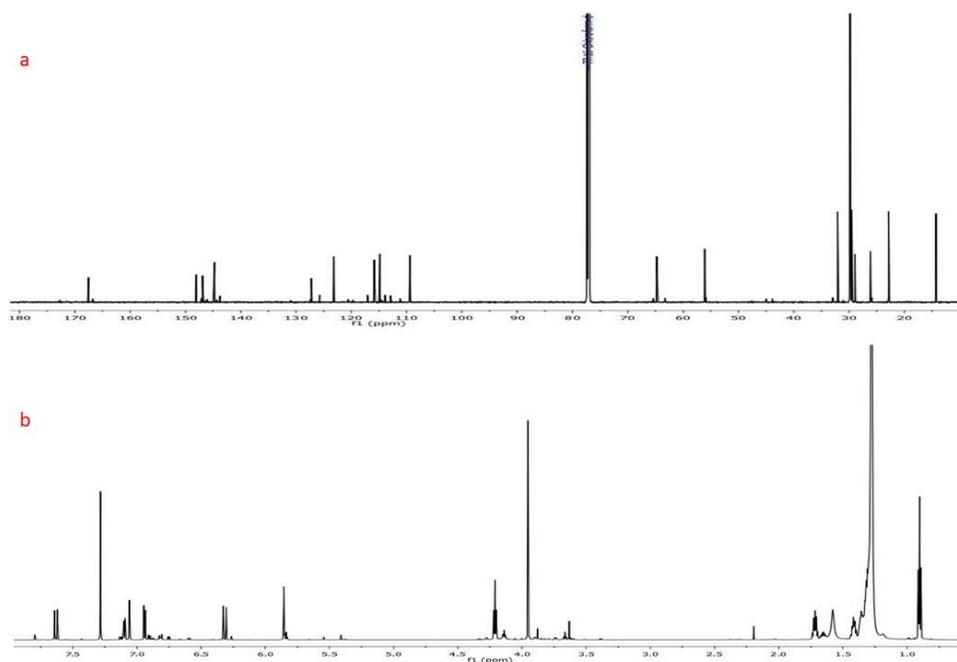


Figura 3. Espectros de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto JDM-2

a espectro de RMN ^{13}C ; b espectro de RMN ^1H ; un compuesto como JDM-2 no ha sido reportado en *Jatropha dioica* es un posible diterpeno con anillos aromáticos.

El compuesto nombrado JDM-2 aislado de la fracción (A) mostro un perfil de señales en sus espectros ^1H y ^{13}C única entre los compuestos aislados de esta planta, por lo que después de una búsqueda exhaustiva se determinó que podría ser un compuesto no reportado, este podría ser un diterpeno debido al número de carbonos observado (figura 3). La elucidación de su estructura sigue en desarrollo, se han solicitado sus espectros de RMN bidimensionales (ver material suplementario).

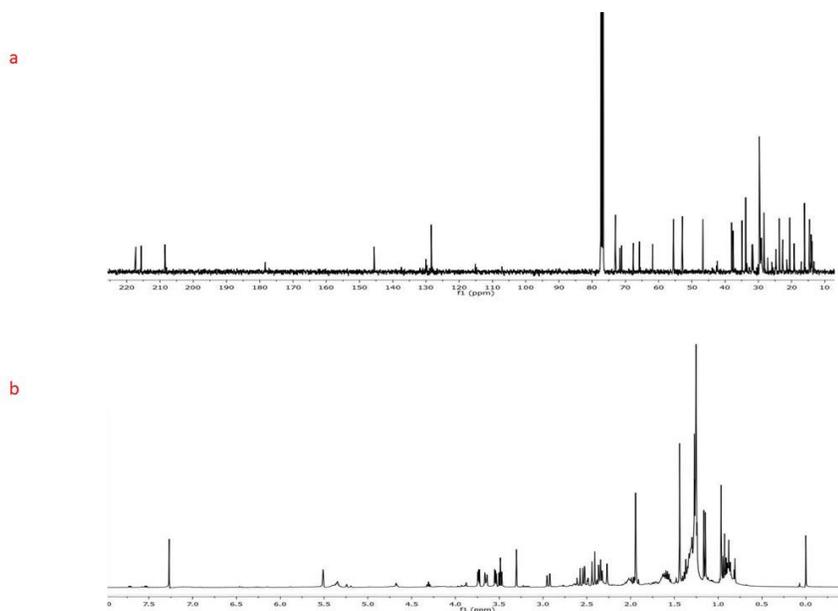


Figura 4. Espectros de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto JDM-3

a espectro de RMN ^{13}C ; b espectro de RMN ^1H ; el compuesto JDM-3 muestra señales similares a la citlalitrona, pero no ha sido reportado en *Jatropha dioica* es un diterpeno.

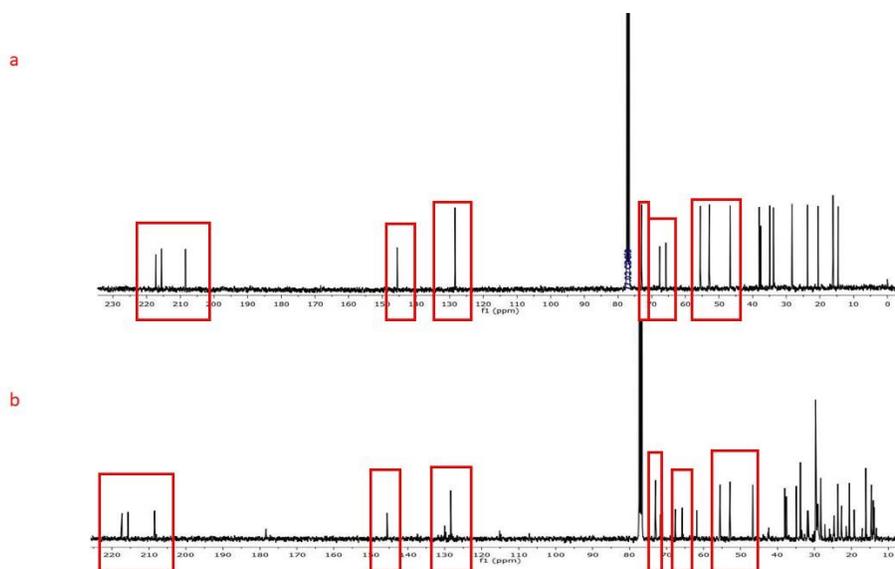


Figura 5. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C del compuesto JDM-3 con la citlalitrona. Se realizó una comparación de los espectros de carbono entre la citlalitrona (a) y el compuesto JDM-3 (b), en rojo se muestran señales similares.

Originalmente se creyó que el compuesto JDM-3 era citlalitriona debido a los 3 carbonilos característicos, sin embargo, se encontró una diferencia en otras señales la Figura 5 hace un comparativo entre los espectros ^{13}C de la citlalitriona y JDM-3, el análisis RMN de ^{13}C de ambos compuestos coincide en al menos 11 carbonos. La estructura del compuesto JDM-3 continua en proceso, con base en espectrometría de masas por impacto electrónico, se determinó un peso molecular de aproximadamente 312.13 g/mol, menor al de la citlalitriona, probablemente menos oxigenado.

Derivados de citlalitriona

Después de derivatizar a la citlalitriona, se aislaron 6 derivados semisintéticos, con base en los resultados de RMN ^{13}C y ^1H , se seleccionaron los derivados nombrados DC-1, DC-2 y DC-4 debido a que presentaban cambios más interesantes en sus funcionalidades. Como resultado de la reacción con tonsil de las fracciones 2-6 se aisló el derivado de citlalitriona 1 (DC-1) 8.5 mg y de las frs 35-37 el derivado 2 (DC-2) 29.1 mg, mientras que el derivado 4 (DC-4) 20.5 mg se obtuvo a partir de la reacción con DBU de la fracción 18.

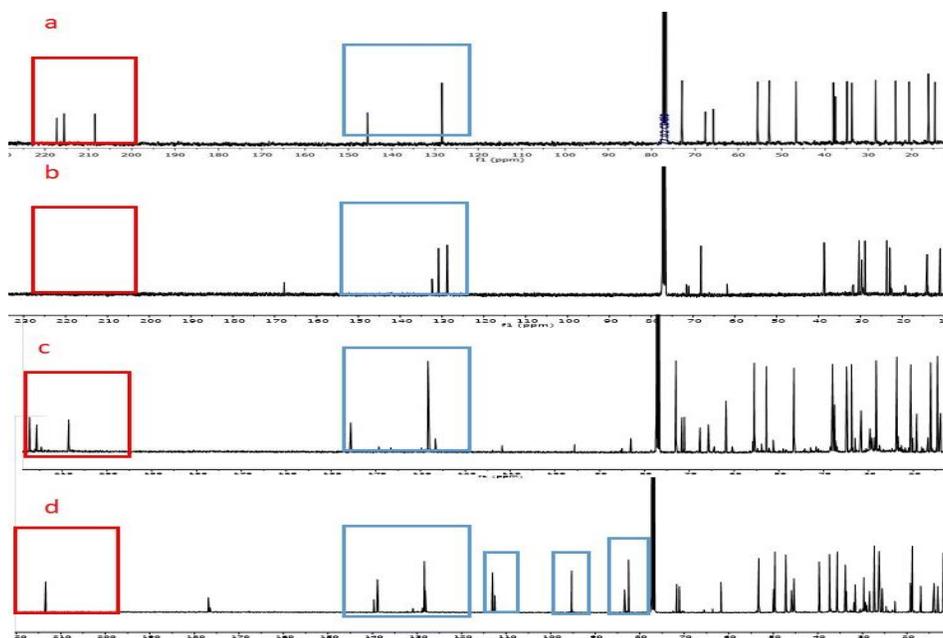


Figura 6. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C de los derivados de citlalitriona.

Se realizó una comparación de los espectros de carbono entre la citlalitriona (a) y el derivado 1 (DC-1) (b), DC-2 (c) y DC-3 (d); en rojo se muestran señales similares y en azul nuevas señales.

Con el propósito de modificar los 3 grupos carbonilo marcados en rojo (figura 6) de la citlalitriona y forzar un re-arreglo en la molécula, se utilizaron 3 catalizadores diferentes, derivado de estas reacciones los compuestos DC-1 y DC-2 pudieran ser productos de una reacción de transposición, utilizando tonsil (arcilla bentonítica) como catalizador, en el derivado DC-1 se puede observar la desaparición de los 3 grupos carbonilos de la citlalitriona y la aparición de 2 nuevas señales entre δ_c 130 ppm, lo que podría indicar un rearrreglo en la molécula, así como la formación de dobles enlaces, por otra parte en el derivado DC-2 se conservaron las 3 señales de los carbonilos, sin embargo, en la región entre δ_c 15-40 ppm aparecieron señales nuevas, muy similares al compuesto aislado JDM-3 por lo que este podría ser un derivado natural de la citlalitriona no reportado anteriormente.

El derivado DC-4 se caracterizó por la desaparición de 2 de los 3 carbonilos y la aparición de nuevas señales entre δ_c 80 y 150 ppm, indicando la posible aparición de grupos aromáticos o carbonos oxigenados, este derivado en especial fue resultado de la reacción con DBU.

En los 3 casos se solicitó la adquisición de espectros de RMN bidimensionales (ver material complementario) para definir la estructura y los cambios en la citlalitriona. La elucidación de una estructura completa sigue en proceso.

Ensayos de citotoxicidad

Para determinar las concentraciones inocuas de los compuestos aislados y los derivados de citlalitriona se probaron en la línea celular MCF-7 y en diferentes líneas control de cáncer humano: Hela (Carcinoma cérvico-uterino), PC3 (Adenocarcinoma de próstata), HCT15 (Adenocarcinoma colorrectal) y HCT116 (Carcinoma de colon) por ser tejidos que frecuentemente presentan resistencia a quimioterapia, aparte se trabajó con la línea celular de macrófagos de monocitos de ratón RAW 264.7, esta línea celular es comúnmente usada en para probar la

citotoxicidad de compuestos y en experimentos relacionados con MDR. Esto se hizo buscando probar que los compuestos no fueran citotóxicos, en comparación con la vinblastina un conocido y potente fármaco utilizado comúnmente en la quimioterapia, además, como control se utilizaron 10 µl de DMSO al 10%. La CI₅₀ de la vinblastina se determinó utilizando el programa TableCurve 2D (Tabla 1), encontrado resultados distintos para cada línea celular comprobando que existen tipos celulares más susceptibles a los fármacos en este caso a la vinblastina.

Tabla 2. Citotoxicidad de los compuestos en distintas líneas celulares.

CI ₅₀ µg/ml						
Compuesto / línea	Hela	Mcf7	PC3	HCT15	HCT116	RAW 264.7
Control (vinblastina)	0.016 ± 0.002	0.003725 ± 0.0003	0.6012 ± 0.2189	0.0223 ± 0.0283	0.4989 ± 0.2574	0.00469 ± 0.00200
Jdm1 (citlitriona)	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Jdmf8 a (mezcla jatrolonas)	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Jdmf8 b (mezcla jatrolonas)	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Jdmf8 a (mezcla jatrolonas)	>25	>25	>25	>25	>25	>25
JDM-2	>25	>25	>25	>25	>25	>25
JDM-3	>25	>25	>25	>25	>25	>25
DC-1	>25	>25	>25	>25	>25	>25
DC-2	>25	>25	>25	>25	>25	>25
DC-4	>25	>25	>25	>25	>25	>25

MCF-7 = carcinoma de mama; HeLa = carcinoma de cervix, HCT-116 = carcinoma de colon; HCT15 Adenocarcinoma de colon humano; PC3 Carcinoma próstata; RAW Macrófago monocito.

La citotoxicidad de la citlalitrona así como las jatrolonas no había sido reportada anteriormente en líneas celulares de carcinomas humano, la citlalitrona resulto ser inocua, lo cual podría indicar que la citlalitrona y sus derivados pueden ser mejores moduladores de la MDR al no ser citotóxicos. Como se muestra en la tabla 1 ningún compuesto ni sus derivados resulto citotóxico para ninguna de las líneas celulares en la concentración más alta implementada (25 µg/ml). Gracias a estos resultados su capacidad como moduladores de la MDR pudo ser probada.

Ensayos de modulación de MDR

Con base en los ensayos de citotoxicidad se analizó la capacidad moduladora de los compuestos aislados en las líneas de cáncer de mama resistente (v+) y (v-), así como en la línea celular parental MCF-7 sensible a vinblastina (s).

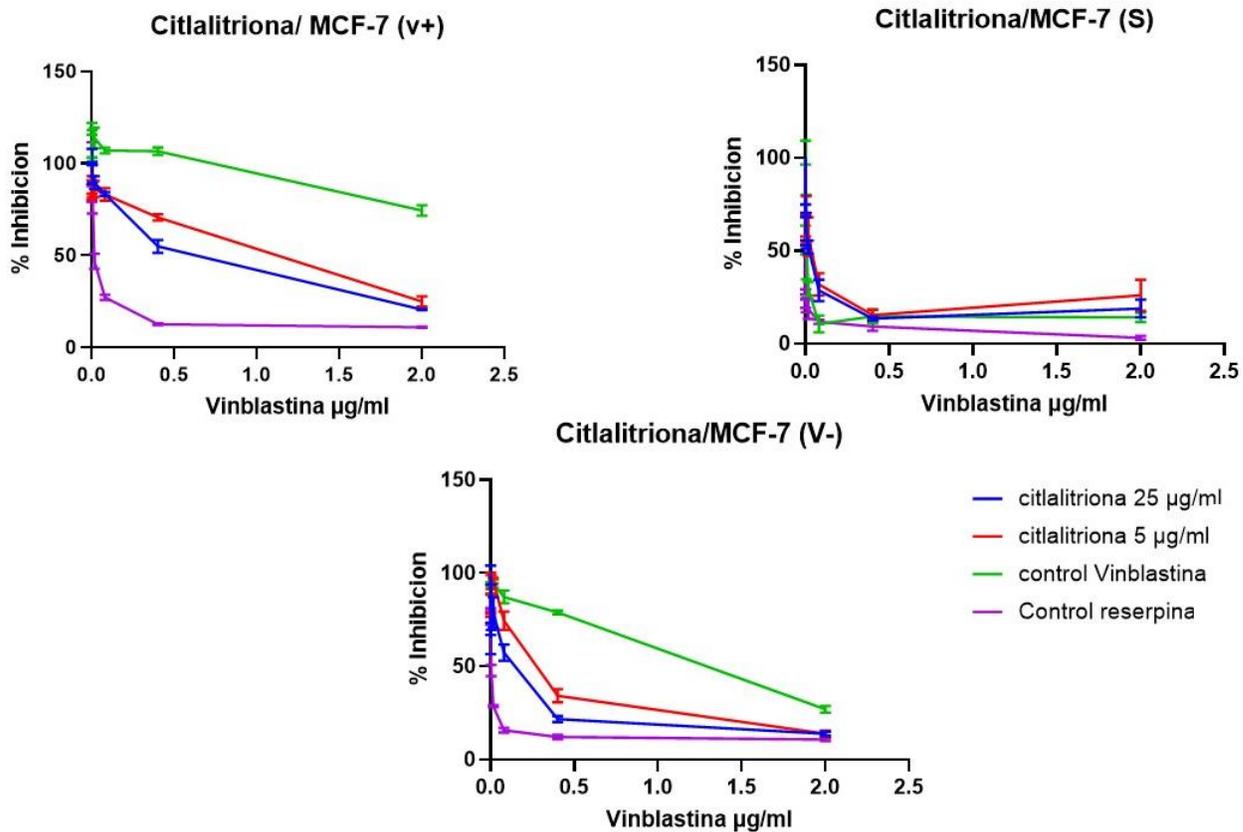


Figura 7 Efecto de la citlalitriona sobre la CI_{50} de líneas celulares resistentes MCF-7. Células MCF-7 (S) sensibles a Vinblastina y sus 2 fenotipos resistentes (V+) y (V-), se trataron 72h con vinblastina a 2,0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064 y 0.000128 $\mu\text{g}/\text{m}$ y citlalitriona a 25 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición celular. Los datos representan la media \pm D.E. (desviación estándar) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tras una incubación de 72 horas con la citlalitriona, se observó una disminución en el crecimiento celular, menor a la reserpina; en la concentración más alta de citlalitriona (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$); esto ocurrió de igual manera con las jatrolonas A y B, (figura 8) de las cuales la Mezcla (a) una proporción más alta de jatrolona B; esta mezcla logro reducir la concentración de Vinblastina necesaria para lograr la CI_{50} . (ver Material suplementario).

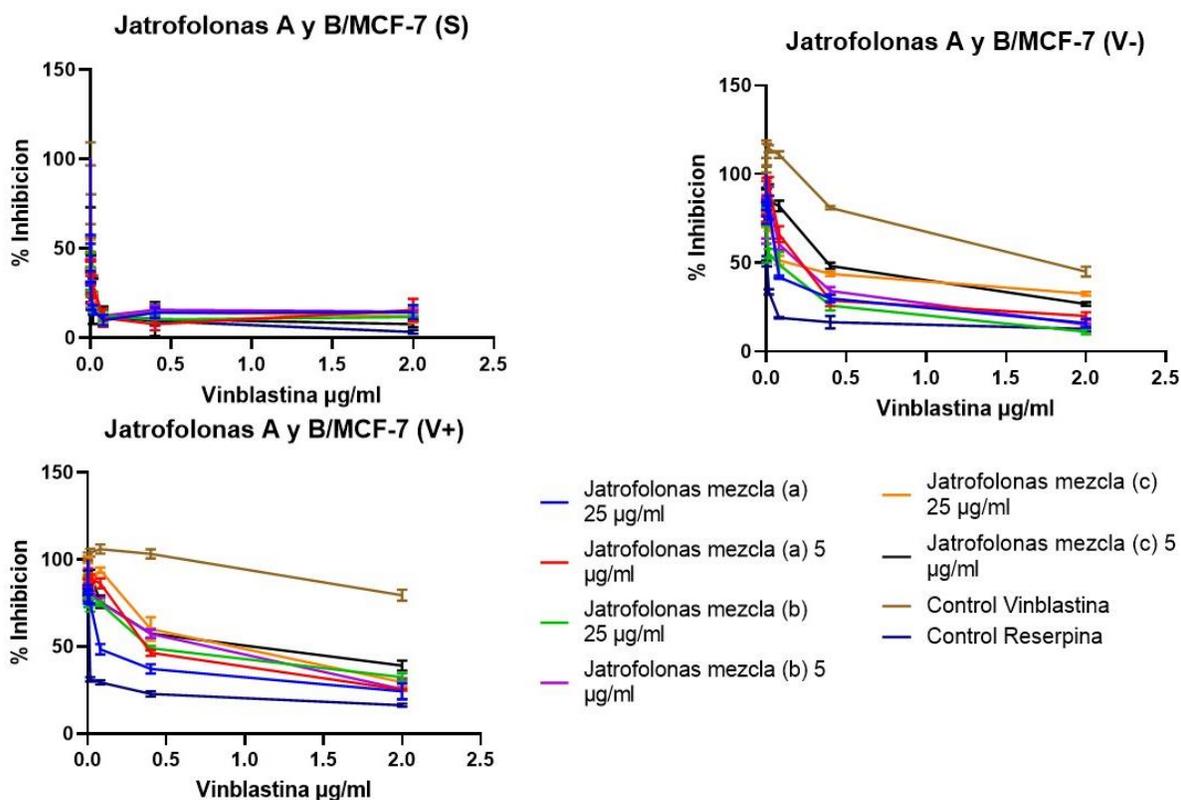


Figura 8 Efecto de las Jatrofolonas A y B sobre la CI_{50} de líneas celulares resistentes MCF-7.

Células MCF-7 (S) sensibles a Vinblastina y sus 2 fenotimos resistentes (V+) y (V-), se trataron 72h con vinblastina a 2,0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064 y 0.000128 µg/m y las 3 mezclas de Jatrofolonas A y B; donde; Mezcla (a) Jatrofolonas A y B 31.5:68; Mezcla (b) Jatrofolonas A y B 50:50; Mezcla (c) Jatrofolonas A y B 74:26; a 25 y 5 µg/ml . Posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición celular Los datos representan la media \pm D.E. (desviación estándar) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

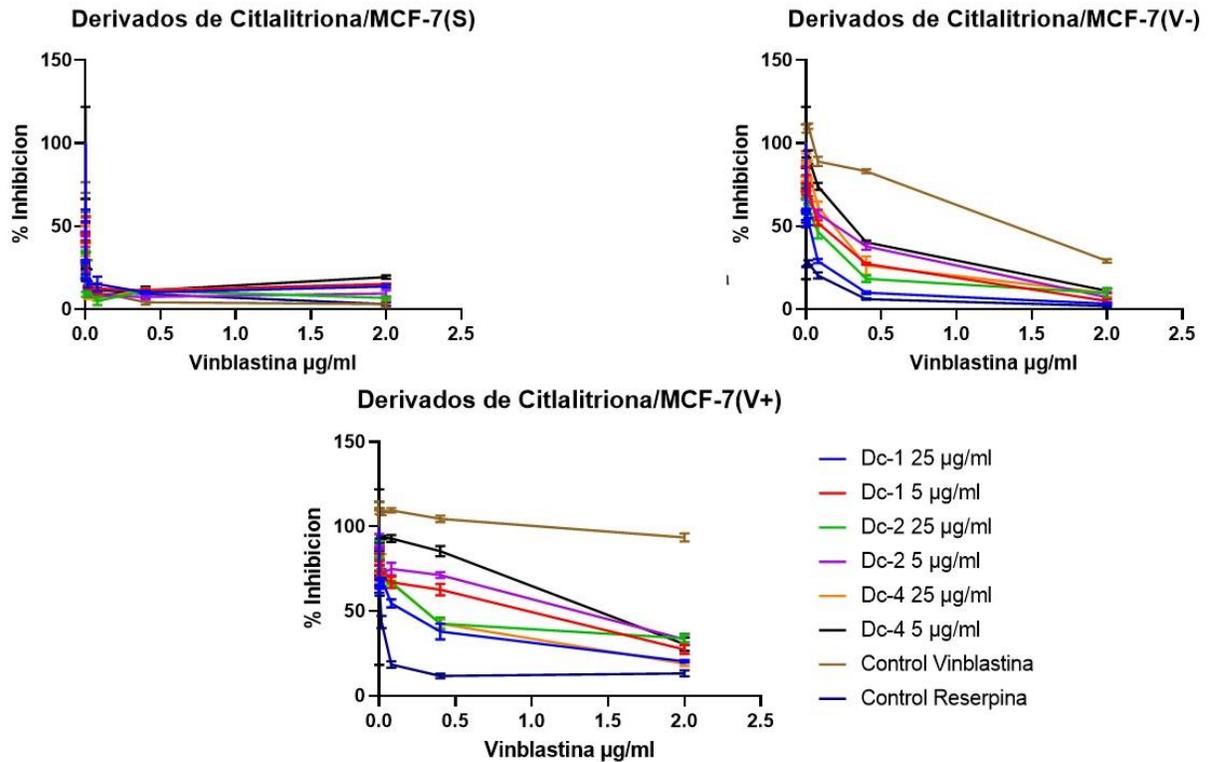


Figura 9 Efecto de los derivados de citlalitriona sobre la CI_{50} de líneas celulares resistentes MCF-7.

Células MCF-7 (S) sensibles a Vinblastina y sus 2 fenotipos resistentes (V+) y (V-), se trataron 72h con vinblastina a 2,0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064 y 0.000128 $\mu\text{g}/\text{m}$ y los 3 derivados de citlalitriona a 25 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición celular. Los datos representan la media \pm D.E. (desviación estándar) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

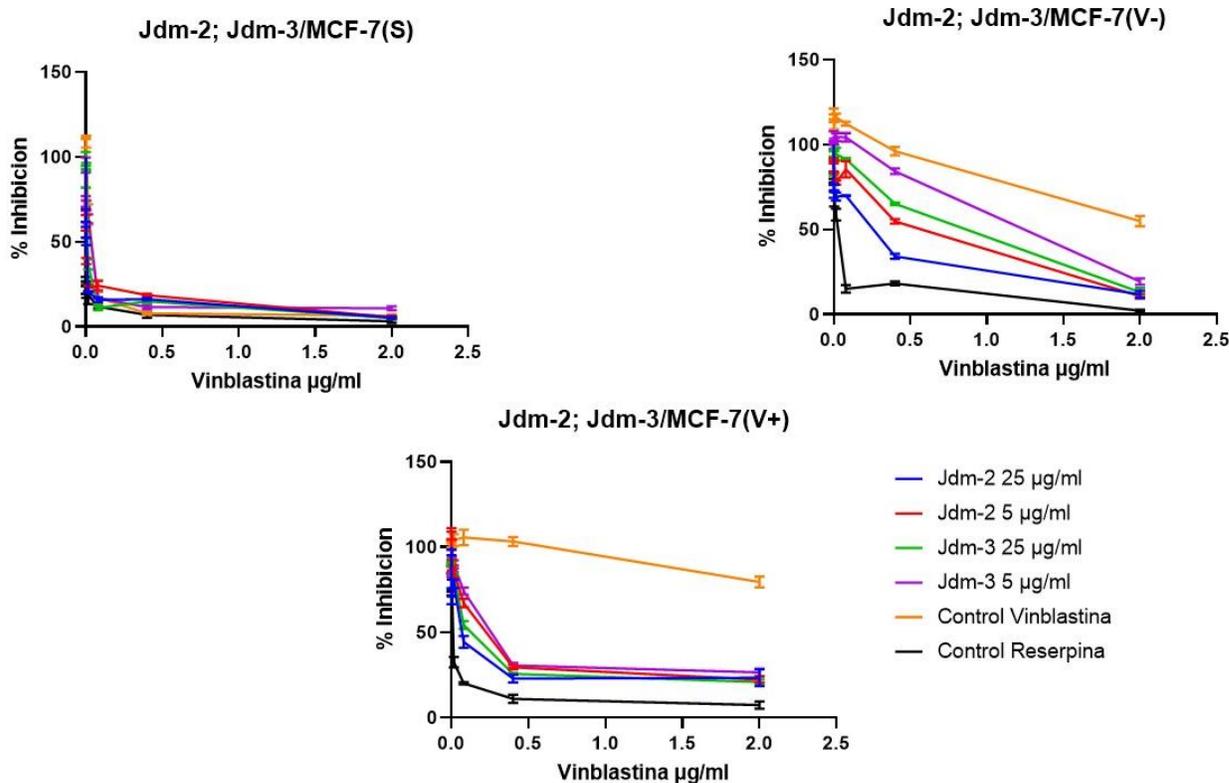


Figura 10 Efecto de los compuestos JDM-2 y JDM-3 sobre la CI₅₀ de líneas celulares resistentes MCF-7.

Células MCF-7 (S) sensibles a Vinblastina y sus 2 fenotipos resistentes (V+) y (V-), se trataron 72h con vinblastina a 2,0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064 y 0.000128 µg/ml y los compuestos JDM-2 y JDM-3 a 25 y 5 µg/ml. Posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición celular. Los datos representan la media ± D.E. (desviación estándar) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Existe gran diversidad de estructuras de los diterpenos de tipo Jatrofano aislados de especies de la familia Euphorbiaceae, se han encontrado diversas actividades biológicas relacionadas a estos. Las diferencias estructurales se relacionan estrechamente con las actividades biológicas de estos diterpenos, tal es el caso de la rialozatriona [62] otro diterpeno aislado de *Jatropha dioica* el cual ha sido conocido por su actividad antiviral especialmente antiherpética *In vitro* [63].

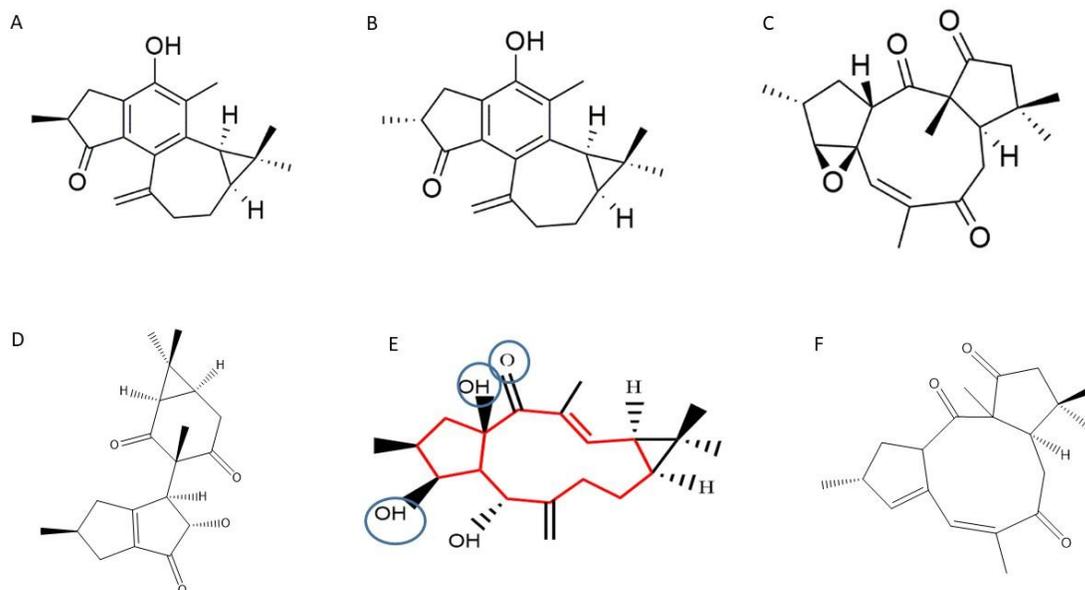


Figura 11. Diversidad de Diterpenos de tipo Jatrofano.

A. Jatrofolona A; B Jatrofolona B, C Citlalitriona; D Rialozatriona; E Euphorbia factor L 3; F Jatrofatriona.

La citlalitriona y la jatrofatriona tienen una estructura muy similar, ambos metabolitos secundarios, jatrofatriona y citlalitriona, son ejemplares de diterpenos de tipo ciclojatrofano, diferenciada únicamente por un grupo epóxido entre los carbonos 3 y 4. La jatrofatriona a diferencia de la citlalitriona presenta un efecto citotóxico contra líneas celulares de leucemia por lo cual estos cambios estructurales podrían ser la clave de su actividad. Corea y colaboradores (2009) realizaron una revisión sobre la actividad anti-MDR de diterpenos de tipo Jatrofano, donde, identificaron algunos grupos funcionales en ubicaciones específicas, que contribuían como potenciadores de esta actividad mostrados en azul (figura 11), por otro lado identificaron la presencia de un esqueleto bicíclico, constituido por un macrociclo de al menos 11 carbonos, a diferencia de la citlalitriona y las jatrofolonas que cuentan con una estructura tricíclica lo que podría disminuir su potencia como moduladores de la MDR.

CONCLUSIONES

Jatropha dioica es una planta con un potencial uso farmacológico, la población estudiada de San Luis Potosí presenta altos niveles de citlalitrona y jatrofolonas A y B en comparación con las plantas estudiadas al norte del país. La plata recolectada en San Luis Potosí también es fuente de nuevos metabolitos.

Ningunos de los diterpenos aislados así como los derivados de citlalitrona resultaron ser citotóxicos, pero todos los compuestos disminuyeron la CI_{50} de las dos líneas celulares resistentes a vinblastina. La línea celular cultivada constantemente en medio con vinblastina (V+) resultó ser más resistente que la línea celular resistente sin medio con vinblastina (V-), esta a su vez fue más susceptible a la modulación. Entre los compuestos que presentaron una modulación más alta fueron la jatrofolona A y B en una proporción (31.5:68.5) con un RF de 15.4 en la línea celular (V-) y el derivado de citlalitrona 1 con un RF de 24.917 en la línea celular (V-). Por lo que estos compuestos y sus derivados pueden ser candidatos para estudios posteriores relacionados con la resistencia a múltiples fármacos.

REFERENCIAS

- 1- Ghoncheh M, Pournamdar Z., Salehiniya H. Incidence, Mortality, and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **2016**; 17(S3):43-6. DOI: 10.7314/apjcp.2016.17.s3.43. PMID: 27165206
- 2- Rodríguez C. S., Macías C. & Labastida S. Cáncer de mama en México: ¿Enfermedad de mujeres jóvenes? *Revista Ginecología y Obstetricia de México*. **2000**. 68(5):185-190. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2014/nn146j.pdf>
- 3- Moo T. A., Sanford R., Dang C., & Morrow, Review of Breast Cancer Therapy. *PET clinics*. **2018**. 13 (3), 339–354. <https://DOI.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
- 4- Clynes M. Multiple Drug Resistance in Cancer 2: Molecular, *Cellular and Clinical Aspects*. Ireland: Springer Science & Business Media. **2013**. Volume 27, pp. VII DOI 10.1007/978-94-017-2374-9
- 5- Wang, J., Seebacher, N., Shi, H., Kan, Q., & Duan, Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget*, **2017** 8(48),. 84559–84571. <https://DOI.org/10.18632/oncotarget.19187>
- 6- Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., & Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, **2017**. 7(3), 339–348. DOI:10.15171/apb.2017.041.
- 7- Jonathan P.M. Cancer Multidrug resistance: Progress in understanding the molecular basis of drug resistance in cancer promises more effective treatments. *Nature Biotechnology*. **2000** 18:IT18–20. DOI: 10.1038/80051
- 8- Nikolaou M., Pavlopoulou A., Georgakilas A.G. et al. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical & Experimental Metastasis* **2018**. 35, 309–318 <https://DOI.org/10.1007/s10585-018-9903-0>
- 9- Juliano R.L. & Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1976** 455 152 – 162. DOI: [10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://DOI.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)

- 10- Bakos E, Evers R, Szakács G, Tusnády GE, Welker E, Szabó K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Váradi A, Sarkadi B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry*. **1998** 27; 273(48):32167-75. DOI: 10.1074/jbc.273.48.32167. PMID: 9822694.
- 11- Doyle L. A., Yang W, Abruzzo L.V., et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [published correction appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Mar 2; 96 (5):2569]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. **1998**; 95(26):15665-15670. DOI:10.1073/pnas.95.26.15665
- 12- Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., & Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* **2014**. 6(3), 1769–1792. DOI:10.3390/cancers6031769
- 13- Nakanishi T. & Ross D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese journal of cancer*. **2012**. 31(2), 73–99. DOI:10.5732/cjc.011.10320
- 14- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins, *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, Volume 92, Issue 16, Pp 1295–1302, <https://DOI.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
- 15- Loo T. & Clarke D. J. Recent Progress in Understanding the Mechanism of P-Glycoprotein-mediated Drug Efflux. *Journal of Membrane Biology* **2005**206 (3). 173-185. <https://DOI.org/10.1007/s00232-005-0792-1>
- 16- Tarling E. J., de Aguiar Vallim, T. Q., & Edwards, P. A. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends in endocrinology and metabolism* **2013** 24(7),. 342–350. DOI:10.1016/j.tem.2013.01.006
- 17- Linton K. J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology*, **2007**. 22(2), 122-130. DOI:10.1152/physiol.00046.2006
- 18- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*, **2009** 3(3) 281–290. <https://DOI.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>

- 19- Zhou S.F. Role of multidrug resistance associated proteins in drug development. *Drug Discoveries & Therapeutics*. **2008** 2(6), 305-32. DOI: [10.2174/978160805292911201010003](https://doi.org/10.2174/978160805292911201010003)
- 20- Saraswathy M. & Gong S., Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnology Advances*, **2013**. Volume 31, Issue 8, Pp 1397-1407, [https://DOI.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.004).
- 21- Gillet J. P, Gottesman M. M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. In: Zhou J. (eds) Multi-Drug Resistance in Cancer. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), *Human Press*. **2010**. Volume 596.. 596:47-76 DOI: [10.1007/978-1-60761-416-6_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_4)
- 22- Al-Akra L., Bae D., Leck L. & W., Richardson, D. R., & Jansson, P. J. The biochemical and molecular mechanisms involved in the role of tumor microenvironment stress in development of drug resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, **2019**. 1863(9), 1390-1397. DOI: [10.1016/j.bbagen.2019.06.007](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.007)
- 23- Bartholomae S., Gruhn B., Debatin KM., Zimmermann M., Creutzig U., Reinhardt D., Steinbach D. Coexpression of multiple ABC-transporters is strongly associated with treatment response in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric Blood Cancer*. **2016**. 63:242–247. [https://DOI.org/10.1002/pbc.25785](https://doi.org/10.1002/pbc.25785)
- 24- Leopoldo M., Nardulli P., Contino, M., Leonetti, F., Luurtsema, G., & Colabufo, N. A. An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **2019**. DOI: [10.1080/13543776.2019.1618273](https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1618273)
- 25- Cragg G. M & Newman D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. **2015**. 100: 72–79. DOI: [10.1016/j.jep.2005.05.011](https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011)
- 26- Dewanjee S., Dua T.K., Bhattacharjee N., Das A., Gangopadhyay M., Khanra R., Joardar S., Riaz M., Feo V.D. & Zia-UI-Haq, M. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. *Molecules*. **2017**. 22, 871. DOI: [10.3390/molecules22060871](https://doi.org/10.3390/molecules22060871)

- 27- Wink M. Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*. **2012**. 3 (130). DOI:10.3389/fmicb.2012.00130
- 28- Li S., Lei Y., Jia Y., Li N., Wink M. & Ma Y. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*. **2011** 15;19(1):83-7. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.06.031. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21802927.
- 29- Chapman & Hall/CRC, Dictionary of Natural Products, **2002**. Version 11:1. <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>
- 30- Vasas, A., Rédei, D., Csupor, D., Molnár, J. & Hohmann, J. Diterpenes from European *Euphorbia* Species Serving as Prototypes for Natural Product Based Drug Discovery. *European Journal of Organic Chemistry*. **2012**. 5115-5130. DOI:10.1002/ejoc.201200733
- 31- Rui H., Jie G., Rushangul R. & Haji A. A., Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia sororia* as potent modulators against P-glycoprotein-based multidrug resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018** Volume 146,. Pages 157-170, <https://DOI.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.027>.
- 32- Wei J., Weiwei D., Zhefeng L., Meicai D., Runhua L. Lathyrane diterpenes from *Euphorbia lathyris* as modulators of multidrug resistance and their crystal structures, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**. Volume 17, Issue 13, Pages 4786-4792, <https://DOI.org/10.1016/j.bmc.2009.04.041>.
- 33- Wei J., Zhongmin W., Shuang C., Runhua L., Xiaozhen C., Dongmei F., Jiufeng W., Shengcai P., Xin H., Haixiang G., & Huawu S. Lathyrol Diterpenes as Modulators of P-Glycoprotein Dependent Multidrug Resistance: Structure–Activity Relationship Studies on Euphorbia Factor L3 Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2015**. 58 (9), 3720-3738 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00058
- 34- Ferreira M. J., Gyémánt N., Madureira A., Tanaka, M., Koós K., Didziapetris R. & Molnar J. The effects of jatrophone derivatives on the reversion of MDRI- and MRP-mediated multidrug resistance in the MDA-MB-231 (HTB-26) cell line. *Anticancer research*. **2005**. 25. 4173-8.

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?DOI=10.1.1.867.5445&rep=rep1&type=pdf>

- 35- Chen X., Chen X., Liu X., Wink M., Ma Y. & Guo Y. A myrsinol diterpene isolated from *Euphorbia prolifera* reverses multidrug resistance in breast cancer cells. *Pharmazie*. **2016**. 71. 537-539. DOI:[10.1691/ph.2016.6654](https://doi.org/10.1691/ph.2016.6654)
- 36- Jianyong Z., Ruimin W., Lanlan L., Wei L., Guihua T., Xianzhang B., & Sheng Y. Jatrophone Diterpenoids as Modulators of P-Glycoprotein-Dependent Multidrug Resistance (MDR): Advances of Structure–Activity Relationships and Discovery of Promising MDR Reversal Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016** 59 (13), 6353-6369, DOI: [10.1021/acs.jmedchem.6b00605](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00605)
- 37- Barba A., Duque M. & de la Cerda L. Plantas útiles de la Región Semiárida de Aguascalientes. **2003**. (1st ed). Aguascalientes, México: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Volumen 1, pp. 197-199, 221.
- 38- Martínez, M. & Matuda E. Flora del Estado de México: Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. **1979**. Editorial Libros de México, S.A. México, DF, pp. 367.
- 39- Martínez M., Las plantas medicinales de México: Librería y Ediciones Bota. **2004**. Pp 285-287.
- 40- Waizel-Bucay J, Martínez I. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista Asociación Dental Mexicana*. **2011**. 68(2): 73-88.
- 41- Manzanero G., Flores A., Sandoval E. & Bye R. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Polibotánica*, **2009**. (27), 191-228. Recuperado en 25 de mayo de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682009000100011&lng=es&tlng=es.
- 42- Wong J., Castillo M., Lopez L., Contreras J., Nevarez G. & Aguilar C. *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. *Acta Química Mexicana*. 2. **2010**. https://www.researchgate.net/publication/237092367_Jatropha_dioica_FUENTE_POTENCIAL_DE_AGENTES_ANTIMICROBIANOS

- 43- Valenzuela R., Jiménez J., García R., Betancourt N., Lozoya R., Almaráz D., & Morán J. Evaluación de la Actividad Antioxidante de *Cnidioscolus chayamansa* (Chaya), *Euphorbia prostrata* (Hierba de la Golondrina) y *Jatropha dioica* (Sangre de Drago) en Ratas Wistar Inducidas a Hiperglicemia. *International Journal of Morphology*, **2019**. 37 (1), 36-42. <https://dx.DOI.org/10.4067/S0717-95022019000100036>
- 44- N. Martínez. Evaluación del efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de *Jatropha dioica* en ratones albinos suizos cepa ICR mediante Ensayo Cometa in vivo. **2013**, <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8079/bibliotecadigital/handle/231103/1842>.
- 45- Villarreal A., Dominguez X., Williams H., Scott A., & Reibenspies J. Citlaltirione, a New Diterpene from *Jatropha dioica* var. Sessiliflora. *Journal of Natural Products* **1988**. 1 (4), 749-753 DOI: 10.1021/np50058a014.
- 46- Torrance, S. J., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R., Arora, S. K., Bates, R. B., Beavers, W. A., & Cutler, R. S. Antitumor agents from *Jatropha macrorhiza* (Euphorbiaceae). II. Isolation and characterization of jatrophatrione. *The Journal of Organic Chemistry*, **1976**. 41 (10), 1855–1857. DOI:10.1021/jo00872a038.
- 47- Yang, J., Long Y.O., & Paquette L.A., Concise Total Syntheses of the Bioactive Mesotricyclic Diterpenoids Jatrophatrione and Citlaltirione. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**. 125(6): p. 1567-1574. <https://DOI.org/10.1021/ja021177r>
- 48- Burgueño T. E., Chávez C. K., Cedillo P. E. & Joseph N. P. Absolute configuration of diterpenoids from *Jatropha dioica* by vibrational circular dichroism. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2016**. 28. 10.1016/j.tetasy.2016.11.006.
- 49- Pertino, M., et al., Gastroprotective activity and cytotoxic effect of cyperenoic acid derivatives. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2006**. 58(11): p. 1507-13. DOI: [10.1211/jpp.58.11.0012](https://doi.org/10.1211/jpp.58.11.0012)
- 50- Kupchan S.M., Sigel C.W., Matz M. J., Saenz J.A., Haltiwanger R.C., & Bryan R.F., J. Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, **1970**. 92(14), 4476-4477 DOI: 10.1021/ja00717a066

- 51- Baskar, A.A., et al., Chemopreventive potential of beta-Sitosterol in experimental colon cancer model--an in vitro and In vivo study. *BMC Complement Altern Med*, **2010**. 10: p. 24. DOI:[10.1186/1472-6882-10-24](https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-24)
- 52- Watson, W. H., Zabel, V., & Domínguez, X. A. Rioloatrione. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, **1982**. 38(2), 689–691. DOI:[10.1107/s0567740882003835](https://doi.org/10.1107/s0567740882003835).
- 53- Chavarría, E. D. Obtención de derivados de rioloatriona y evaluación de su actividad antiherpética in vitro. **2016**. Maestría tesis, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- 54- Mares D., Torres E., Rivas E., Cordero P., Waksman M.N., Rivas G.M. Plants from northeast Mexico with anti-HSV activity. *Natural Product Communications*. **2013**. Mar; 8 (3):297-8. PMID: 23678795
- 55- Willers, C., Svitina, H., Rossouw, M. J., Swanepoel, R. A., Hamman, J. H., & Gouws, C. Models used to screen for the treatment of multidrug resistant cancer facilitated by transporter-based efflux. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **2019**. 145(8), 1949-1976. DOI:[10.1007/s00432-019-02973-5](https://doi.org/10.1007/s00432-019-02973-5)
- 56- Ashraf SQ., Nicholls AM., Wilding JL., Ntouroupi TG., Mortensen NJ., Bodmer WF., Direct and immune mediated antibody targeting of ERBB receptors in a colorectal cancer cell-line panel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2012**. 109:21046–21051. [https://DOI.org/10.1073/pnas.1218750110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218750110).
- 57- Gottesman, M. M., & Pastan, I. H. The Role of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Cancer: Revisiting a JNCI Publication Exploring Expression of the MDR1 (P-glycoprotein) Gene. *Journal of the National Cancer Institute*, **2015**. 107(9), djv222. [https://DOI.org/10.1093/jnci/djv222](https://doi.org/10.1093/jnci/djv222)
- 58- Amaral M., Sousa P., Silva E.L., et al. Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. *Anticancer Research*. **2019**; 39(12):6443-6455. DOI:[10.21873/anticancer.13858](https://doi.org/10.21873/anticancer.13858)
- 59- Calcagno A.M. & Ambudkar S.V. The molecular mechanisms of drug resistance in single-step and multi-step drug-selected cancer cells *Methods*

- in molecular biology* **2010** volume. 596,. 596, 77–93. https://DOI.org/10.1007/978-1-60761-416-6_5
- 60- Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*. **2015**. 35(6):3147-3154. PMID: 26026074.
- 61- Figuerueroa G. G., Herrera J. N., Zentella D. A. & Pereda M. R. Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Natural Products* 75(1) **2011**, 93–97. DOI:10.1021/np200864m
- 62- Acosta L. L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **2003**. 8(1) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es&tlng=es.
- 63- Dominguez, G. Cano, F. R, V. A.M, W. H. Watson, & Z. V, Riolozatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. sessiliflora. *Phytochemistry*, **1980**. no. 7651, p. 2478. DOI:[10.1016/S0031-9422\(00\)91059-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91059-8)
- 64- Corea G, Di Pietro A, Dumontet C, Fattorusso E & Lanzotti V. Jatropane diterpenes from *Euphorbia* spp. as modulators of multidrug resistance in cancer therapy. *Phytochemistry Reviews* 8, 2009 431–447 <https://DOI.org/10.1007/s11101-009-9126-8>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tablas de los solventes utilizados como fases móviles en las columnas de las diferentes fracciones.

Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C

Espectrometría de masas método de ionización (impacto electrónico)

Espectros de correlación (COSY) de los compuestos.

Tablas de los solventes utilizados como fases móviles en las columnas de las diferentes fracciones.

Sistema	Fracciones	clave (g)
hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	1-2	Fr A (0.87 g)
hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	3-6	Fr B (0.50 g)
CH ₂ Cl ₂ (100%)	7-10	Fr C
CH ₂ Cl ₂ /acetona (95:5)	11-16	Fr D (1.33 g)
CH ₂ Cl ₂ /acetona (95:5)	17-25	Fr E (0.96 g)
CH ₂ Cl ₂ /acetona (90:10)	26-33	Fr F
CH ₂ Cl ₂ /acetona (80:20)	34-37	Fr G
CH ₂ Cl ₂ /acetona (70:30)	38-42	Fr H
CH ₂ Cl ₂ /acetona (50:50)	43-45	Fr I
CH ₂ Cl ₂ /acetona (50:50)	46-52	Fr J
Acetona (100%)	53-56	

Fracción A

Sistema	Fracciones	clave (g)
Hexano/AcOEt (90:10)	1-3	
Hexano/AcOEt (90:10)	4	12 mg de JDM-2
Hexano/AcOEt (90:10)	5	
Hexano/AcOEt (90:10)	6-7	
Hexano/AcOEt (90:10)	8	
Hexano/AcOEt (90:10)	9-10	
Hexano/AcOEt (90:10)	11-12	
Hexano/AcOEt (80:20)	13-16	37 mg de JDM-3

Fracción C (7-8)

Sistema	Fracciones	clave (g)
Hexano/AcOEt (95:5)	1-2	
Hexano/AcOEt (95:5)	3	
Hexano/AcOEt (95:5)	4	
Hexano/AcOEt (95:5)	5	
Hexano/AcOEt (95:5)	6-16	
Hexano/AcOEt (92.5:7.5)	17-25	A
Hexano/AcOEt (92.5:7.5)	26-28	B
Hexano/AcOEt (92.5:7.5)	29-38	C
Hexano/AcOEt (90:10)	39-46	D

Fracción D

Sistema	Fracciones	clave (g)
CHCl ₃ -AcOEt (98:2)	1-5	
CHCl ₃ -AcOEt (98:2)	6-7	
CHCl ₃ -AcOEt (98:2)	9-11	
CHCl ₃ -AcOEt (95:5)	12-14	
CHCl ₃ -AcOEt (95:5)	15-18	
CHCl ₃ -AcOEt (95:5)	19-21	
CHCl ₃ -AcOEt (90:10)	22-26	

Fracción F

Sistema	Fracciones	clave (g)
CHCl ₃ -acetona (95:5)	1-6	
CHCl ₃ -acetona (95:5)	7	
CHCl ₃ -acetona (95:5)	8	
CHCl ₃ -acetona (95:5)	10	
CHCl ₃ -acetona (90:10)	11-13	
CHCl ₃ -acetona (90:10)	14-19	10.4 mg JDM- 4
CHCl ₃ -acetona (90:10)	20	
CHCl ₃ -acetona (90:10)	21-24	
CHCl ₃ -acetona (90:10)	25-37	25.7 mg JDM- 5
CHCl ₃ -acetona (90:10)	38-39	

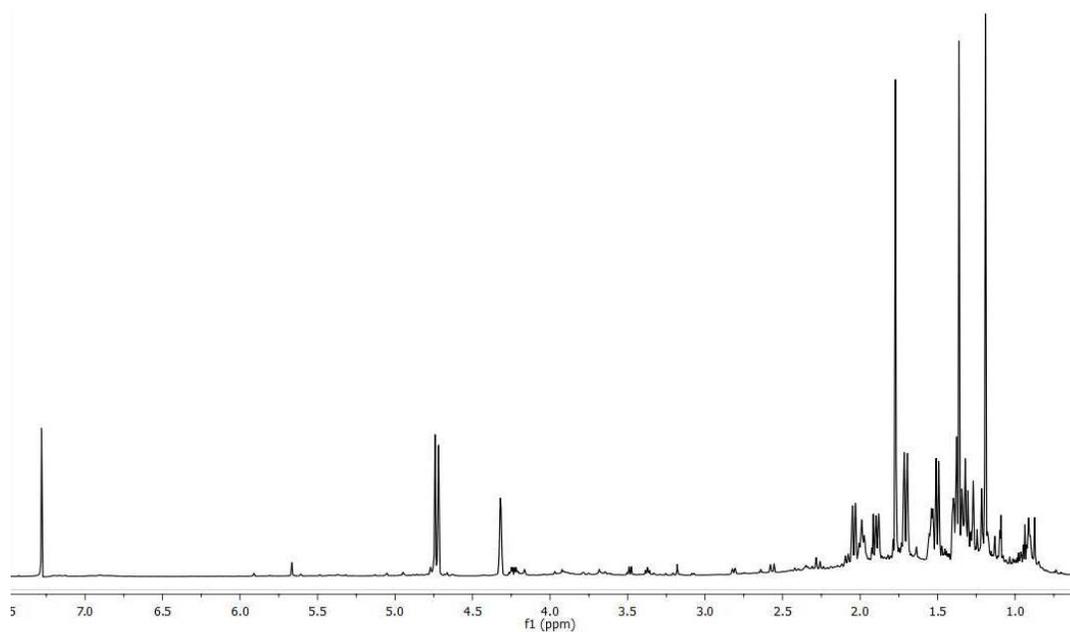
Fracción G

Sistema	Fracciones	clave (g)
Hexano-AcOEt (30:70)	1-3	
Hexano-AcOEt (30:70)	4	
Hexano-AcOEt (30:70)	5	
Hexano-AcOEt (30:70)	6-7	
Hexano-AcOEt (30:70)	8-10	
Hexano-AcOEt (30:70)	11-21	

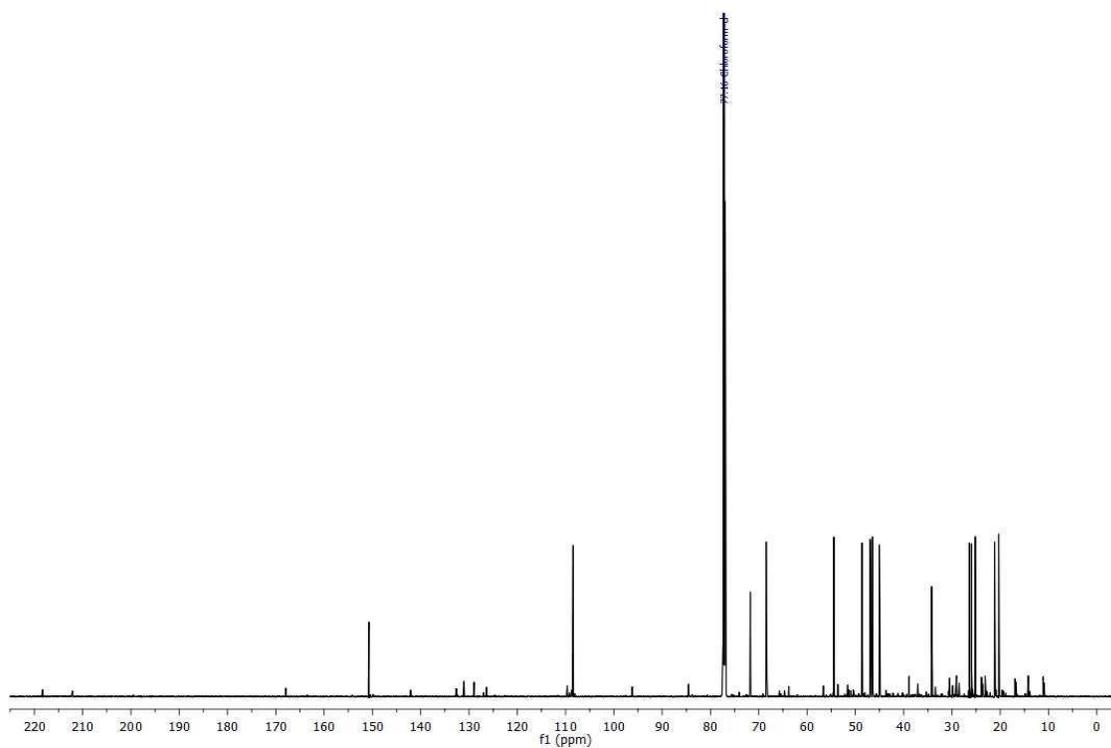
Fracción G (11-21)

Sistema	Fracciones	clave (g)
MeOH - H ₂ O (70:30)	1	
MeOH - H ₂ O (70:30)	2	
MeOH - H ₂ O (70:30)	3	
MeOH - H ₂ O (70:30)	4	
MeOH - H ₂ O (70:30)	6-9	47.1 mg JDM- 7
MeOH - H ₂ O (70:30)	10	

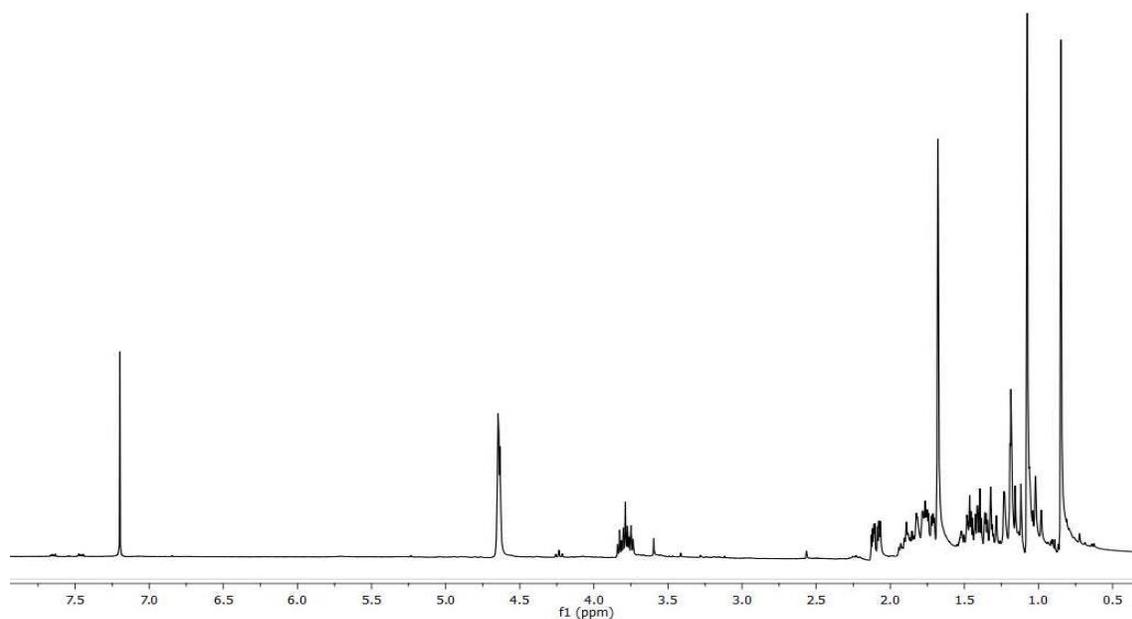
Espectro de ^1H obtenidos por RMN del compuesto JDM-5.



Espectro de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto JDM-5.

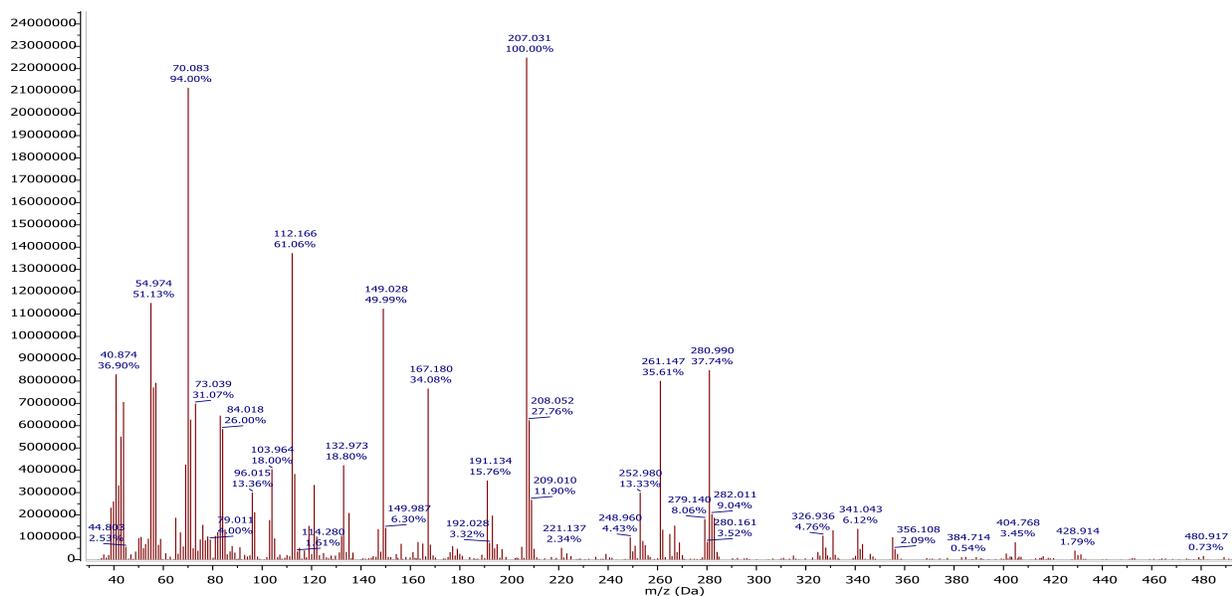


Espectro de ^1H obtenidos por RMN del compuesto JDM-7.

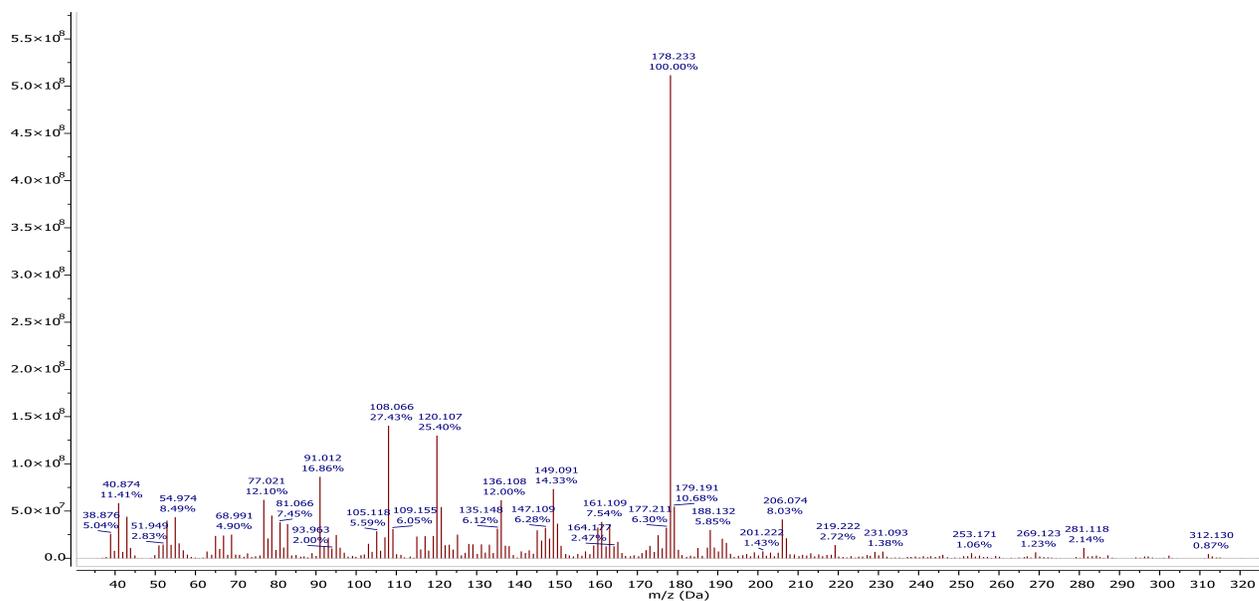


Espectrometría de masas método de ionización (impacto electrónico)

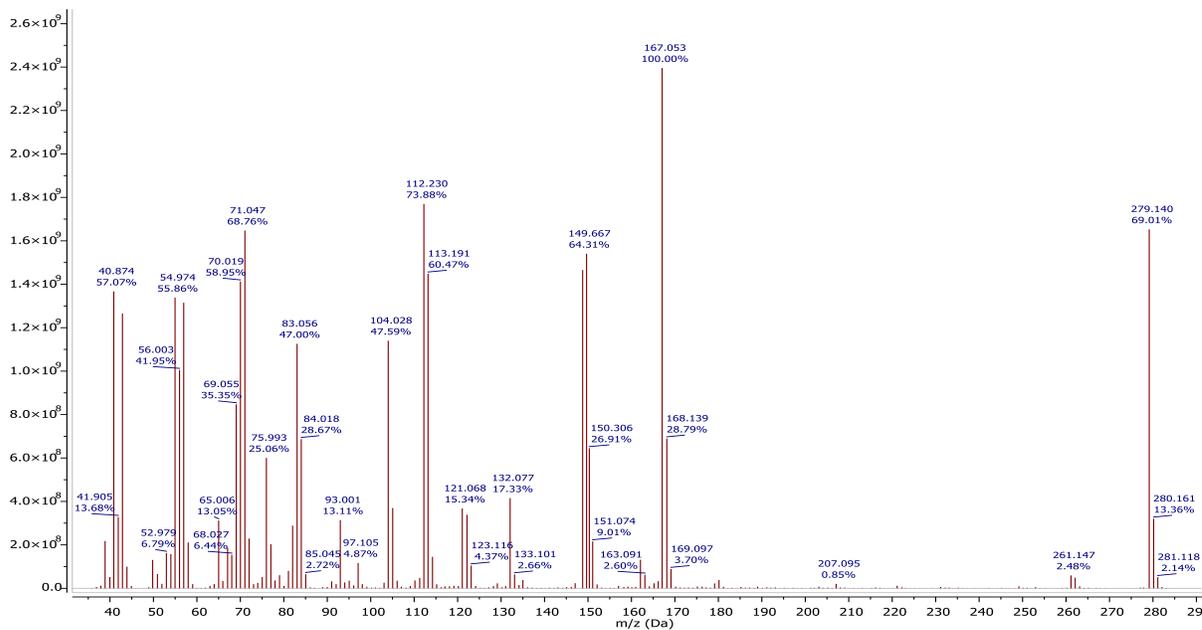
Compuesto JDM-2



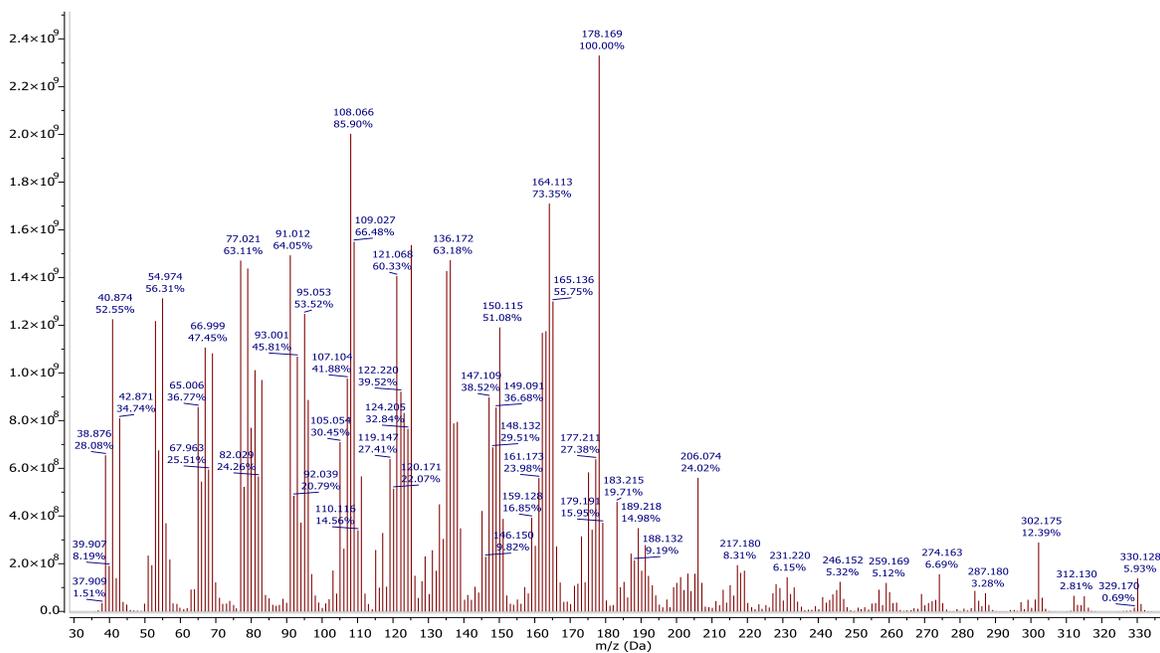
Compuesto JDM3



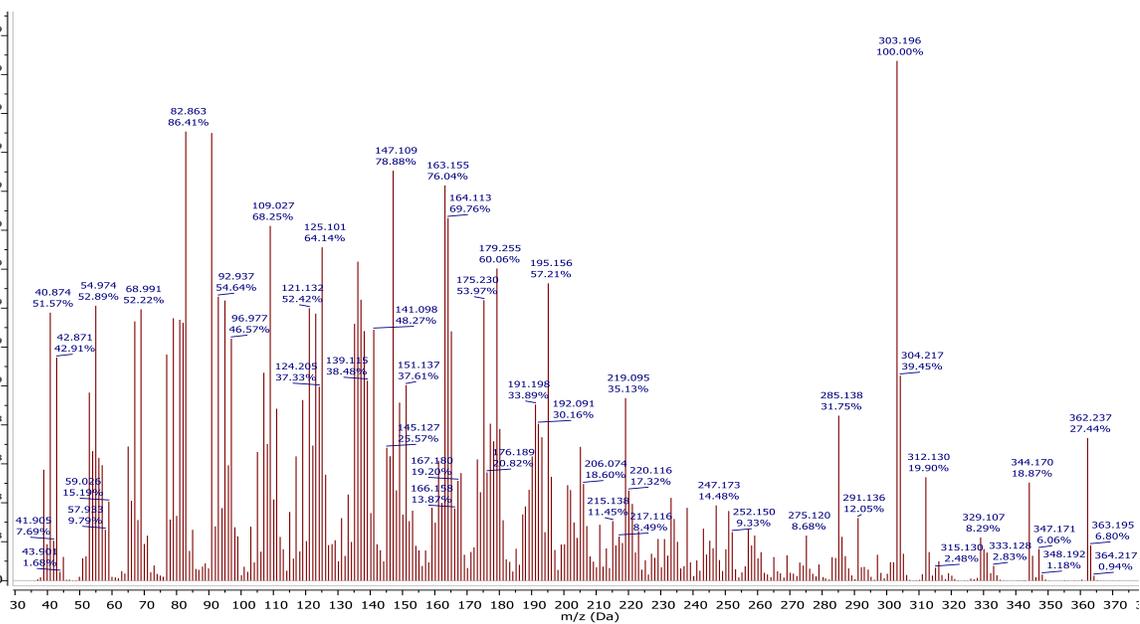
Derivado de la citralitrona 1 (DC1)



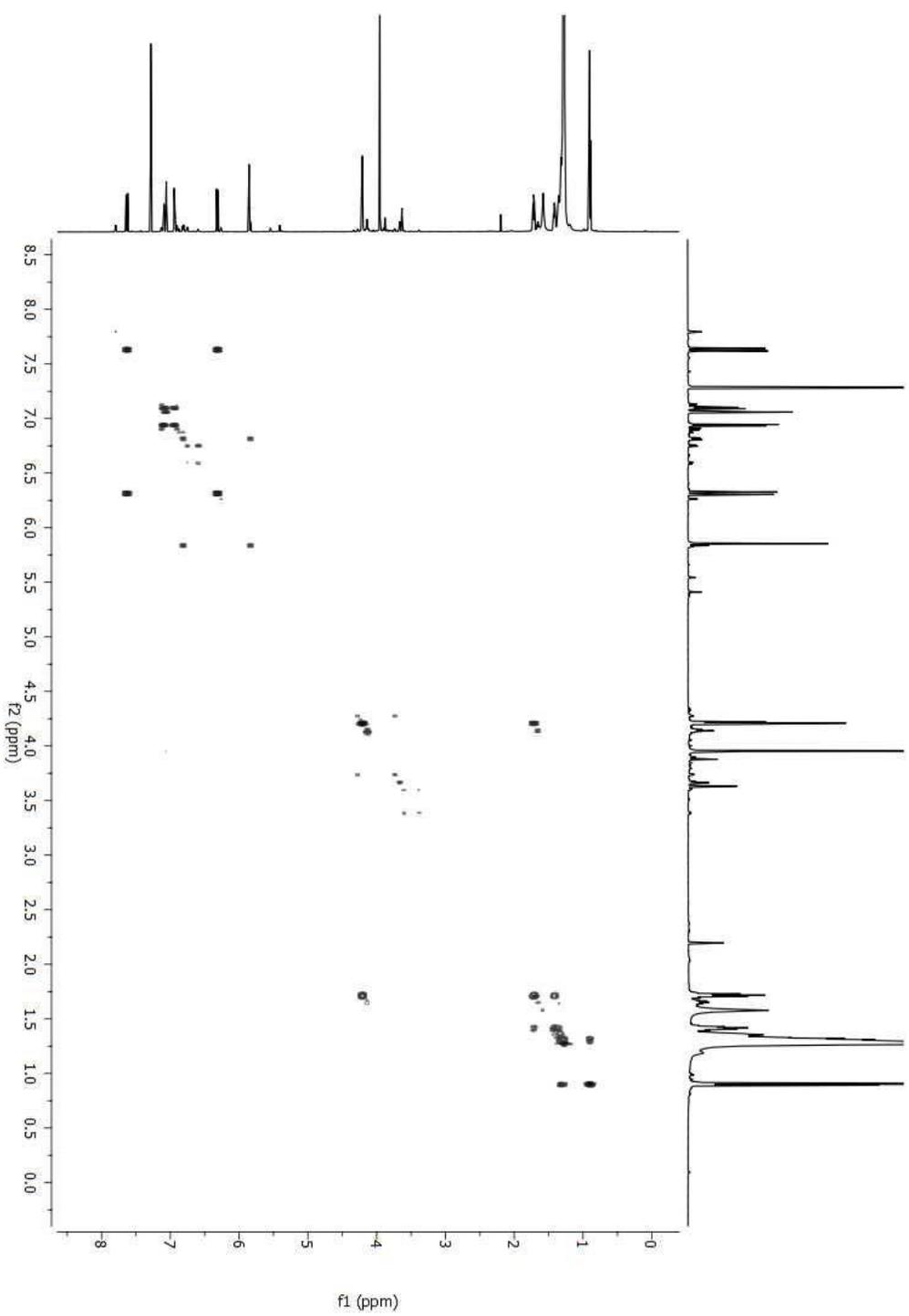
Derivado de la citlalitriona 2 (DC 2)



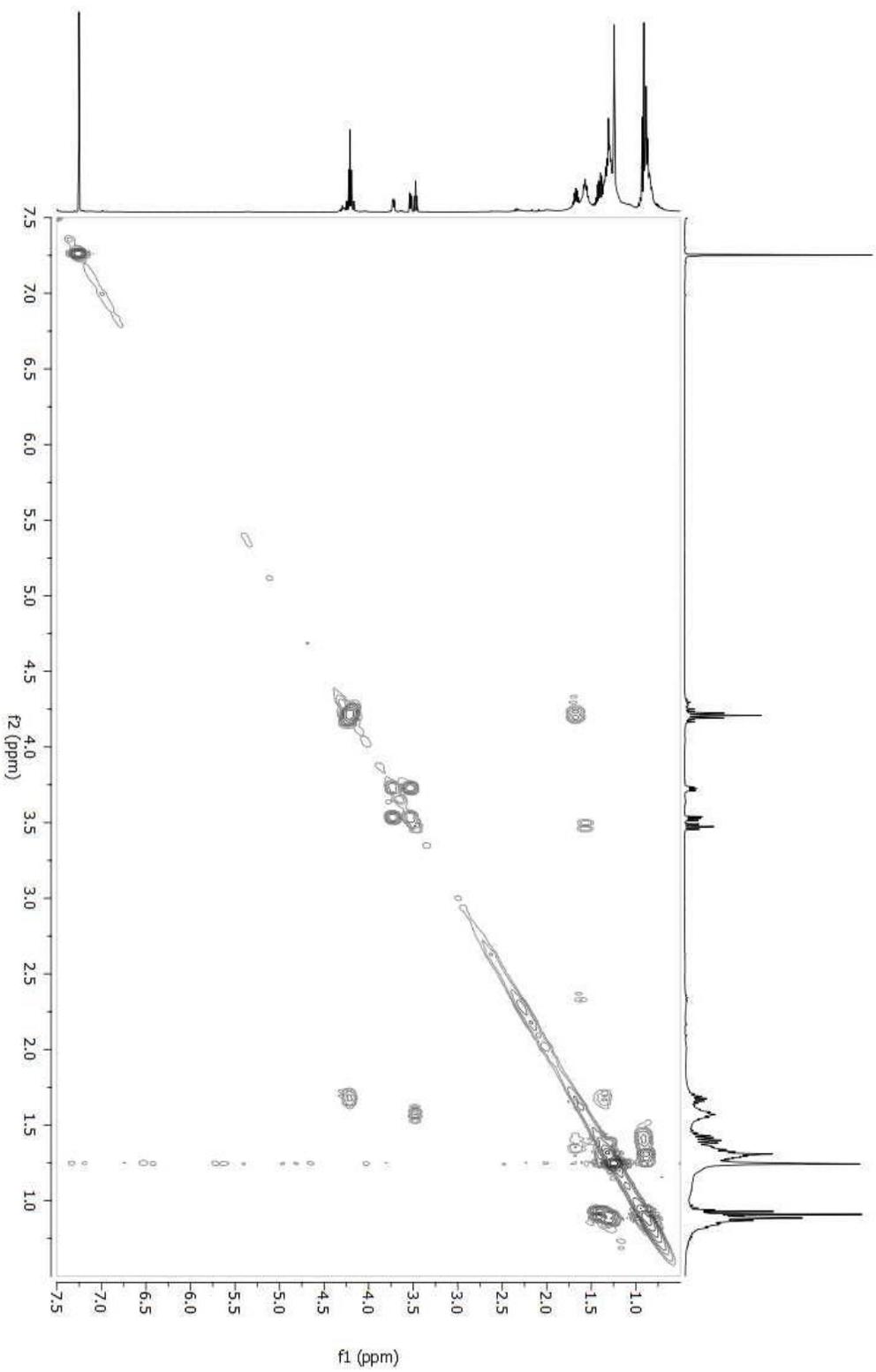
Derivado de la citlalitriona 4 (DC 4)



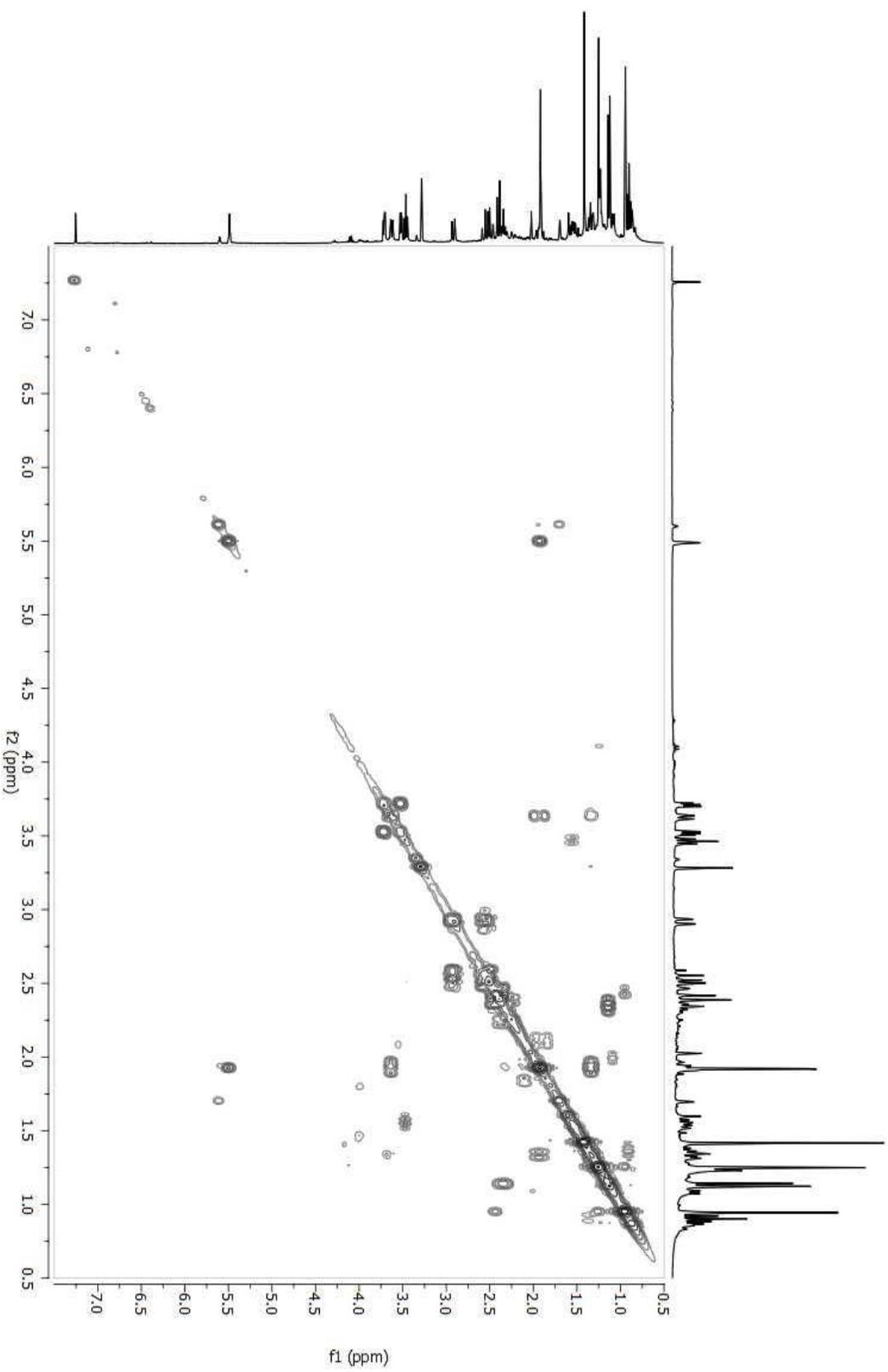
Espectros de correlación (COSY) del compuesto JDM-2.



Espectros de correlación (COSY) del compuesto DC-1.



Espectros de correlación (COSY) del compuesto DC-2.



Espectros de correlación (COSY) del compuesto DC-4.

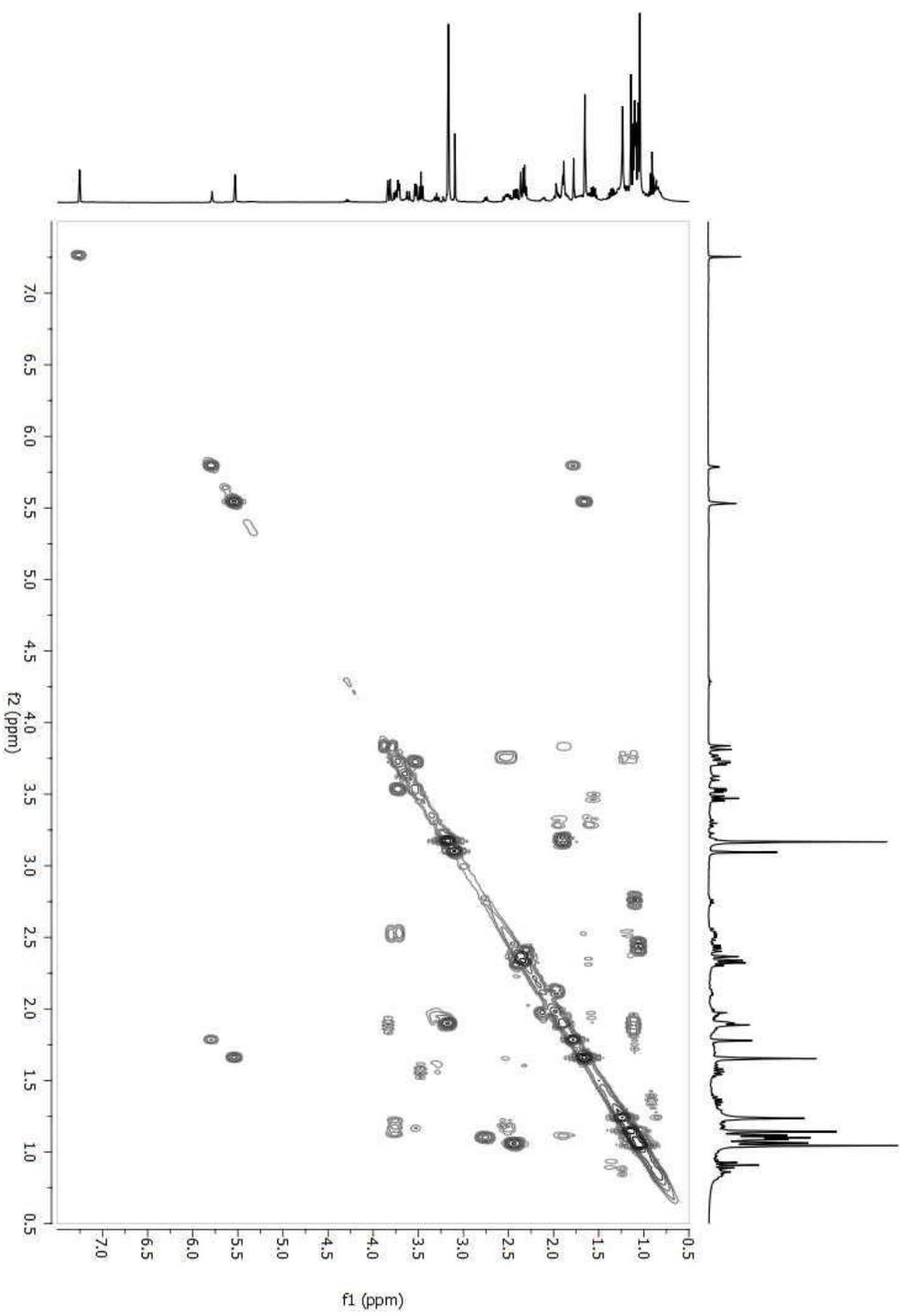


Tabla 1. Ci50 de la vinblastina con los compuestos aislados sobre las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin.

Compuesto	Ci ₅₀ (µg/mL)			Factor de reversión c		
	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺	MCF-7 sens	RF _{MCF-7/Vin⁻}	RF _{MCF-7/Vin⁺}	RF _{MCF-7 sens}
Vinblastina	1.1305 ± 0.40038	1.954 ± 0.3833	0.0598 ± 0.0162			
Citlalitrona 25 µg/ml	0.2182 ± 0.13488	0.617 ± 0.425	0.0290 ± 0.0095	5.1810	3.1680	2.9744
Citlalitrona 5 µg/ml	0.37485 ± 0.2015	1.247 ± 0.4870	0.0278 ± 0.0186	3.0186	1.567	3.1028
Mezcla Jatrofolonas A y B 31.5:68.5 25 µg/ml	0.1142 ± 0.082	0.1926 ± 0.1325	0.0622 ± 0.0263	15.4439	10.177	0.9614
Mezcla Jatrofolonas A y B 31.5:68.5 5 µg/ml	0.2766 ± 0.05953	0.5547 ± 0.0702	0.02463 ± 0.0325	4.0960	3.522	2.491
Mezcla Jatrofolonas A y B 50:50 25 µg/ml	0.1117 ± 0.0720	0.64608 ± 0.13347	0.0135 ± 0.00235	10.1846	3.0247	4.6
Mezcla Jatrofolonas A y B 50:50 5 µg/ml	0.1304 ± 0.0611	0.84285 ± 0.35942	0.0526 ± 0.0456	8.669	2.320	1.196
Mezcla Jatrofolonas A y B 74:26 25 µg/ml	0.1596 ± 0.0944	0.3155 ± 0.351	0.0061 ± 0.00432	7.0833	6.1933	9.966

Mezcla Jatrolonas A y B 74:26 5 µg/ml	0.2713 ± 0.2138	0.5160 ± 0.4193	0.0326 ± 0.00285	4.166	3.7868	1.99
JDM-2 25 µg/ml	0.2482 ± 0.1268		0.0286 ± 0.00396	4.5547		2.99
JDM-2 5 µg/ml	0.4897 ± 0.3496		0.01043 ± 0.00847	2.308		5.75
JDM-3 25 µg/ml	0.558 ± 0.3748	0.1268 ± 0.0702	0.00981 ± 0.00586	2.0259	15.410	6.644
JDM-3 5 µg/ml	0.353 ± 0.304	0.20878 ± 0.03967	0.0167 ± 0.00458	3.202	9.394	3.580
DC-1 25 µg/ml	0.04611 ± 0.0069	0.1219 ± 0.0771	0.0093 ± 0.00284	24.917	16.283	6.43
DC-1 5 µg/ml	0.1852 ± 0.1181	0.533 ± 0.1095	0.06315 ± 0.00985	11.305	3.666	0.9492
DC-2 25 µg/ml	0.0833 ± 0.02303	0.2594 ± 0.2071	0.00817 ± 0.00202	13.5714	7.544	7.475
DC-2 5 µg/ml	0.2688 ±	1.5905 ± 0.1567	0.06223 ± 0.0416	4.205	1.032	0.9614
DC-4 25 µg/ml	0.15416 ± 0.03825	0.3002 ± 0.1506	0.0093 ± 0.00941	7.3409	6.51	6.430
DC-4 5 µg/ml	0.2907 ± 0.03160	1.493 ± 0.10792	0.007221 ± 0.00230	3.892	1.39	8.305
b Reserpina	0.0254 ± 0.0092	0.0225 ± 0.0092	0.0029 ± 0.0011	45.114394	78.5066	29.744

a Diluciones seriadas desde 0.000128 a 2 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia de terpenos (25 µg/mL 5µg/mL), b Reserpina = 5 µg/mL como control positivo, c FR = CI 50 Vinblastina/ CI 50 Vinblastina en presencia de terpeno. Cada valor representa la media ± D.E. de nueve experimentos.