

**GLICOLÍPIDOS DE *Sargassum filipendula* COMO FUENTE
NATURAL DE REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA MEDIADA POR
LOS TRANSPORTADORES ABC EN EL CÁNCER**

KELLY JOHANA MUÑOZ LOSADA

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Medellín

2023

**GLICOLÍPIDOS DE *Sargassum filipendula* COMO FUENTE
NATURAL DE REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA MEDIADA POR
LOS TRANSPORTADORES ABC EN EL CÁNCER**

KELLY JOHANA MUÑOZ LOSADA



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Medellín

2023

**GLICOLÍPIDOS DE *Sargassum filipendula* COMO FUENTE
NATURAL DE REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA MEDIADO POR
LOS TRANSPORTADORES ABC EN CÁNCER**

KELLY JOHANA MUÑOZ LOSADA

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Ciencias Químicas

Director:

Ph.D. Miguel A. Puertas Mejía

Coasesor:

Ph.D. Juan Camilo Mejía Giraldo



**GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE COMPUESTOS FUNCIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Medellín

2023

**GLICOLÍPIDOS DE *Sargassum filipendula* COMO FUENTE
NATURAL DE REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA MEDIADA POR
LOS TRANSPORTADORES ABC EN EL CÁNCER**

KELLY JOHANA MUÑOZ LOSADA

“Prohibida la reproducción sin la autorización expresa del autor”

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Medellín

2023

Dedico este trabajo de grado a todos aquellos que me apoyaron en esta ardua jornada, mis padres Nancy y Nelson, mis hermanos y amigos, pero sobre todo a Dios por darme la fortaleza y oportunidad de no caer en el camino elegido.

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos al maestro y tutor el Dr. Miguel Ángel Puertas Mejía, por el apoyo incondicional en la ejecución de este proyecto, así como al Dr. Juan Camilo Mejía Giraldo, por su acompañamiento, enseñanza y guía permanente durante este proceso de formación.

A mis compañeras Deysi Tatiana y Yonadys del Grupo de investigación en Compuestos Funcionales de la Universidad de Antioquia, por acogerme, abrirme las puertas y recibirme con tanta amabilidad.

Mi más eterno agradecimiento a la Dra. Lucia Mendonça Previato, por la oportunidad de realiza mi instancia de investigación en el laboratorio de Glicobiología del instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho de la UFRJ, y poner a disposición los equipos, materiales y personal de laboratorio.

A la Dra. Kelly Monteiro Da Costa del laboratorio de Glicobiología de la UFRJ, por su amistad, confianza y por la constante asistencia técnica en el manejo de los equipos y ensayos biológicos.

A la Universidad de Antioquia y al programa de Maestría en Ciencias Químicas por el estímulo académico de estudiante instructor, así como a sus maestros por la formación académica otorgada, que contribuyeron a la obtención del título de Magister en Ciencias Químicas.

A todos los que de diferentes formas aportaron con el desarrollo y finalización de esta investigación.

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. A pesar de los avances en la quimioterapia, la diversidad de tumores, los efectos secundarios y la resistencia a múltiples fármacos (MDR) hacen que sea cada vez más difícil tratar esta enfermedad. La MDR se caracteriza por la sobreexpresión de los transportadores ABC, que expulsa los fármacos utilizados en quimioterapia, siendo el principal obstáculo para la eficacia de su tratamiento. Varios productos de origen natural o sintético son inhibidores potenciales de ABC y revierten el fenotipo MDR cuando se administran junto con medicamentos. Las especies de macroalga marinas del género *Sargassum* presentan un alto contenido de glicolípidos, que exhiben diferentes actividades biológicas. Por lo tanto, el propósito de esta investigación es evaluar el potencial de los glicolípidos aislados de la macroalga marina *Sargassum filipendula* como moduladores de los transportadores ABC (ABCB1, ABCC1 y ABCG2) involucrados en la resistencia a múltiples fármacos en células cancerosas. La extracción de los glicolípidos de *S. filipendula* se realizó mediante la técnica de maceración exhaustiva a temperatura ambiente con cloroformo/metanol 2:1 (v/v). El extracto se purificó por cromatografía en columna y en capa fina y espectroscopia UV-Vis. Las fracciones enriquecidas en glicolípidos se caracterizaron por FTIR, NMR en 1D (^1H , ^{13}C) y 2D (COSY, HSQC y HMBC) y LC-MS. El ensayo de viabilidad celular mediante el marcaje por PI y la inhibición de los transportadores ABC, se analizaron por citometría de flujo. Finalmente, el estudio de la reversión de la resistencia se determinó por el ensayo MTT. Se obtuvieron siete fracciones enriquecidas en glicolípidos, en las cuales se identificaron 10 compuestos de tipo sulfoquinovosilgliceroles. Seis de las fracciones inhibieron la actividad de los transportadores ABCB1 y ABCC1, mientras que, la fracción denominada GL-1 no mostró ningún efecto inhibitorio. Por otro lado, ninguna de las fracciones moduló el transporte de ABCG2. La fracción GL-4 en combinación con el fármaco antineoplásico, potencializó la citotoxicidad de la vincristina en líneas celulares de Lucena-1, revirtiendo el fenotipo de la MDR. Este es el primer reporte de glicolípidos aislados de *S. filipendula* capaces de inhibir las bombas de eflujo y con ello vencer la resistencia adquirida a los medicamentos.

Palabras claves: glicolípidos, *Sargassum filipendula*, transportadores ABC, cáncer, MDR.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Despite advances in chemotherapy, the diversity of tumors, side effects, and multidrug resistance (MDR) make it increasingly difficult to treat this disease. MDR is characterized by ABC transporter overexpression, which expels chemotherapy drugs, which is the main obstacle to their treatment efficacy. Several products of natural or synthetic origin are potential ABC inhibitors and reverse the MDR phenotype when administered together with drugs. Marine macroalgae species of the genus *Sargassum* present a high glycolipids content, exhibiting different biological activities. Therefore, this research aims to evaluate the potential of glycolipids isolated from the marine macroalga *Sargassum filipendula* as modulators of ABC transporters (ABCB1, ABCC1, and ABCG2) involved in multidrug resistance in cancer cells. Extraction of *S. filipendula* glycolipids was performed by exhaustive maceration technique at room temperature with 2:1 (v/v) chloroform/methanol. The extract was purified by column and thin-layer chromatography and UV-Vis spectroscopy. Glycolipid-enriched fractions were characterized by FTIR, 1D (¹H, ¹³C) and 2D (COSY, HSQC, and HMBC) NMR, and LC-MS. Cell viability assay by PI labeling and inhibition of ABC transporters were analyzed by flow cytometry. Finally, the resistance reversion study was determined by MTT assay. Seven glycolipid-enriched fractions were obtained, in which 10 sulfoquinovosylglycerol-type compounds were identified. Six of the fractions inhibited the activity of ABCB1 and ABCC1 transporters, while the GL-1 fraction showed no inhibitory effect. On the other hand, none of the fractions modulated ABCG2 transport. The GL-4 fraction, combined with the antineoplastic drug potentiated the cytotoxicity of vincristine in Lucena-1 cell lines by reversing the MDR phenotype. This is the first report of glycolipids isolated from *S. filipendula* capable of inhibiting efflux pumps and consequently overcoming acquired drug resistance.

Keywords: glycolipids, *Sargassum filipendula*, ABC transporters, cancer, MDR.

Contenido

Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Capítulo 1	1
Planteamiento del problema	1
Capítulo 2	3
Estado de arte	3
2.1 Cáncer: desarrollo y causas	3
2.2 Algas marinas	16
2.3 Técnica de extracción de glicolípidos	24
Capítulo 3	26
Hipótesis	26
Capítulo 4	27
Objetivos	27
Capítulo 5	28
Materiales	28
5.1 Material Biológico	28
5.2 Materiales y reactivos químicos	29
5.3 Equipos	29
Capítulo 6	30
Metodología	30
6.1 Obtención del extracto	30
6.2 Fraccionamiento de glicolípidos	30
6.3 Análisis químico	31
6.4 Caracterización química de los glicolípidos	33
6.5 Mantenimiento celular	35
6.6 Ensayos biológicos	36
6.7 Análisis estadísticos	37
Capítulo 7	39
Resultados y Discusión	39
7.1 Obtención del extracto orgánico y fraccionamiento	39
7.2 Análisis químico	39

7.3	Caracterización química de los glicolípidos	42
7.4	Evaluación de la actividad de inhibición de los miembros de la familia ABC involucrados en la resistencia a múltiples fármacos en líneas celulares de Lucena-1	56
7.5	Análisis de la reversión de la resistencia inducida por los transportadores ABC	70
Capítulo 8	72
Conclusiones	72
Bibliografía	74
Anexos	89

Lista de tablas

Tabla 1. Glicolípidos encontrados en el género <i>Sargassum</i> y sus actividades farmacológicas.....	20
Tabla 2. Rendimiento de las fracciones enriquecidas en glicolípidos de <i>S. filipendula</i>	39
Tabla 3. Cuantificación de azúcares neutros y sulfonados del extracto crudo y las fracciones de glicolípidos.	40
Tabla 4. Correlación espectroscópica de los glicolípidos, determinada por RMN ^1H y ^{13}C	51
Tabla 5. Identificación de los sulfoquinovosilgliceroles presente en las fracciones de glicolípidos de <i>S. filipendula</i>	55

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de la Daunorrubicina.	5
Figura 2. Estructura química de la Vincristina	6
Figura 3. Estructura del 5-fluorouracilo.	7
Figura 4. Mecanismos de resistencia a los medicamentos contra el cáncer.	8
Figura 5. Estructura de la proteína relacionada a resistencia a drogas (ABCB1).	10
Figura 6. Estructura de la proteína relacionada a resistencia a múltiples drogas (ABCC1).	13
Figura 7. Modelo de topología de membrana de ABCG2.	15
Figura 8. Representación esquemática de los principales patrones de corrientes oceánicas y áreas de acumulación de sargazo en el Océano Atlántico.	17
Figura 9. Glicolípidos de algas del género <i>Sargassum</i>	19
Figura 10. Estructura de glicolípidos presentes en <i>Sargassum</i>	23
Figura 11. Descripción general de los métodos de extracción y cuantificación de glicolípidos en algas pardas.	24
Figura 12. Proceso de obtención de extracto y fraccionamiento de glicolípidos en <i>S. filipendula</i>	31
Figura 13. Cuantificación de azúcares neutros y sulfonados.	33
Figura 14. Caracterización química de los glicolípidos de <i>S. filipendula</i>	35
Figura 15. Ensayos biológicos.	38
Figura 16. Descripción general del método de Dubois.	41
Figura 17. Curvas de calibración para: A. Contenido de azúcares neutros, y B. Contenido de azúcares sulfonados.	41
Figura 18. Descripción general de la interacción DMB con los glicolípidos.	42
Figura 19. Espectro de absorción UV-Visible de las fracciones enriquecida en glicolípidos.	43
Figura 20. Espectro FTIR de la fracción GL-3.	44
Figura 21. Comparación de espectros FTIR de las fracciones enriquecidas en glicolípidos.	45
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, señal del MeOD δ _H : 3.32 ppm) del glicolípido GL-4.	46
Figura 23. Espectro RMN ¹³ C del glicolípido GL-4.	47
Figura 24. Espectro HSQC del núcleo del glúcido y el esqueleto del glicerol del glicolípido GL-4.	48
Figura 25. Espectro COSY de correlación entre protones (3JH-H) del glicolípido GL-4.	48
Figura 26. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.	49
Figura 27. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.	50
Figura 28. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.	50
Figura 29. Perfil cromatográfico (TIC) de las fracciones enriquecidas en glicolípidos de <i>S. filipendula</i>	52
Figura 30. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 793.5 (compuesto S4)..	53
Figura 31. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 555 (compuesto S1)....	54
Figura 32. Diagrama de puntos de tamaño vs granularidad de células de Lucena-1.	56
Figura 33. Ensayo de eflujo del sustrato rodamina 123 (Rho 123) en células Lucena-1.	58
Figura 34. Actividad de inhibición del transporte de ABCC1 en líneas celulares de Lucena-1 por los glicolípidos de <i>S. filipendula</i>	61
Figura 35. Índice de inhibición del transporte CF (Δ) para las líneas celulares de Lucena-1 en presencia de los glicolípidos.	62
Figura 36. Histograma del ensayo de viabilidad celular determinada por el método de tinción PI.	63
Figura 37. Viabilidad celular determinada por el ensayo PI en el modelo celular de Lucena-1 después del tratamiento con los glicolípidos.	64

Figura 38. Actividad de inhibición del transporte de ABCC1 en líneas celulares de Lucena-1 por los glicolípidos de <i>S. filipendula</i>	66
Figura 39. Índice de inhibición del transporte CF (Δ) para las líneas celulares de Lucena-1 en presencia de los glicolípidos.....	68
Figura 40. Índice de inhibición de transporte de MTX (Δ) para las líneas celulares de Lucena-1 en presencia de los glicolípidos.....	69
Figura 41. Reversión de la actividad MDR en células de Lucena-1 por la fracción GL-4.	70
Figura 42. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.....	89
Figura 43. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.....	89
Figura 44. Viabilidad celular determinada por el ensayo PI en el modelo celular de Lucena-1.	90
Figura 45. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 577.5	91
Figura 46. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 765.5	91
Figura 47. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 805.5	92
Figura 48. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 819.5	92
Figura 49. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 821.5	93
Figura 50. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 835.5	93
Figura 51. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 875.5	94
Figura 52. Espectro de MS ¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 877.6	94

Capítulo 1

Planteamiento del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial con más de 9 millones de casos para el 2020, siendo el cáncer de pulmón (19.7%), colon (10.2%), hígado (9.1%), estómago (8.4%) y mama (7.5%) los más representativos. Se estima que para el año 2040 los índices de cáncer superarán los 28 millones casos y unos 6.2 millones de muertes, atribuidas principalmente a factores de riesgo como estilo de vida, obesidad, radiación UV, consumo de alcohol y agentes infecciosos. En Colombia, la incidencia en cáncer para el año 2020, fue de 1041013 casos, de los cuales, 481028 personas fallecieron, principalmente por cáncer de pulmón (12.2%), cáncer colorrectal (15.5%), cáncer de mama (12.9%) y cáncer de próstata (12.7%) (World Health Organization, 2022).

A pesar de los constantes avances en los tratamientos de quimioterapia, cada vez es más difícil tratar esta enfermedad debido a la diversidad tumoral, la resistencia a los fármacos antitumorales y los efectos secundarios de dichos tratamientos (Elmore et al., 2021; Janice Ann Gabriel, 2007). La resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés, *Multidrug Resistance*) generada por las células cancerosas es uno de los mayores problemas asociados en la quimioterapia, aumentando la tasa de morbilidad y mortalidad, así como los costos financieros en el sector de la salud. La quimiorresistencia de las células cancerosas se da por diferentes mecanismos tales como la inhibición de las vías de apoptosis, reparación de los fragmentos de ADN, alteración del compartimiento de las enzimas involucradas en el metabolismo del fármaco o mecanismos de transporte, entre otros (Bar-Zeev et al., 2017; Wu et al., 2011). Uno de los mecanismos más frecuentes del fenotipo de MDR comprende la sobreexpresión de proteínas transportadoras perteneciente a la familia ABC, en particular, ABCB1 (glicoproteína P o P-gp), ABCG2 (proteína de resistencia al cáncer de mama, BCRP) y miembros de la subfamilia ABCC (proteína de resistencia a múltiples fármacos, MRP) (Ween et al., 2015). La función principal de dichas proteínas es la expulsión de todo compuesto xenobiótico como los fármacos anticancerígenos, desde el interior de la célula

hasta el medio extracelular, disminuyendo así la acumulación de este y por tanto evitando la muerte de las células tumorales (Bar-Zeev et al., 2017; S.-F. Zhou et al., 2008).

Con el objetivo de poder revertir el efecto de la MDR inducida por los transportadores ABC en células cancerosa, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones sobre moléculas bioactivas capaces de inhibir su función y de esta manera aumentar la concentración intracelular de los fármacos. Diversos productos de origen natural y/o sintéticos, como flavonoides, alcaloides, terpenos y derivados sintéticos de diterpenos han demostrado ser un potencial inhibitorio de la función de los transportadores cuando se coadministran con los fármacos implementados en la quimioterapia (H. Cui et al., 2015; Xiao et al., 2023). Algunas investigaciones, han sugerido que los glicolípidos también hacen parte de las sustancias que revierten con eficacia los efectos de las bombas de eflujo sin generar efectos citotóxicos (Castañeda-Gómez et al., 2017; Cruz-Morales et al., 2012, 2016).

Colombia, además de ser un país megadiverso en fauna y flora terrestre, también cuenta con una gran variedad de organismos marinos. Las macroalgas pertenecientes al género *Sargassum* están representadas por una variedad de especies reconocidas por su actividad biológica y son las más representativas en el territorio colombiano (Camacho et al., 2015). Actualmente no se han reportado estudios de aislamiento de glicolípidos pertenecientes a la especie *Sargassum filipendula*, los cuales pueden ser una alternativa terapéutica para la inhibición de las MDR. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de investigación es evaluar el potencial de los glicolípidos presentes en *Sargassum filipendula*, frente a la resistencia inducida por transportadores ABC involucrados en el fenotipo de las MDR en células cancerosas.

Capítulo 2

Estado de arte

2.1 Cáncer: desarrollo y causas

El cuerpo humano está conformado por billones de células diferentes en forma, tamaño, distribución y función, las cuales son consideradas la estructura funcional de los seres vivos. Cuando una célula normal sufre algún daño genético como mutaciones u otras alteraciones que no pueden ser reparadas, activa una vía de apoptosis o muerte celular programada para así controlar su desarrollo y crecimiento (Puente, Javier; Velazco, 2019). La transformación de células normales a células cancerosas se da principalmente por agentes ambientales, diversos tipos de radiación, inactividad física, factores de dieta, obesidad, tabaquismo, alcoholismo, herencia, agentes infecciosos como parásitos, virus y bacterias, que causan mutaciones en el ADN, por lo que las células continúan con su crecimiento y diseminación incontrolada (National Cancer Institute, 2022; Partanen et al., 2009). Este proceso es conocido como carcinogénesis y se reconocen cuatro fases:

1. Inducción o iniciación: aparecen las mutaciones del ADN que convierten las células sanas en células cancerosas: división incontrolada, capacidad de invasión local y de diseminación a distancia.
2. Cáncer “*in situ*”: incremento del número de células cancerosas en el órgano o tejido en el que se origina produciendo el tumor primario.
3. Invasión local: extensión del tumor primario a las estructuras vecinas, invadiéndolas y dando paso a los primeros síntomas.
4. Invasión a distancia o metástasis: las células cancerosas acceden al torrente sanguíneo diseminándose a otros órganos, y originando tumores secundarios.

2.1.1 Tipos de Cáncer

La clasificación y tipos de cáncer se da en función del sitio de origen de la enfermedad y por sus características histológicas (composición, estructura y características) o de tejido. La OMS en el año 2000 publicó la *Clasificación Internacional de Enfermedades para*

Oncología, en la cual existen más de 100 tipos de cáncer (World Health Organization, 2019), que se agrupan en las siguientes categorías:

1. Carcinoma: es el cáncer más común de origen epitelial y es capaz de afectar órganos o glándulas de secreción. Existen dos subtipos de carcinoma, el adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas.
2. Sarcoma: cáncer que se forma en tejidos conectivos y de apoyo como el tejido óseo y tejidos blandos, incluyendo músculos, tejido adiposo, vasos linfáticos, sanguíneos, tendones y tejido fibroso.
3. Mieloma: cáncer que inicia en las células plasmáticas (un tipo de glóbulos blancos) en la médula ósea, formando tumores en muchos huesos, además no permite la producción de células sanguíneas sanas.
4. Leucemia: cáncer derivado de los tejidos que forma la sangre en la médula ósea o sus precursores. Este tipo de cáncer no forman tumores sólidos, en lugar de esto, los glóbulos blancos anormales (células leucémicas) se acumulan en la sangre desplazando los glóbulos normales en la sangre.
5. Linfoma: cáncer del sistema linfático que afecta específicamente a células T o células B, que a diferencia de la leucemia producen tumores sólidos con la capacidad de afectar ganglios u otros órganos en el cuerpo (World Health Organization, 2022).

2.1.2 Tratamientos contra el Cáncer

Existen diferentes tipos de tratamientos contra el cáncer y su selección depende del tipo de cáncer y el estadio o fase en que se encuentra, aunque también se debe tener en consideración la edad y otros problemas de salud. Algunas personas con cáncer solo recibirán un tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría de los pacientes reciben una combinación de estos (National Cancer Institute, 2022). Algunos de los tratamientos contra el cáncer incluyen la cirugía, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, trasplante de células madre y la quimioterapia. Este último, es el tratamiento que más se aplica contra diferentes tipos de cáncer donde se implementan fármacos que detienen o hacen más lento el crecimiento de las

células cancerosas. Además, se usa con otros tratamientos ayudando a reducir el tamaño de tumores, destruir células cancerosas persistentes después de la cirugía o radioterapia, y aniquilar células cancerosas que han regresado o que se han extendido a otras partes del cuerpo (Dickens & Ahmed, 2021; National Cancer Institute, 2022).

2.1.3 Fármacos implementados en la quimioterapia

Los medicamentos se podrían clasificar de diferentes maneras, en función de su naturaleza/fuente química, diana molecular, mecanismo de acción o eficacia en sistemas modelo contra diversos tipos de neoplasias malignas. Sin embargo, es posible agrupar los medicamentos de quimioterapia en agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la mitosis y corticoesteroides (American Cancer Society, 2019; Anand et al., 2022). A continuación, se nombran algunos de los agentes quimioterapéuticos más empleados:

Daunorrubicina

Es un fármaco de quimioterapia antineoplásico, un antibiótico glucósido originalmente aislado por fermentación aeróbica de *Streptomyces peucetius*. Ampliamente utilizado en tratamiento de las leucemias mieloides agudas. El mecanismo de acción se basa en su intercalamiento en el ADN, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, ya que dificulta el avance de la enzima topoisomerasa II, encargada del desenrollamiento del ADN en el proceso de transcripción (Laurent & Jaffrézou, 2001).

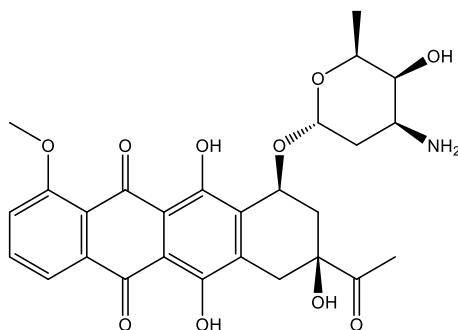


Figura 1. Estructura química de la Daunorrubicina.

Vincristina

Es un fármaco citotóxico que se usa contra el cáncer testicular, de mama, pulmonar, de cabeza y cuello. Es un tipo de alcaloide extraído de la planta *Vinca rosea*. Actúa en el estadio de la metafase del ciclo celular uniéndose a la tubulina e inhibe el ensamble de los microtúbulos, necesarios para la separación de los cromosomas durante la anafase. La inhibición de estas estructuras provoca la muerte celular (Moore & Pinkerton, 2009).

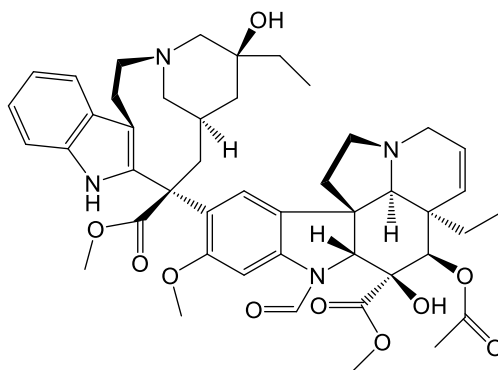


Figura 2. Estructura química de la Vincristina

5-Fluorouracilo

El 5-FU es un agente antitumoral sintético que pertenece al grupo de fármacos antimetabolitos que actúan inhibiendo los procesos biosintéticos esenciales o incorporándose a macromoléculas, como el ADN y el ARN, e inhibiendo su función normal. Tiene actividad antitumoral contra los adenocarcinomas que se originan en la mama, el tracto gastrointestinal y el ovario, y contra los carcinomas de células escamosas que se originan en la cabeza, el cuello y el esófago (Longley et al., 2003).

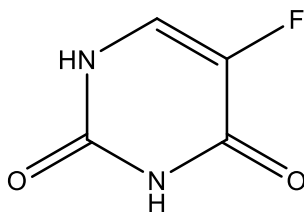


Figura 3. Estructura del 5-fluorouracilo.

2.1.4 Resistencia en la quimioterapia

Desde la inclusión de la quimioterapia en el tratamiento de linfoma y leucemia, a finales de la segunda guerra mundial, la quimioterapia se ha convertido en una de las principales modalidades terapéuticas en el tratamiento del cáncer (Pan et al., 2016). Sin embargo, la resistencia relevante y los efectos secundarios graves han acompañado a los tratamientos como los principales obstáculos clínicos para una cura exitosa del cáncer (Rebucci & Michiels, 2013).

La resistencia al cáncer puede clasificarse en dos categorías, la innata y adquirida. La resistencia innata a los medicamentos aparece antes del tratamiento, mientras que la resistencia adquirida se desarrolla después de la terapia inicial (Rebucci & Michiels, 2013). En algunos pacientes, la exposición prolongada a un solo agente quimioterapéutico puede contribuir al desarrollo de resistencia cruzada frente a otros medicamentos, este fenómeno se denomina Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR, del inglés, *Multidrug Resistance*) (Raguz & Yagüe, 2008). Los mecanismos subyacentes para el desarrollo de la resistencia a los fármacos contra el cáncer son complicados e involucran alteración en las vías de apoptosis que conducen a la supervivencia celular, cambios en los objetivos específicos de cada fármaco, aumento de la salida del fármaco (bombas de eflujo) o disminución de la entrada, quimiorresistencia mediada por hipoxia, alteración en el comportamiento enzimático que conduce a la activación de anti-profármaco contra el cáncer, reparación de ADN, entre otros (Figura 4) (Abdullah & Chow, 2013; Bar-Zeev et al., 2017).

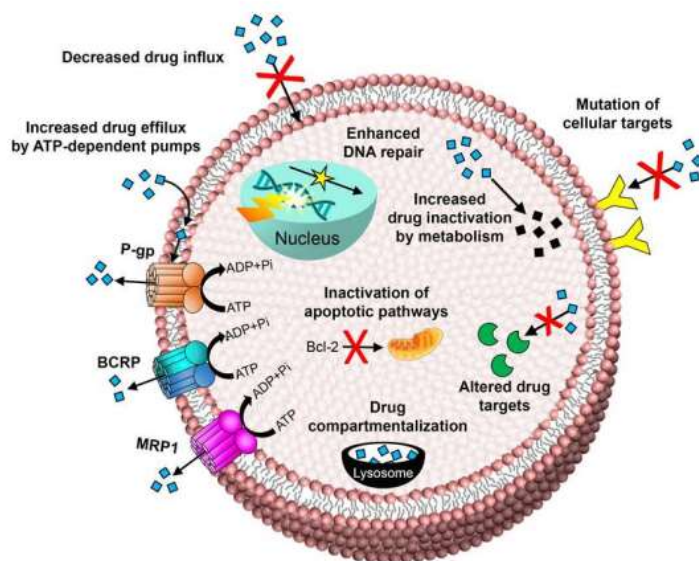


Figura 4. Mecanismos de resistencia a los medicamentos contra el cáncer. Tomado de (Bar-Zeev et al., 2017).

Las bombas de eflujo, implicadas en el fenotipo de las MDR, son transportadores de membrana constituidas por proteínas que se encuentran involucradas en la excreción de sustancias tóxicas desde el interior de la célula hasta el medio externo, principalmente como mecanismo de resistencia (Jones & George, 2004). La mayoría de estas proteínas hacen parte de la familia de transportadores casete de unión al ATP (ABC, del inglés, *ATP-binding cassette*), especializadas en el transporte activo, depende de la captación e hidrólisis del ATP (L. Huang et al., 2022).

Existen aproximadamente 49 tipos de transportadores ABC en humanos, repartidos en subfamilias desde las ABCA hasta las ABCG, de los cuales 15 han sido identificados como transportadores clínicamente activos involucrados en la resistencia a fármacos (Jaramillo et al., 2018). Entre ellos, los transportadores ABCB1, proteína de resistencia a los medicamentos o glicoproteína p (P-gp, del inglés, *P-glycoprotein*); ABCC1, proteínas asociadas a la resistencia (MRP, del inglés, *Multidrug Resistance-associated Protein*) y ABCG2 o proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP, del inglés, *Breast Cancer Resistance Protein*) son los más representativos (Ween et al., 2015). A pesar del papel de los

transportadores en la fisiología normal, la sobreexpresión de estos en las células tumorales provoca resistencia a varios agentes citotóxicos en la quimioterapia del cáncer (Borst et al., 2000; Pan et al., 2016).

Proteína ABCB1

La proteína de transporte ABCB1 comúnmente llamada P-gp fue caracterizada por primera vez por Ling y colaboradores en 1974 en células de ovario de hámster chino (CHO, del inglés, *Chinese Hamster Ovary*) resistentes a múltiples fármacos (Ling & Thompson, 1974). No obstante, este transportador se encuentra en tejidos normales, típicamente en células epiteliales de todo el cuerpo y es endógena del tracto gastrointestinal, el hígado, los riñones, los testículos, los ovarios, las glándulas suprarrenales y pituitarias, la placenta, el plexo coroideo y los capilares del cerebro, además de cumplir una función protectora que limita la absorción de xenobióticos en las células endoteliales de los capilares cerebrales que forman la barrera hematoencefálica (Ambudkar et al., 2003; Leslie et al., 2005).

La ABCB1 exporta en mayor medida sustratos hidrofóbicos, especialmente compuestos aromáticos, aunque también compuestos xenobióticos neutros o cargados positivamente y raramente compuestos anfipáticos (Sharom, 2011; Silva et al., 2015). La proteína ABCB1 presenta una estructura típica de transportadores ABC con una única cadena polipeptídica de 1280 aminoácidos, con dos mitades homólogas, que contienen seis dominios transmembrana (TMD, del inglés, *Transmembrane Domain*) y un dominio de unión de ATP separado por una región enlazadora flexible suficiente para la interacción de las dos mitades, favoreciendo la comunicación entre los dos sitios de ATP. Las dos regiones homólogas interactúan para formar un solo transportador y los principales dominios de unión de sustratos residen en los dominios transmembrana 4, 5, 6, 10, 11 y 12 (Ambudkar et al., 2003; Loo & Clarke, 1999). Los reportes sugieren un modelo de la proteína en el que los TMD formarían una cavidad de unión al sustrato en forma de embudo (Figura 5): la porción más angosta miraría hacia el lado citoplásmico, la región central sería el supuesto sitio de unión al sustrato (también llamado sitio de unión) y la porción más grande que mira hacia el medio extracelular sería el sitio de baja afinidad (Loo & Clarke, 2005). Además, esta bomba de eflujo está glicosilada

en tres sitios (N91, N94 y N99) y se estima que desempeñan un papel en la orientación de la proteína en la superficie celular (Ambudkar et al., 2003).

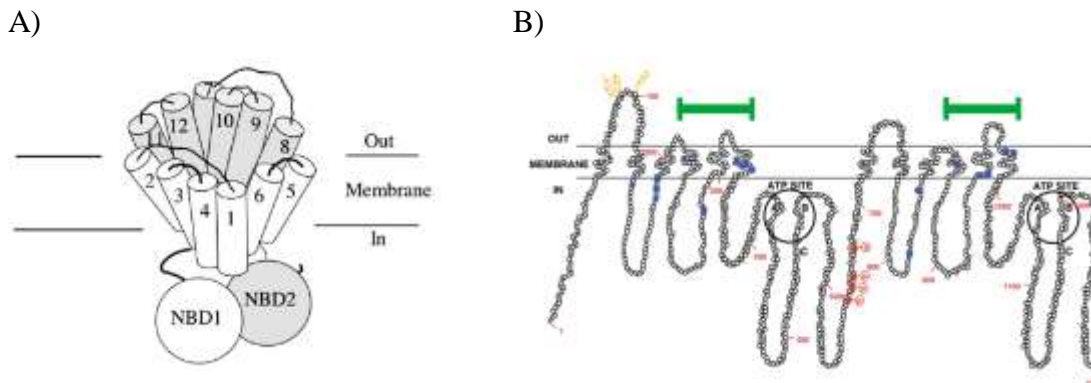


Figura 5. Estructura de la proteína relacionada a resistencia a drogas (ABCB1). A) Modelo de organización P-gp en la membrana plasmática que forma una cavidad de unión al sustrato en forma de embudo. B) Modelo 2-D hipotético de la P-gp humana, basado en el análisis de hidropatía de la secuencia de aminoácidos y sus dominios funcionales. Tomado de (Ambudkar et al., 2003; Loo & Clarke, 2005).

El transportador ABCB1 parece interactuar con los sustratos a través de interacciones Van der Waals y enlaces hidrofóbicos, aunque es incierto si la eliminación de los compuestos se produce en la fase acuosa externa (modelo de aspiración) o si de lo contrario se trasladaría de la capa lipídica interna a la externa (modelo de *flippasa*) (Ambudkar et al., 2006; Loo & Clarke, 2005). Probablemente, los dos modelos podrían coexistir según el tamaño y la hidrofobicidad de los sustratos (K. Da Costa, 2017). Es por ello, que una amplia gama de fármacos antitumorales incluyendo las antraciclinas (daunorrubicina), alcaloides de la vinca (vincristina), podofilotoxinas (etopósido) y taxanos son extruidos por la P-gp ocasionando una disminución significativa en la concentración intracelular en las células tumorales (Abdallah et al., 2015). Adicionalmente, a partir del descubrimiento de ABCB1, se inició la búsqueda de sustancias que pudieran ser utilizadas en la clínica, a través de un proceso de quimiosensibilización basado en la coadministración de un inhibidor de la proteína con un fármaco antineoplásico. Esto con el objetivo de mejorar la acumulación intracelular del agente quimioterapéutico mediante la alteración del transportador y con ello aumentar la

efectividad del tratamiento contra el cáncer. Las sustancias que muestran este perfil de inversión se conocen como agentes moduladores de la resistencia.

Los inhibidores de la ABCB1 se clasifican en cuatro generaciones según su potencia, selectividad y capacidad de interacción fármaco-fármaco. En la primera generación se incluyen bloqueadores de los canales de calcio (ej, verapamilo); inmunosupresores (ej, ciclosporina A); antihipertensivos (ej, reserpina), antiarrítmicos (ej, quinidina); y antiestrógenos (ej, tamoxifeno y toremifeno) (Amin, 2013). Muchos de estos fármacos son en sí mismos, sustratos de la P-gp y, por lo tanto, actúan compitiendo por la salida con otros sustratos de la P-gp (inhibición competitiva) (K. Da Costa, 2017). Sin embargo, las principales limitaciones para el uso clínico de estos inhibidores se relacionan con efectos inmunosupresores y cardiovasculares no deseados (Varma et al., 2003). Por tanto, se desarrollaron inhibidores de segunda y tercera generación, que modulan más específicamente la ABCB1, para mejorar el perfil de toxicidad de los inhibidores de primera generación. Estos son análogos de los compuestos de primera generación que fueron sometidos a modificaciones estructurales con el fin de reducir su actividad terapéutica principal y aumentar la eficacia y potencia. Entre ellos se encuentran los análogos no inmunosupresores de ciclosporina A, valsopodar (PSC-833); enantiómero R de verapamilo, dexverapamilo; y otros compuestos como biricodar (VX-710), timcodar (VX-853) y dofequidar (MS-209) (Fox & Bates, 2007; Palmeira et al., 2012). Finalmente, la cuarta generación se enfoca en inhibidores aislados de productos naturales y sus derivados, tensoactivos y lípidos, peptidomiméticos y agentes que combinan la inhibición del transporte con otra actividad biológica beneficiosa (Palmeira et al., 2012).

El interés hacia los glicolípidos se debe principalmente a su actividad de reversión de MDR. El estudio de este tipo de glicoconjugados como una nueva alternativa de modulación del transportador ABCB1 es reciente, y atribuye su eficiencia a sus complejas estructuras. Hasta la fecha, se han aislado glicolípidos de la familia Convolvulaceae, específicamente del género *Ipomoea*, tales como albinoside III, VII, VIII, IX y XI (Castañeda-Gómez et al., 2017; Cruz-Morales et al., 2012, 2016), jalapinosido (Bautista et al., 2015) y murocoidina V (Figueroa-González et al., 2012) que disminuyen significativamente la expresión de la P-gp en

carcinoma de mama resistente a vinblastina con factores de reversión dos mil veces mayor que el control positivo.

Proteína ABCC1

La proteína asociada a la resistencia ABCC1 o comúnmente llamada MRP1, fue identificada en 1992 en líneas celulares de pulmón resistentes a antraciclinas y es la única proteína relacionada que ha sido ampliamente aceptada por su rol en la resistencia tumoral a múltiples fármacos en oncología clínica (S. P. Cole et al., 1992; S. P. C. Cole, 2014a). La MRP1 juega un rol relevante en la eficacia y toxicidad de los medicamentos utilizados para tratar enfermedades no malignas y transporte de varios antibióticos, opiáceos, agentes antivirales, citalopram y estatinas (S. P. C. Cole, 2014a). Adicionalmente, participa en la fisiopatología de enfermedades inflamatorias (Yoshioka et al., 2009) y otras enfermedades inmunológicas, enfermedad cardiovascular (Becher et al., 2011) y ciertos trastornos neurológicos (Krohn et al., 2011), así como en la degeneración macular relacionada con la edad (Sreekumar et al., 2012), así como en la progresión tumoral. Los xenobióticos expulsados por ABCB1 son compuestos aniónicos, hidrofílicos conjugados y metabolitos de ácidos orgánicos de origen natural. Como ejemplos de éstos últimos se incluyen, el cisteinil (LTC_4) y el estrógeno conjugado ($E_2 17\beta G$), así como el glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG, del inglés, *Glutathione* y *Glutathione Disulfide*) (S. P. C. Cole, 2014a; S. P. C. Cole & Deeley, 2006). El fenotipo de resistencia provocada por la sobreexpresión de la MRP1 se da hacia varios agentes neoplásicos aniónicos como el metotrexato y también frente a quimioterapéuticos catiónicos como la vincristina y la daunorrubicina en presencia de glutatión (Loe et al., 1996; Renes et al., 1999). Así mismo, son resistentes a la doxorrubicina, la epirubicina, el etopósido, la actinomicina D, la colchicina y la vinblastina (Yang et al., 2010).

La ABCC1, es una glicofosfoproteína de membrana integral con una masa molecular aparente de 190 kDa, compuesta de 1531 aminoácido (S. P. C. Cole, 2014a). La MRP1 tiene una estructura de cinco dominios, con dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, del inglés, *Nucleotide-binding Domain*) y 17 TMD de los cuales tres atraviesan la membrana, estos son denominados MSD0, MSD1 y MSD2 (Figura 6). Esta estructura difiere de la típica proteína ABC que tiene seis TMD en cada una de las dos regiones homólogas (Zhang et al., 2015). La

función exacta del NH₂-terminal en la MSD0, que está formada por 5 hélices alfa, aún es incierta y bien puede depender del tipo de célula en las que se expresa (Bakos et al., 2000; Westlake et al., 2005). La ausencia de la MSD0 no conduce a la pérdida de la actividad catalítica del transportador nativo, pero es necesaria para el funcionamiento del transportador con mutaciones (Grigoreva et al., 2022). Esta bomba dependiente de ATP transporta los sustratos a través del poro en la membrana formado por los 12 TMD que comprenden la MSD1 y la MSD2. Sin embargo, la influencia en la translocación de solutos a través de MSD1 y MSD2, es poco conocida (S. P. C. Cole, 2014a; Rosenberg et al., 2010).

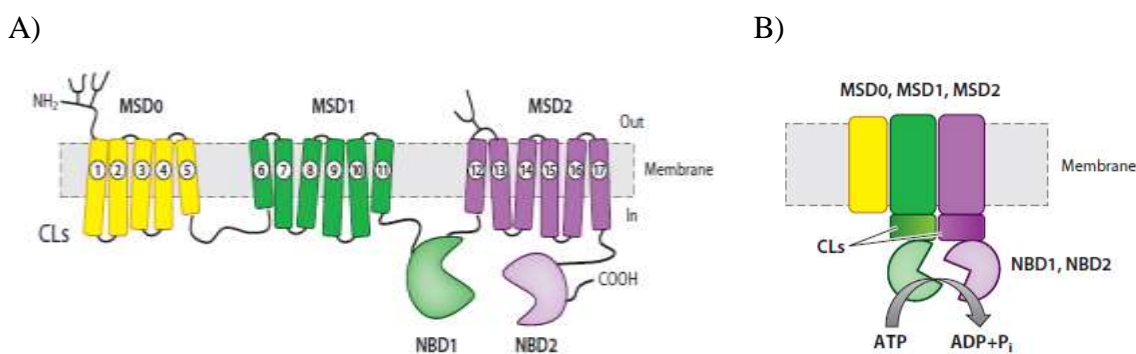


Figura 6. Estructura de la proteína relacionada a resistencia a múltiples drogas (ABCC1). Estructura esquemática de MRP1; A) 2D y B) 3D. Una estructura de dos miembros que comprenden dos dominios de membrana, dos dominios de ligación de nucleótido (NBD) y los bucles citoplasmáticos de ligación entre estos dominios. Tomado de (S. P. C. Cole, 2014a).

El transportador ABCC1 se expresa en casi todos los tejidos humanos especialmente en los pulmones, el bazo, los testículos, los riñones, la placenta, la tiroides, la vejiga y las glándulas suprarrenales, y raramente en algunas células del sistema circulatorio, como los eosinófilos, las células T y los eritrocitos (Chang, 2007). La MRP1 transporta el GSH antioxidante endógeno con baja afinidad y el GSSG oxidado con mayor afinidad (Chang, 2007). Sin embargo, parece que algunos fármacos anticancerosos a los que la MRP1 confiere resistencia son expulsados de las células por la ABCC1, a través de un mecanismo de co-transporte con GSH reducido (Loe et al., 1996). También se ha encontrado que la proteína ABCC1 purificada reconstituida en vesículas de fosfolípidos es capaz de transportar aniones orgánicos y transportar vincristina o ácidos orgánicos dependiente de GSH, lo que sugiere

que no requiere componentes celulares adicionales para su actividad basal (S. P. C. Cole, 2014a; Ishikawa, 1992; Mao et al., 1999).

Los moduladores no específicos como el probenecid y la indometacina, son capaces de inhibir a los miembros del MRP involucrados en la salida de sustancias, ABCB1 y otros transportadores que no pertenecen a la superfamilia ABC. Un potente inhibidor de ABCC1 es el conocido fármaco MK-571, sin embargo, no está exento de inhibir otros miembros de ABCC como ABCC2, ABCC4, ABCC5 y ABCC7, sin efecto sobre ABCB1 (S. P. C. Cole, 2014b). Otros inhibidores de MRP1 reportados en la literatura son el probenecid, sulfipirazona, indometacina, verapamilo, quercetina, genisteína, ciclosporina A, PAK-104P, análogos de esteroides, ONO-1078, sulfonilurea, glibenclamida, delavirdina, efavirenz, nevirapina, abacavir, emtricitabina, lamivudina, tenofovir, biocanina A, kaempferol, esquisandrina B (K. Da Costa, 2017).

Proteína ABCG2

El transportador ABCG2 es el segundo miembro de la subfamilia G de la superfamilia de casete de unión a ATP (ABC), también conocido como proteína resistente al cáncer de mama (BCRP). Se identificó a fines de la década de 1990, en líneas celulares de cáncer que eran resistentes a diversos fármacos citotóxicos pero que no mostraban expresión de las conocidas bombas de resistencia a múltiples fármacos, es decir, los transportadores ABCB1 y ABCC1 (Doyle & Ross, 2003). La BCRP se expresa ampliamente en células y tejidos normales, incluidas las células endoteliales capilares, las células madre hematopoyéticas, la barrera materno-fetal de la placenta y la barrera hematoencefálica (Maliepaard et al., 2001; S. Zhou et al., 2001). Además, parece desempeñar un rol protector contra los xenobióticos y sus metabolitos (Noguchi et al., 2009). Sobre la estructura de ABCG2, es poco lo que se conoce, sin embargo, esta proteína de masa molecular de 72 kDa y 655 aminoácidos, consta de seis TMD y se diferencia del resto de la familia de transportadores ABC en que tienen el casete de unión a ATP o NBD en el lado N-terminal de la región del dominio transmembrana (Kerr et al., 2011; Wakabayashi et al., 2006). La ABCG2 presenta una estructura de la mitad del tamaño y en configuración inversa a la mayoría de las otras proteínas ABC que

comprenden dos NBD y dos TMD. Por tanto, es un medio transportador y se cree que se homodimeriza, o posiblemente oligomeriza con otras proteínas ABCG2 para poder funcionar (Robey et al., 2009) (Figura 7). Lo anterior, contrasta con otros miembros de la subfamilia G de transportadores como ABCG5 y ABCG8, que se heterodimerizan, para formar un transportador funcional (Graf et al., 2002; Ozvegy et al., 2001).

La BCRP parece transportar xenobióticos y metabolitos endógenos de esteroides que están sulfatados o glucuronizado (Grigoreva et al., 2022). El eflujo de sustratos característico de ABCB1 como cationes orgánicos y moléculas neutras, son exportados por ABCG2, pero también incluyen ácidos orgánicos y conjugados de fármacos que no son buenos sustratos para ABCB1 (Keogh, 2012). Los agentes quimioterapéuticos como doxorubicina, metotrexato, mitoxantrona y topotecan se han identificado como sustratos activos de ABCG2 (Stacy et al., 2013).

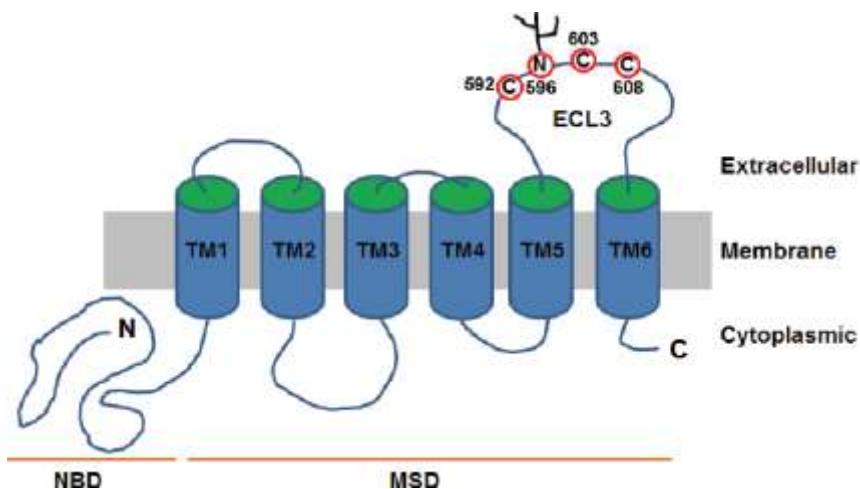


Figura 7. Modelo de topología de membrana de ABCG2. Se indican el dominio de unión a nucleótidos (NBD), el dominio transmembrana (MSD), los segmentos transmembrana (TM) y el bucle extracelular 3 (ECL3). También se muestran los residuos de cisteína y los sitios de glicosilación ligados a N en ECL3.

Tomado de (Mo & Zhang, 2012).

2.2 Algas marinas

Las algas marinas son un grupo muy variado de organismos fotosintéticos el cual incluye las microalgas y macroalga (Ruiz et al., 2016), esta última a su vez, se divide en tres grandes grupos, algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas pardas (Phaeophyta), basado en sus pigmentos y formas de almacenar los productos derivados de la fotosíntesis (Motta. L & S, 2020). Actualmente se estima que existen alrededor de 30000 especies de algas en todo el mundo, aunque se cree que este número podría ser mucho mayor debido a la gran cantidad de especies aún por descubrir en los océanos (Guiry, 2012).

Las algas marinas son importantes debido a que son una fuente nutritiva para la alimentación humana y animal, se utilizan en la producción de diversos productos, contribuyen al equilibrio ecológico y son una fuente importante de absorción de dióxido de carbono. Además, su cultivo y conservación son estrategias prometedoras para la sostenibilidad ambiental y alimentaria, y pueden ayudar a mitigar los efectos del cambio climático (Food and Agriculture Organization, 2020; Holdt & Kraan, 2011; Milledge & Harvey, 2016). En los últimos 50 años se ha estimado que más de 3000 compuestos naturales se han descubierto a partir de estos organismos (Guiry, 2012), entre ellos fitohormonas, polisacáridos, compuestos antioxidantes y reguladores de crecimientos, clorofilas y carotenos, xantofilas, minerales, manitol vitaminas, aminoácidos y proteínas, ácidos algínicos, fúlvicos y otros ácidos orgánicos (Diego A, 2021).

2.2.1 Género *Sargassum*

El género *Sargassum* es un género de macroalgas pardas que pertenece a la familia Sargassaceae. Se distribuyen ampliamente en aguas cálidas y tropicales de todo el mundo (Fidai et al., 2020; Mattio et al., 2015) y se encuentran a menudo flotando en la superficie del océano, formando extensas masas conocidas como sargazo (Figura 9). Este género es muy diverso y se estima que contiene alrededor de 300 especies diferentes, de las cuales la mayoría de las especies son marinas y se encuentran en aguas poco profundas (Fidai et al., 2020).

Las especies de *Sargassum* son importantes para los ecosistemas marinos, ya que proporcionan hábitat y alimento para una gran variedad de organismos. Además, el género

Sargassum también es una fuente importante de compuestos bioactivos con potencial uso en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Chen et al., 2021; C.-Y. Huang et al., 2022; Tagliapietra & Clerici, 2023).

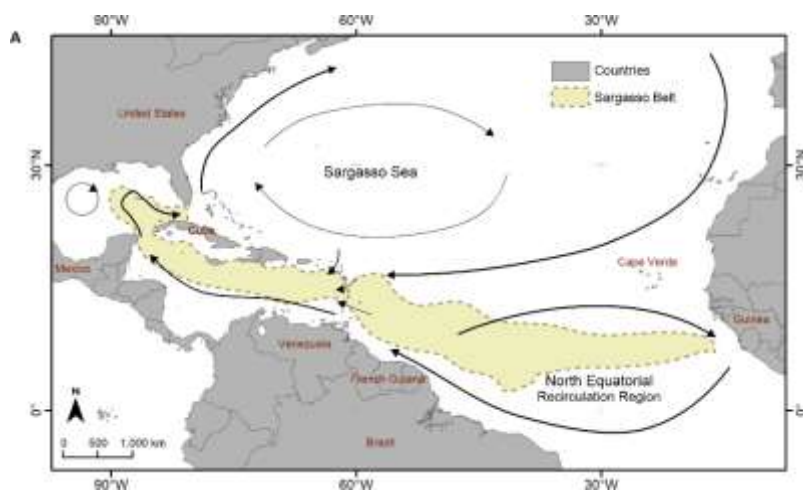


Figura 8. Representación esquemática de los principales patrones de corrientes oceánicas y áreas de acumulación de sargazo en el Océano Atlántico. Tomado de (Uribe-Martínez et al., 2022)

Además de su valor ecológico, las especies de *Sargassum* también son importantes presentan una variedad de compuestos biológicamente activo. Algunos de estos compuestos son de tipo terpenoides, flavonoides, esteroides, polisacáridos sulfatados, polifenoles, ácidos sargaquinoicos, sargacromenol y feofitina, aislados de diferentes especies de sargazo. Estos metabolitos tienen una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo actividad analgésica, antiinflamatoria, antioxidante, neuroprotectora, antimicrobiana, antitumoral, fibrinolítica, inmunomoduladora, anticoagulante, hepatoprotectora y antiviral, entre otras (Rushdi et al., 2020; Yende et al., 2014).

En Colombia, el género *Sargassum* está ampliamente distribuido a lo largo de la costa del Caribe y del Pacífico, incluyendo Santa Marta, Cartagena y en el Parque Nacional Natural Tayrona (bahía Concha y Gayraca). Actualmente, se han reportado 12 especies diferentes para este género, incluyendo la especie *Sargassum filipendula*, alga de aspecto piramidal que alcanza 1 metro de altura de coloración verde oliva-café caracterizada por presentar ramas

laterales primarias cilíndricas y lisas; filoides simples y vesículas abundantes entre 80 – 632 presentes a lo largo de todo el talo (Camacho et al., 2015). En la costa caribeña, las especies de *Sargassum* más comunes son *S. polycystum* y *S. natans*, mientras que en la costa del Pacífico predominan *S. pacificum* y *S. hystrix* (Rodríguez-Ruiz, & Gil-Kodaka, 2016).

Aunque *Sargassum* no es nativo de Colombia, se ha observado un aumento en la presencia de esta macroalga en las costas del país en los últimos años, lo que ha afectado negativamente las actividades turísticas y económicas, así como los ecosistemas costeros y marinos (Gavio et al., 2015; Gavio & Santos, 2018). Por esta razón, en Colombia se están llevando a cabo investigaciones para entender mejor las floraciones de *Sargassum* en las costas del país y para desarrollar estrategias efectivas de manejo y control de la macroalga (Cortés et al., 2014). Adicionalmente, en la exploración de aplicaciones potenciales para la biomasa de sargazo en Colombia, se han identificado en los últimos años diversos compuestos bioactivos que poseen propiedades medicinales y nutricionales (Arias-Echeverri et al., 2022). Entre estas propiedades se incluyen efectos antioxidantes, antitumorales y de fertilización (Bula-Meyer, 2004; Gupta et al., 2020; Luna-Pérez et al., 2023).

2.2.2 Glicolípidos de *Sargassum*

Los glicolípidos son un tipo de lípidos que se caracterizan por tener un carbohidrato unido a un lípido mediante un enlace glucosídico. En el género *Sargassum*, se han identificado varios tipos de glicolípidos, siendo los más comunes los monogalactosildiacilglicéridos (MGDG), digalactosildiacilglicéridos (DGDG) y sulfoquinovosyldiacilglicéridos (SQDG) (Logvinov et al., 2015). Estos glicolípidos tienen una presencia significativa en el género *Sargassum*, que es representativo de las algas pardas, y se ha reportado que tienen un alto contenido de estos fitoconstituyentes, aproximadamente entre el 19% y el 33% (Dembitsky et al., 1990) (Figura 9). Además, los glicolípidos son los principales componentes lipídicos de la membrana fotosintética en las algas (Murata & Siegenthaler, 2006), lo que sugiere que podrían desempeñar un papel importante en la fotosíntesis y en la adaptación de las algas a su entorno.

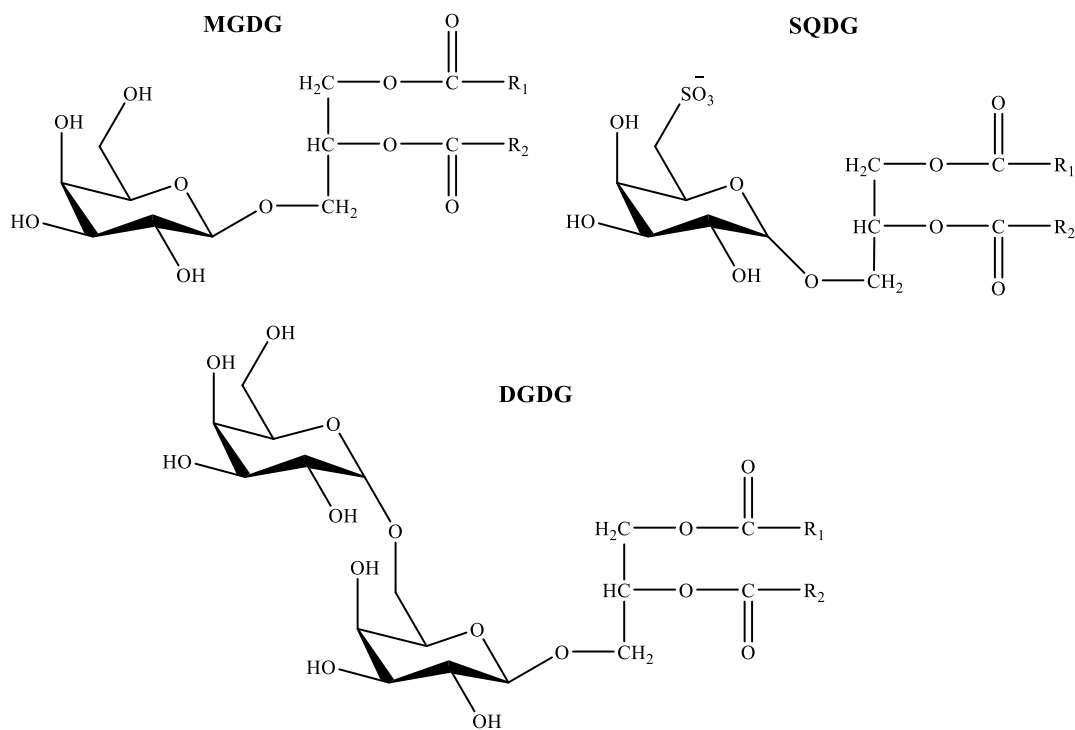


Figura 9. Glicolípidos de algas del género *Sargassum*.

Una revisión bibliográfica realizada sobre la caracterización y actividad biológica de los glicolípidos desde el año 2000 hasta el 2022 mostró que solamente se encontraron 17 artículos relevantes. De estos, únicamente cuatro estudios evaluaron la actividad anticancerígena de glicolípidos aislados (Alzarea et al., 2021; Hossain et al., 2005), extracto enriquecidos en sulfoglicolípidos (Tsai & Sun Pan, 2012), así como análisis in silico (Abdelrheem et al., 2021). Cinco estudios evaluaron la composición de ácidos grasos del extracto de cloroformo/metanol (Santos et al., 2019) y lípidos polares (Sanina et al., 2004, 2008) y sulfolípidos (Tsai & Sun Pan, 2012) además de la actividad para aumentar la inmunogenicidad de las porinas (Sanina et al., 2012) y la actividad antirradicalaria (Fomenko et al., 2019). Ocho estudios describen la elucidación estructural de glicolípidos aislados del género *Sargassum* (Z. Cui et al., 2001; Y. H. Kim et al., 2007; Logvinov et al., 2015; Rahelivao et al., 2015) (Figura 10), incluyendo la bioprospección de compuestos como actividad antiincrustante (Plouguerné et al., 2020), inhibidores de la acumulación de TG y ácidos grasos libres (Ma et al., 2014), actividad anti-HVS-1 y HVS-2 y actividad antiincrustante (Plouguerné et al., 2010, 2013). En la Tabla 1, se enlistan los estudios

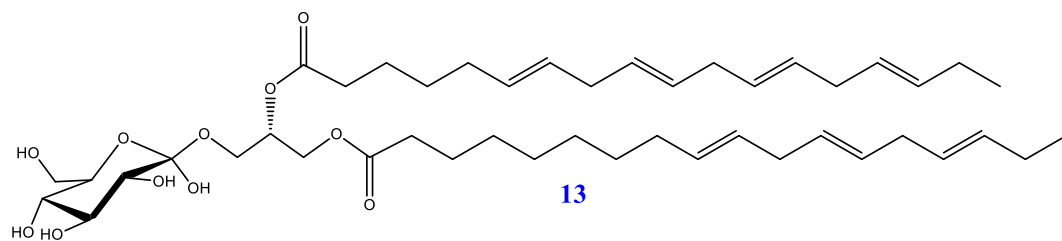
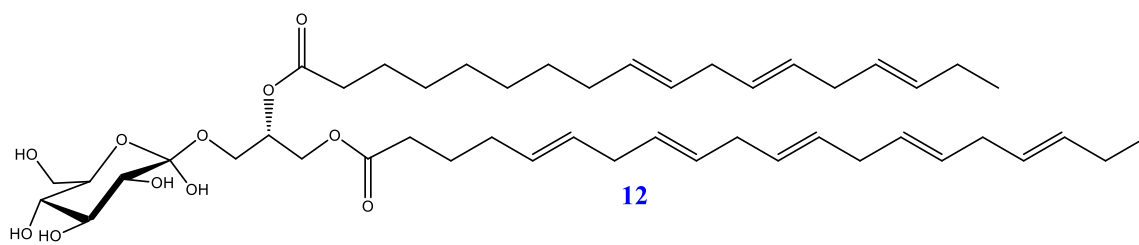
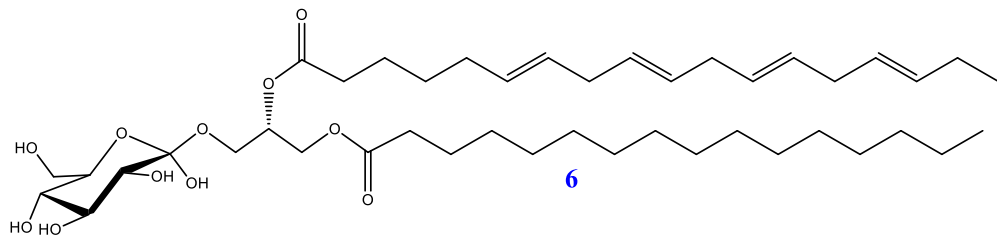
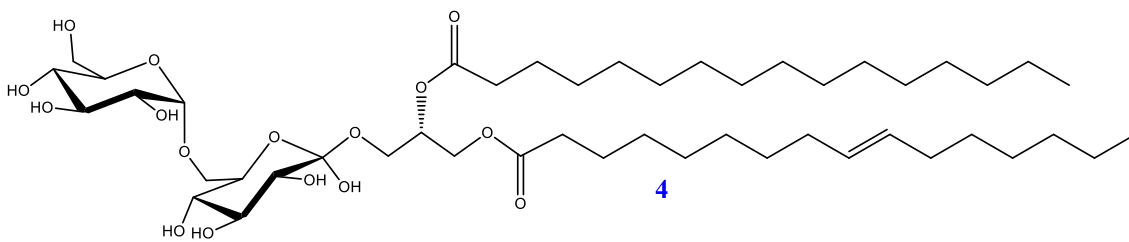
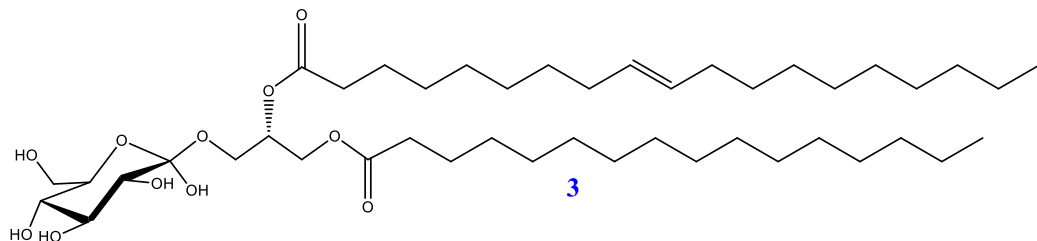
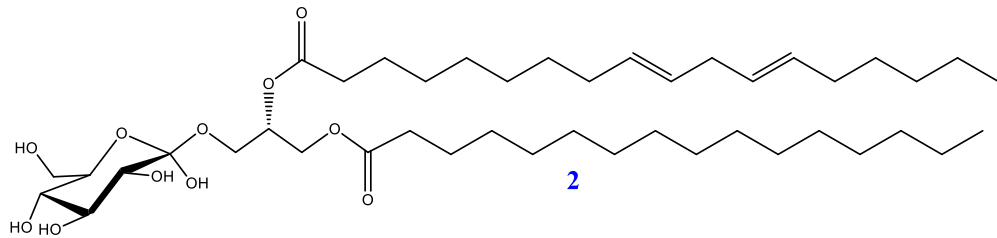
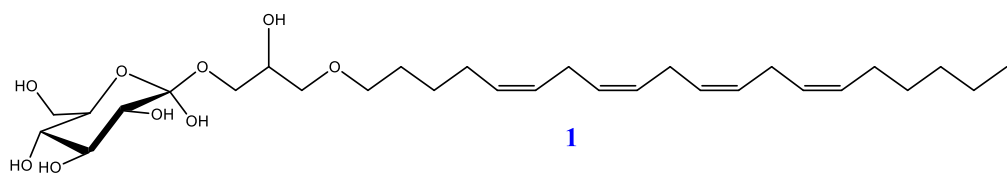
mencionado anteriormente, incluyendo las especies de *Sargassum*, extracto o tipo de glicolípido, actividad biológica y referencia bibliográfica.

Sin embargo, hasta la fecha se han llevado a cabo pocos estudios que exploren el potencial de los glicolípidos presentes en el género *Sargassum*. Con el objetivo de aprovechar las posibles aplicaciones de la biomasa de algas en Colombia, se plantea una propuesta para evaluar los glicolípidos del alga parda *Sargassum filipendula* como posibles inhibidores o moduladores de los transportadores ABC involucrados en el fenotipo de la resistencia múltiple a fármacos (MDR) en cáncer.

Tabla 1. Glicolípidos encontrados en el género *Sargassum* y sus actividades farmacológicas.

Especie	Extracto o compuesto	Actividad biológica	Referencia
<i>S. cinereum</i>	MGMG (1)	Anticáncer	(Alzarea et al., 2021)
<i>S. platycarpum</i>	MGDG (2)	Anticáncer	(Abdelrheem et al., 2021)
<i>S. vulgare</i>	MGDG (3), DGDG (4) y SQDG (5)	Antiincrustante	(Plouguerné et al., 2020)
<i>S. pallidum</i>	Extracto etanólico y extracto cloroformo/metanol	Atirradicalaria	(Fomenko et al., 2019)
<i>S. vulgare</i>	Extracto cloroformo/metanol	-	(Santos et al., 2019)
<i>S. pallidum</i>	MGDGs, DGDGs y SQDGs	-	(Logvinov et al., 2015)
<i>S. incisifolium</i>	MGDG (6)	-	(Rahelivao et al., 2015)
<i>S. horneri</i>	MGDGs	Inhibición de la acumulación de TG y ácidos grasos libres	(Ma et al., 2014)
<i>S. vulgare</i>	SQDGs (5, 7 - 11)	anti-HSV-1 y HSV-2	(Plouguerné et al., 2013)

<i>S. crassifolium</i> , <i>S. cristaefolium</i>	SQDG	Anticáncer	(Tsai & Sun Pan, 2012)
<i>S. pallidum</i>	Lípidos polares	Regulación inmunológica	(Sanina et al., 2012)
<i>S. muticum</i>	Extracto clorofórmico	Antiincrustante	(Plouguerné et al., 2010)
<i>S. pallidum</i> , <i>S.</i> <i>thunbergii</i>	Lípidos polares	-	(Sanina et al., 2008)
<i>S. thunbergii</i>	MGDG (12 y 13)	-	(Y. H. Kim et al., 2007)
<i>S. horneri</i>	DGDG y SQDG	Anticáncer	(Hossain et al., 2005)
<i>S. pallidum</i>	Lípidos polares	-	(Sanina et al., 2004)
<i>S. hemiphyllum</i>	SQDGs	-	(Z. Cui et al., 2001)



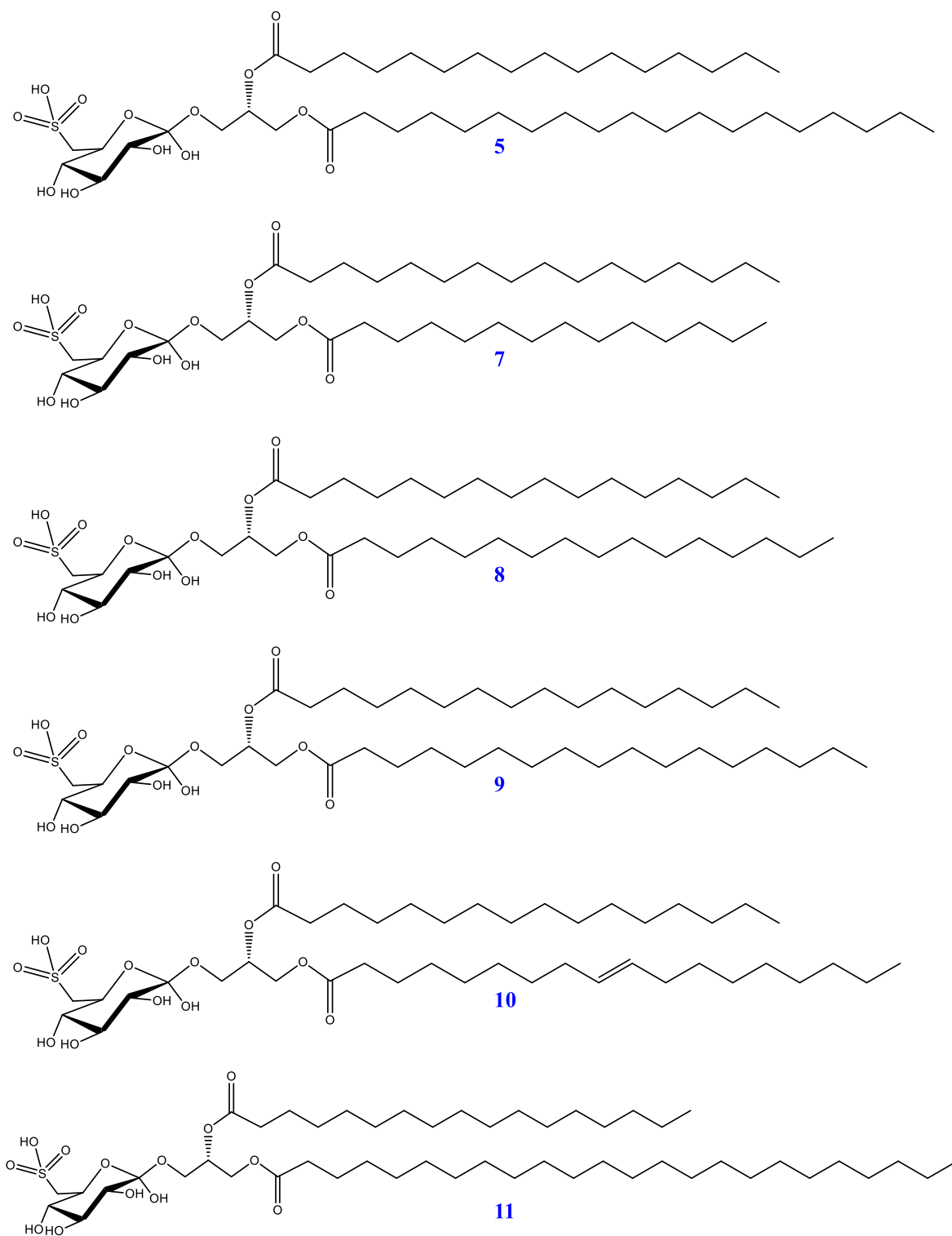


Figura 10. Estructura de glicolípidos presentes en *Sargassum* (la enumeración de cada estructura se referencia en la Tabla 1)

2.3 Técnica de extracción de glicolípidos

Los glicolípidos son compuestos biológicos esenciales que se encuentran en la membrana celular de una amplia variedad de organismos, incluyendo las algas pardas. La extracción de glicolípidos de estas algas ha ganado interés en los últimos años debido a sus aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y energética (Hakim & Patel, 2020; Kumari et al., 2010). Existen varios métodos de extracción de glicolípidos en las algas, que se pueden clasificar en dos categorías principales: métodos convencionales y no convencionales (Figura 11).

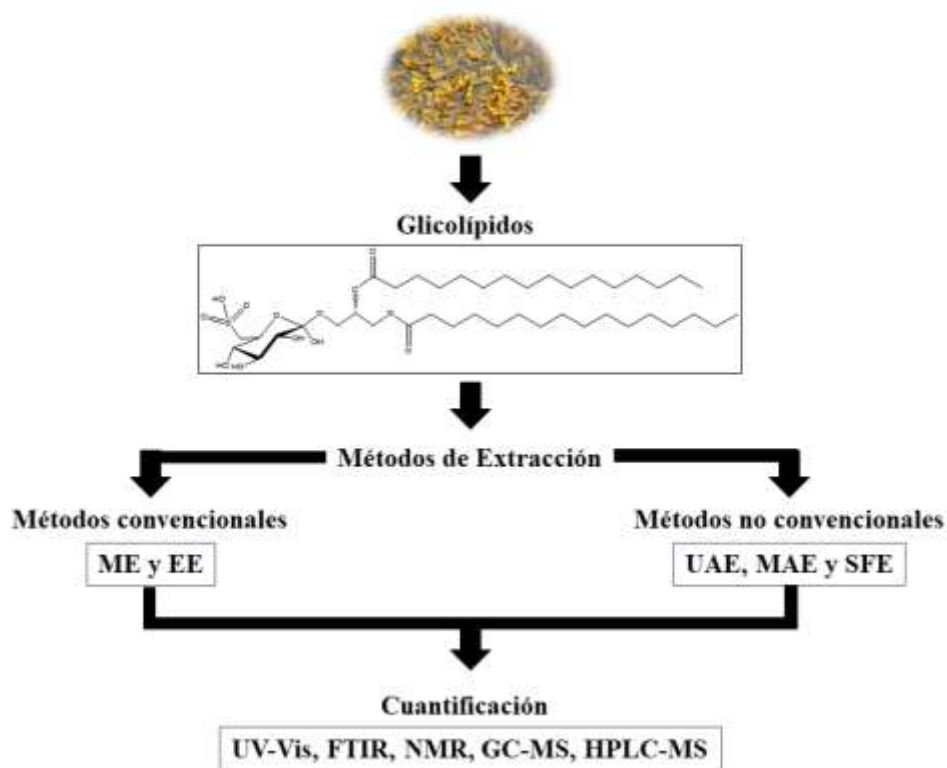


Figura 11. Descripción general de los métodos de extracción y cuantificación de glicolípidos en algas pardas. Entre los métodos convencionales se encuentra la extracción por maceración (ME), que implica el uso de disolventes como cloroformo, metanol y éter de petróleo para extraer los glicolípidos mediante la ruptura de las membranas celulares (Kalsum et al., 2019; Sanina et al., 2004; Terme et al., 2017). Este método ha sido ampliamente utilizado debido a su simplicidad y eficiencia, y ha sido empleado en todos los estudios previos sobre la extracción de glicolípidos de *Sargassum* reportados en la Tabla 1. Otro método convencional es la

extracción enzimática (EE), que utiliza enzimas específicas para degradar las membranas celulares y liberar los glicolípidos. La EE ha sido implementada con éxito para la extracción de lípidos en microalgas (Blanco-Llamero et al., 2021; Sierra et al., 2017; J. Zhou et al., 2022).

Los métodos no convencionales incluyen la extracción asistida por ultrasonido (UAE), que utiliza ondas ultrasónicas para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares y mejorar la extracción de glicolípidos (Blanco-Llamero et al., 2021; Carreira-Casais et al., 2021; Y.-H. Kim et al., 2013). También está la extracción asistida por microondas (MAE), en la que se emplean microondas para calentar rápidamente el solvente y las células de algas, lo que aumenta la eficiencia de extracción de glicolípidos (García-Vaquero et al., 2021; Zghaibi et al., 2019). Otra técnica no convencional es la extracción con fluidos supercríticos (SFE), que utiliza dióxido de carbono supercrítico como solvente para extraer glicolípidos a alta presión y temperatura (Conde et al., 2015; Patel et al., 2020; Santana et al., 2012; Terme et al., 2017). No obstante, este método de extracción se ha aplicado con mayor frecuencia en la extracción de lípidos de microalgas, aunque también se ha utilizado en la extracción de otros fitoconstituyentes de algas.

Cabe destacar que la selección del método de extracción adecuado dependerá de diversos factores, como la especie de alga, la naturaleza y cantidad de los glicolípidos presentes, así como la pureza y rendimiento requeridos en la aplicación final.

Capítulo 3

Hipótesis

Los glicolípidos del alga parda *Sargassum filipendula* tienen el potencial como inhibidores naturales de los transportadores ABC, revirtiendo el fenotipo de MDR en cáncer.

Capítulo 4

Objetivos

General

Evaluar la capacidad de los glicolípidos de *Sargassum filipendula* para revertir el fenotipo de MDR, asociado a la inhibición de los transportadores ABC en un modelo celular de cáncer de Lucena-1.

Específicos

- Aislar y caracterizar los glicolípidos mayoritarios de la especie *Sargassum filipendula*.
- Determinar la capacidad de inhibición de los glicolípidos de la macroalga *Sargassum filipendula* frente a los transportadores ABC (ABCB1, ABCC1 y ABCG2), en células de cáncer de Lucena-1.
- Estimar la viabilidad celular de las fracciones de glicolípidos de *Sargassum filipendula* en células de Lucena-1.
- Determinar la actividad de reversión del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos mediada por los transportadores ABC, en células de cáncer de Lucena-1.

Materiales

5.1 Material Biológico

La colecta de la macroalga parda se realizó en junio de 2019 en las playas de Taganga (Santa Marta) Magdalena-Colombia, coordenadas geográficas 11°16'15.62''N; 74°12'18.01''O. La identificación de la especie marina se llevó a cabo por el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andrés (INVEMAR) mediante comparación de los caracteres morfológicos descritos para *Sargassum filipendula* (Camacho et al., 2015). La colecta se realizó bajo el permiso expedido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), resolución 1461 de diciembre 3 de 2014 y el contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados, (Otro sí No. 5, contrato número 126 de 13 de mayo de 2016, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible). El material biológico colectado se lavó con agua de grifo, seguido con agua destilada y se secó por 5 días a temperatura ambiente. Para mejorar la eficiencia del secado, la muestra se sometió a 40 °C en estufa protegida de la luz artificial durante 48 h. Finalmente, el alga se molió hasta obtener un polvo fino homogéneo utilizando un molino eléctrico (IKA A11 basic S1).

La línea celular eritroleucémica humana K562, provienen de un paciente con leucemia mieloide crónica (CLM) en crisis blástica, suministrada por la organización American Type Culture Collection (ATCC); y su equivalente, Lucena-1, se mantuvieron en medio RPMI-1640, pH 7.4, complementado con 50 µg/mL y 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés, *Fetal Bovine Serum*). Las células Lucena-1 se desarrollaron en el *Laboratory of Glycobiology, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho*, Federal University of Rio de Janeiro, Brasil, mediante la exposición continua de células K562 a concentraciones crecientes del fármaco citotóxico sulfato de vincristina (60 nM) según lo descrito por (Rumjanek et al., 2001) y (Daflon-Yunes et al., 2013). Para realizar los experimentos de inhibición de transporte de las proteínas ABC, viabilidad celular y reversión de la MDR, el fármaco se dejó de suministrar

al cultivo celular durante tres días. Las células se sembraron a una concentración de 2×10^4 células/mL y se resembraban cada tres o cuatro días, todos los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a 37 °C bajo un ambiente humidificado con CO₂ al 5%.

5.2 Materiales y reactivos químicos

Cloroformo (CHCl₃, Merck), metanol (MeOH, Merck), hexano (C₆H₁₄, Merck), acetona (Me₂CO, Merck), cloruro de potasio (KCl, Merck), amoníaco (NH₄OH, Merck), ácido sulfúrico (H₂SO₄, Merck), metanol deuterado (CD₃OD, Merck), orcinol, condroitín sulfato (Sigma-Aldrich), 1,9 azul de dimetilmetileno (DMB, Sigma-Aldrich), galactosa (Merck), TLC silica gel 60 F254 60 (Merck), silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck), fenol (Sigma-Aldrich), gentamicina, (Sigma-Aldrich), suero fetal bovino (FBS, Life Technologies do Brasil), sulfato de vincristina (Sigma Chemical), azul de trypan (Sigma Chemical), yoduro de propidio (PI, Sigma Chemical), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma Chemical), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical), rodamina 123 (Rho 123, Sigma-Aldrich), diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA, Sigma-Aldrich), mitoxantrona (MTX, Sigma-Aldrich), verapamilo (VP, Sigma-Aldrich), ácido 5-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)etenil)fenil)-8-dimetilcarbamil-4,6- ditioctanoico (MK-571, Sigma-Aldrich), KO-143 (Sigma-Aldrich), paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich).

5.3 Equipos

Espectrofotómetro UV-Visible Evolution Thermo Scientific 60S, espectrofotómetro Shimadzu FTIR Affinity-1, espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker Avance III HD 600 MHz, cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, del inglés, High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu Nexera X2 acoplado a espectrómetro de masas Bruker Maxis Impact configurado con ionización por electroespray y un analizador de tiempo de vuelo cuadrupolo (ESI-Q-TOF), citómetro de flujo láser FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.), espectrofotómetro UV-Visible Beckman Coulter AD 340.

Metodología

6.1 Obtención del extracto

El alga parda *Sargassum filipendula* se extrajo a partir del método modificado de Folch (Folch et al., 1957). Inicialmente, el material orgánico fue sometido a un proceso de maceración exhaustiva a temperatura ambiente con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) por seis horas bajo agitación magnética. El extracto resultante se filtró, concentró al vacío en un evaporador rotatorio y se repartió con una solución de KCl al 0.74% para formar un sistema bifásico. La capa de cloroformo se separó y se concentró a sequedad (Figura 12).

6.2 Fraccionamiento de glicolípidos

Mediante cromatografía en columna se realizó el fraccionamiento del extracto crudo de *S. filipendula*. Se utilizó una columna de vidrio de 90 cm de largo por 6 cm de diámetro, empacada con gel sílice 60, de tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm con una relación 1:30. Se emplearon diferentes mezclas de disolventes de polaridad creciente hexano (C_6H_{14}), cloroformo (CHCl_3), acetona (Me_2CO), metanol (CH_3OH), así como mezclas proporcionales entre éstos para permitir la elusión de los componentes de la muestra a través de la columna (Figura 12). Los eluatos se recogieron en viales de 25 mL y posteriormente fueron concentrados mediante rotaevaporación a 40 °C.

Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina utilizando como fase estacionaria cromatoplasmas de gel sílice F_{254} y como fase móvil $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-NH}_4\text{OH}$ (40:10:1). Como agente cromógeno específico para glicolípidos se utilizó una solución de orcinol en ácido sulfúrico, y se calentó a 80 °C para la visualización de las placas. La formación de un color púrpura determinó la presencia presuntiva de glicolípidos en la muestra. Una vez reveladas las cromatoplasmas, las fracciones que presentaron el mismo tiempo de retención (R_f), fueron agrupadas (subfracción) y almacenadas en viales de 15 mL. Las fracciones positivas para glicolípidos fueron analizadas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

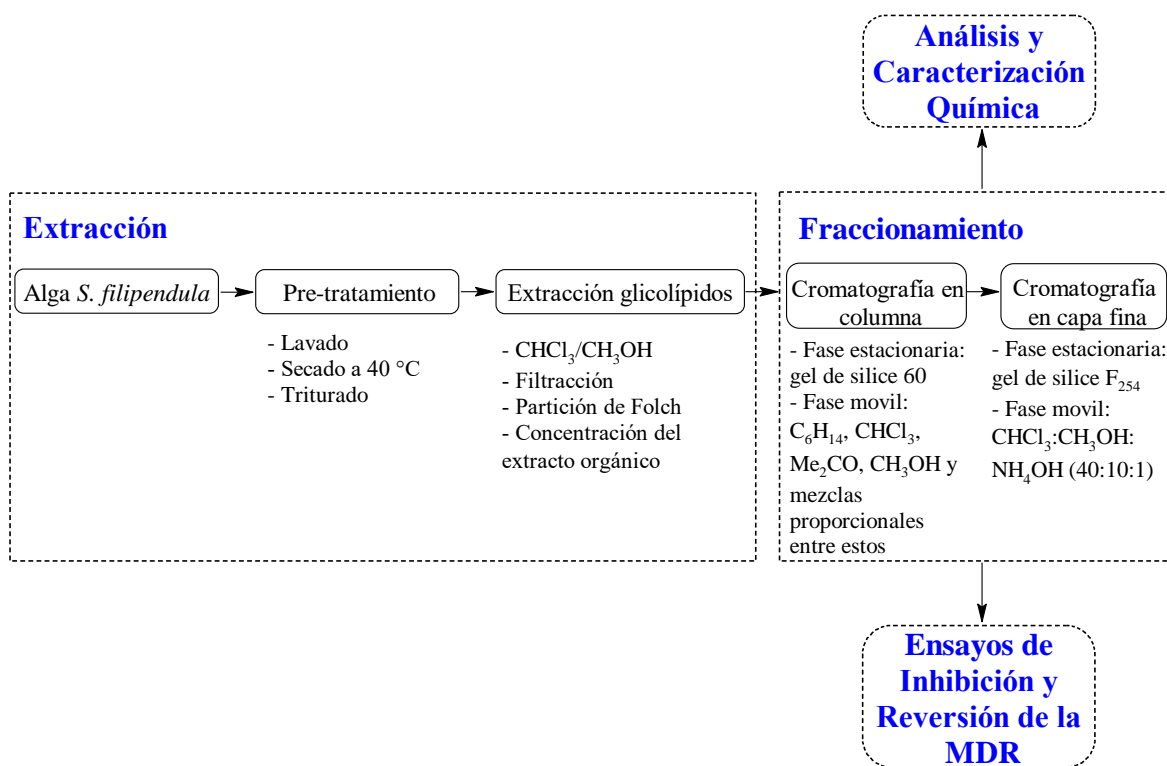


Figura 12. Proceso de obtención de extracto y fraccionamiento de glicolípidos en *S. filipendula*.

6.3 Análisis químico

6.3.1 Cuantificación de azúcares neutros mediante el método fenol – ácido sulfúrico

El contenido de azúcares neutros se determinó mediante el método modificado de Dubois (DuBois et al., 1956). Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de una hexosa (1mg/mL) con la cual se prepararon soluciones seriadas entre 6.25 – 87.5 µg/mL en un volumen final de 500 µL. Luego, 60 µL de las fracciones enriquecidas en glicolípidos y de la solución patrón se añadieron a un tubo de ensayo de vidrio y se completó a un volumen final de 400 µL en metanol y agua respectivamente. Luego, se mezclaron con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó por 15 segundos. Posteriormente, se añadieron 400 µL de fenol (5% v/v) y se agitó a 4000 rpm durante 15 s. La mezcla resultante se calentó a 90 °C por 5 min en baño maría y se enfrió a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra se midió a 490 nm, con un paso óptico de 1 cm, utilizando el espectrofotómetro UV-Visible

Evolution Thermo Scientific 60S, con Thermo Scientific VISIONlite (Figura 13). A partir de la curva de calibración se obtuvo la concentración de las muestras mediante la fórmula:

$$\% \text{ Azúcares neutros} = \frac{(A \text{ mtra} - 0.0515)}{0.0052} \times \frac{400}{V \times 10 \times W}$$

donde,

A mtra: Absorbancia de la muestra a 490 nm

V: Volumen en μL de muestra

W: Masa de la muestra para preparar un contenido cercano a 1 mg en 1 mL

6.3.2 Cuantificación de azúcares sulfonados

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de condroitín sulfato (1mg/mL) con la cual se prepararon soluciones seriadas entre 5 – 80 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen final de 500 μL . Luego, 100 μL de las fracciones enriquecidas en glicolípidos a 1mg/mL y de la solución patrón se completaron a un volumen final de 500 μL con metanol y agua respectivamente. Las muestras y el estándar se mezclaron con 4 ml de la solución de DMB (que contenía 11 mg de 1,9-DMB en 1 L de acetato de sodio 0.05 M, pH 4.75). La mezcla se agitó a 4000 rpm durante 15 s y se dejó en oscuridad durante 30 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 520 nm, con un paso óptico de 1 cm, utilizando el espectrofotómetro UV-Visible Evolution Thermo Scientific 60S, con Thermo Scientific VISIONlite (Figura 13). A partir de la curva de calibración se obtiene la concentración de las muestras mediante la fórmula:

$$\% \text{ Azúcares sulfonados} = \frac{(A \text{ mtra} - 0.0308)}{0.0059} \times \frac{500}{V \times 10 \times W}$$

donde,

A mtra: Absorbancia de la muestra a 520 nm

V: Volumen en μL de muestra

W: Masa de la muestra para preparar un contenido cercano a 1 mg en 1 mL

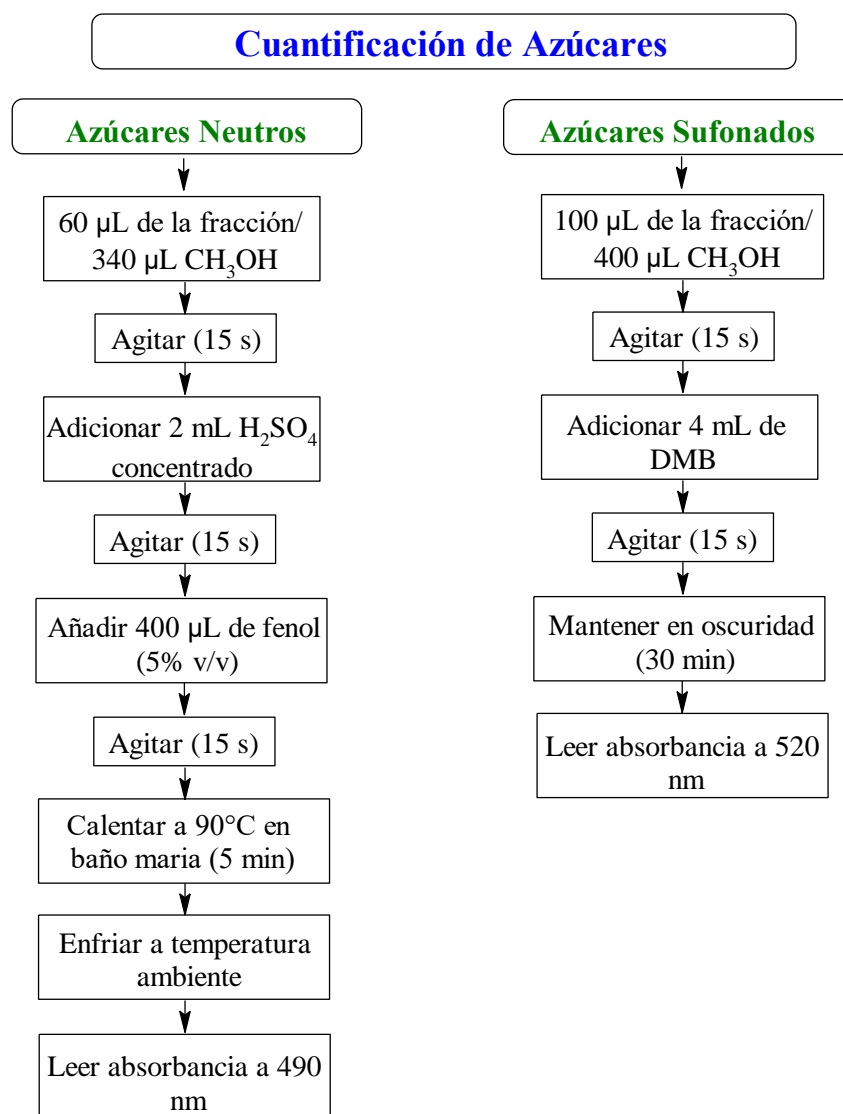


Figura 13. Cuantificación de azúcares neutros y sulfonados.

6.4 Caracterización química de los glicolípidos

6.4.1 Espectroscopia UV-Visible e Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El extracto y las fracciones enriquecidas fueron analizadas por espectroscopia UV-Visible para determinar cualitativamente el grado de pureza y la absorbancia característica de los fitocostituyentes. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 60S UV-Visible. Adicionalmente, se midió la absorbancia de radiación infrarroja de las fracciones en un equipo Shimadzu FTIR Affinity-1 en un rango de frecuencia entre 500 y

4000 cm⁻¹, esto con el objetivo de proporcionar información sobre los grupos funcionales presentes (Figura 14).

6.4.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La identificación estructural de los componentes presentes en las fracciones se realizó basado en los experimentos ¹H, ¹³C, COSY, HSQC y HMBC. Los espectros de RMN fueron registrados en metanol deuterado (CD₃OD), usando microtubos de 3 mm de diámetro, con una concentración de muestra 60mg/mL, en espectrómetro Bruker Avance III HD 600 MHz equipo con supresión por presaturación HOD a 30 °C (Figura 14). Las señales fueron expresadas en ppm (δ) usando metanol deuterado como estándar interno a 3.33 ppm para ¹H y 47.62 ppm para ¹³C.

6.4.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La separación y composición de los compuestos presentes en las fracciones de glicolípidos se realizó mediante un cromatógrafo líquido acoplado espectrómetro de masas (LC-MS, del inglés, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) configurado ESI-Q-TOF, inyección automática en modo negativo (Figura 14). Para ello, 1 mg de cada muestra se disolvió en CHCl₃/MeOH en una proporción 1:1. Las condiciones empleadas para la separación de los fitoconstituyentes fueron las siguientes: columna Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (50 mm de diámetro interno x 4.6 mm de longitud, 1.8 μm de tamaño de partícula, Agilent), fase móvil acetato de amonio – isopropanol elución por gradiente, flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 20 μL. Para la ionización de los compuestos se utilizó la técnica ESI. El rango de exploración de masas fue de 100 - 2000 m/z. El capilar y el voltaje fueron de 220 °C y 4500 V respectivamente, y los iones moleculares [M-H]⁻ más abundante fueron fragmentados para producir los iones secundarios.

Caracterización Química de los Glicolípidos



Figura 14. Caracterización química de los glicolípidos de *S. filipendula*.

6.5 Mantenimiento celular

6.5.1 Descongelamiento de las líneas celulares

Las líneas celulares de Lucena-1, contenidas en criotubos se descongelaron a 37 °C en baño maría, hasta que la suspensión celular fuera homogénea. Se transfirió 1 mL de la suspensión celular y 10 mL de medio RPMI-1640 a un falcón de 15 mL, se centrifugó a 1200 rpm \times 5 min. Luego, el sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio RPMI-1640 suplementado al 10 – 20% (v/v) de suero fetal bovino, a 37 °C. Posteriormente, las células se dejaron en incubación a 37 °C con 5% de CO₂ por un periodo de 24 horas. Durante dicho tiempo se realizó el monitoreo del crecimiento celular y la posible presencia de contaminantes. Finalmente, se dejaron en incubación hasta observar confluencia.

6.5.2 Conteo de células y subcultivos

Las células de Lucena-1 (2×10^4 células/mL) se incubaron durante 72 h. Luego, la suspensión celular se transfirió a un falcón de 15 mL y se centrifugó a 1200 rpm \times 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1 mL de medio RPMI-1640. El conteo celular se determinó mediante el colorante azul de Trypan. La suspensión celular (10 μ L) se transfirió a eppendorfs, rápidamente se añadieron 90 μ L de solución de azul de Trypan al 0.08 %. Después de la homogeneización, las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer sanitizada con alcohol (70% v/v). El subcultivo se calculó para un volumen de suspensión celular de 2×10^4 células/mL, para un frasco con 5 mL RPMI-

1640 suplementado al 10% (v/v) SFB. El subcultivo se mantuvo en incubación en 5% de CO₂ a 37 °C.

6.6 Ensayos biológicos

6.6.1 *Ensayo de inhibición del transporte mediado por los miembros de la familia ABC en presencia de los glicolípidos como moduladores*

Para los ensayos de inhibición del transporte de ABCB1, ABCC1 y ABCG1 se usaron los sustratos rodamina 123 (Rho123, del inglés, *Rhodamine 123*), diacetato de 5(6) carboxifluoreceína (CFDA, del inglés, *5(6)-carboxyfluorescein Diacetate*) y mitoxantrona (MTX, del inglés, *Mitoxatrone*), respectivamente. Estos colorantes pueden distribuirse pasivamente en la célula, por ejemplo, Rho123 y MTX son fluorescente y son expulsados activamente por los transportadores ABCB1 y ABCG2 respectivamente; CFDA se hidroliza en el citosol y origina el sustrato fluorescente CF, que es transportado al medio extracelular por miembros de la subfamilia ABCC, en particular ABCC1.

Brevemente, los ensayos se realizaron en dos pasos de 30 min, suficientes para la acumulación y salida de colorantes, a 37 °C en CO₂ al 5 %, en un entorno protegido de la luz. Se incubaron 2×10^5 células de Lucena-1 en placas de 96 pocillos con Rho123 0.5 μM o CFDA 5 μM o MTX 50 μM, diluidos en medio RPMI-1640, para permitir la acumulación de los tintes dentro de las células. A continuación, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en medio RPMI-1640 nuevo, para permitir la salida de los colorantes (salida libre). Paralelamente, las células se incubaron con los glicolípidos en concentraciones de 25, 50, 100 y 200 μg/mL y, como control positivo, se emplearon los inhibidores, verapamilo (VP, del inglés, *Verapamil*) a 30 μM, ácido 5-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)etenil)fenil)-8-dimetilcarbamil-4,6-ditiooctanoico (MK-571) a 25 μM y (3*S*, 6*S*, 12*aS*)-1,2,3,4,6,7,12,12*a*-Octahidro-9-metoxi-6-(2-metilpropil)-1,4-dioxopirazino[éster 1,1-dimetiletílico del ácido 1',2':1,6]pirido[3,4-*b*]indol-3-propanoico (KO-143) 50 μM, para los transportadores ABCB1, ABCC1, ABCG2 respectivamente (Figura 15). Como control negativo, las células se expusieron únicamente al medio. Luego, las células se centrifugaron nuevamente, se resuspendieron en tampón sulfato salino (PBS, del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*) frío y se mantuvieron en hielo hasta su lectura en un citómetro de flujo láser FACScalibur equipado con el software Cell Quest.

6.6.2 Viabilidad celular in vitro

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de yoduro de propidio (PI). Brevemente, se incubaron 2×10^6 células/mL en una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de los glicolípidos durante 24 horas a 37 °C en 5% de CO_2 . Como control negativo, las células se resuspendieron con medio y como control positivo se utilizó el paraformaldehído al 4% (v/v). Luego, las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, se adicionó una solución del sustrato fluorescente PI a una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz y se analizaron en un citómetro de flujo láser FACScalibur equipado con el software Cell Quest (Figura 15).

6.6.3 Ensayo de reversión de la resistencia inducida por los transportadores ABC

El ensayo de reversión de la resistencia se determinó por triplicado utilizando el ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se sembraron células de Lucena-1 completamente diferenciadas en placas de 96 pozos (2×10^6 células/pocillo) y se trataron con concentraciones de 240 y 960 nM de vincristina (VCR) en presencia o ausencia del glicolípidos a 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$. La incubación se llevó a cabo a 37 °C, durante 48 h. Después, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 200 μL de MTT (5 mg/mL de MTT, disuelto en PBS) durante 4 h. Nuevamente, las células se centrifugaron y los cristales de formazan se disolvieron en 200 μL de DMSO. La absorbancia se detectó a 570 nm con un lector espectrofotométrico de placas UV-Visible Beckman Coulter (Figura 15). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.7 Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como la media +/- de la desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba posterior de Tukey o Dunnett, utilizando el software GraphPad Prism para Windows, versión 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) Los valores de significancia fueron representados en los gráficos por (*) para valores de $p < 0.05$; (**) para $p < 0.01$ y (***) para $p < 0.001$.

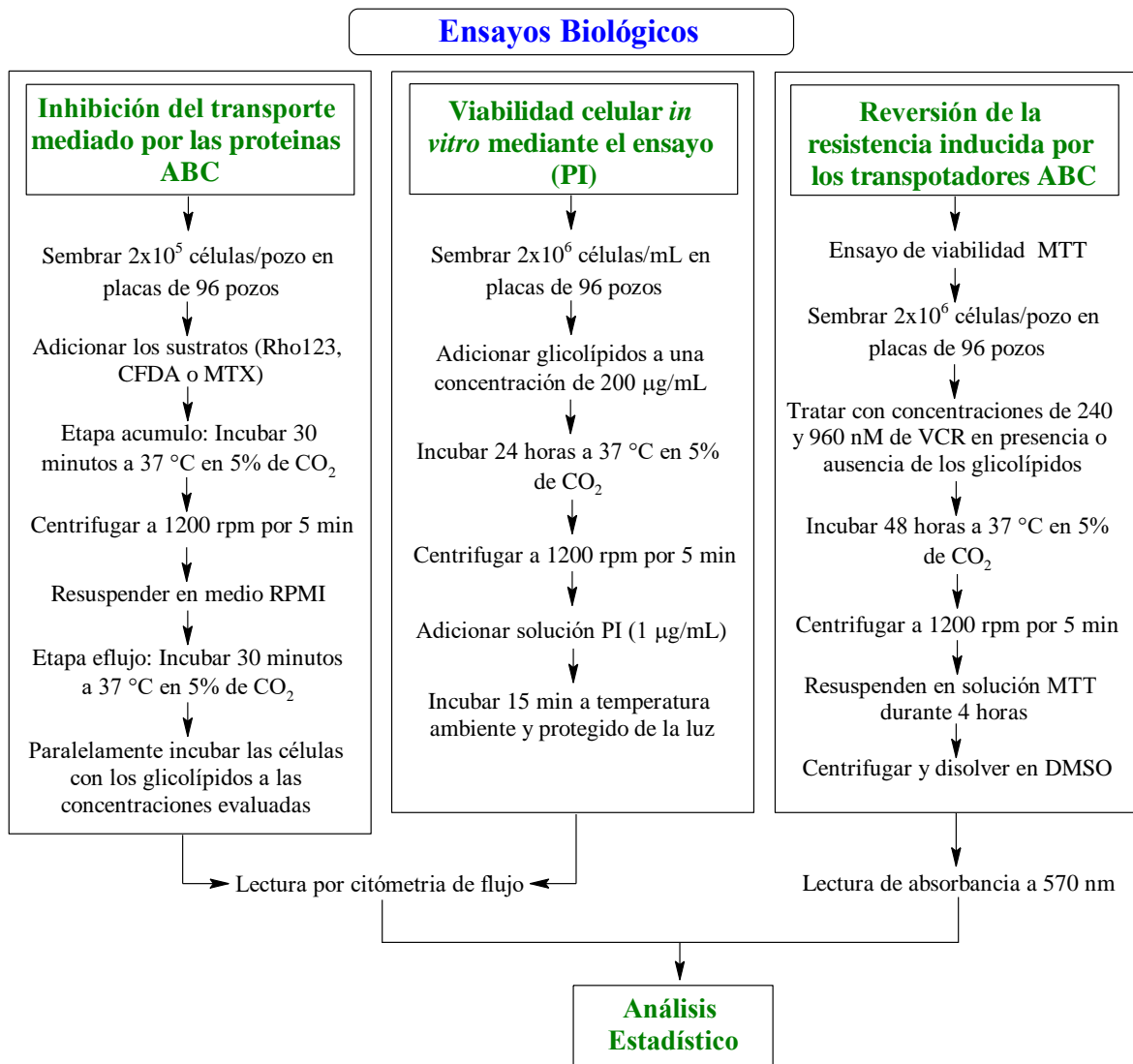


Figura 15. Ensayos biológicos.

Capítulo 7

Resultados y Discusión

7.1 Obtención del extracto orgánico y fraccionamiento

A partir de 512 g de *Sargassum filipendula* seco y pulverizado, se obtuvieron 7.01 g de extracto crudo, con un rendimiento de 1.36%, superior a los reportados para *Sargassum vulgare* (1.1%) (Santos et al., 2019). Del extracto cloroformo/metanol fraccionado mediante cromatografía en columna abierta, se colectaron 60 fracciones de 25 mL, que fueron analizadas por cromatografía en capa fina. De acuerdo con el factor de retención, se agruparon en 17 subfracciones de las cuales 8 fueron positivas para glicolípidos con un porcentaje de rendimiento del 18.1%, con respecto al extracto crudo. Los rendimientos y las claves de cada una de las fracciones enriquecidas en glicolípidos se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de las fracciones enriquecidas en glicolípidos de *S. filipendula*.

Fracción	Subfracción	Clave	Cantidad (mg)
32	VII	GL-1	0.0722
36	IX	GL-2	0.2362
37	X	GL-3	0.2737
38	XI	GL-4	0.1703
39	XII	GL-5	0.2254
40 - 41	XIII	GL-6	0.1268
42 - 43	XIV	GL-7	0.0636
44 - 46	XV	GL-8	0.0712

7.2 Análisis químico

Los gliceroglicolípidos, son los principales componentes lipídicos de la membrana fotosintética en algas; el género *Sargassum* es el representativo para las algas pardas, las cuales han reportado la presencia de un alto contenido de estos fitoconstituyentes entre 19 -

33% aproximadamente (Dembitsky et al., 1990; Murata & Siegenthaler, 2006). Estas sustancias, se caracterizan por ser moléculas de carácter anfifílica, en donde la porción hidrofílica está compuesta por monosacáridos o disacáridos de galactosa o en su defecto monosacáridos de quinovosa sulfonados. En este sentido, se determinó la cuantificación de azúcares neutros y azúcares sulfonados del extracto crudo y las fracciones de glicolípidos mediante el método colorimétrico de *fenol ácido sulfúrico* con el fin de garantizar la presencia de carbohidratos, así como la eficiencia en la purificación, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación de azúcares neutros y sulfonados del extracto crudo y las fracciones de glicolípidos.

Clave	Contenido de azúcares (%)	
	Neutros	Sulfonados
E	21.20 ± 0.92	4.60 ± 0.01
GL-1	35.32 ± 0.27	5.99 ± 1.34
GL-2	34.29 ± 2.44	5.80 ± 0.17
GL-3	39.42 ± 2.81	9.51 ± 0.02
GL-4	46.18 ± 2.90	9.18 ± 0.01
GL-5	40.41 ± 1.08	11.56 ± 0.02
GL-6	39.81 ± 2.35	11.93 ± 0.02
GL-7	33.57 ± 1.86	9.32 ± 0.01
GL-8	35.36 ± 1.26	3.98 ± 0.01

La reacción del método de Dubois para la identificación de azúcares neutros, provoca la hidrólisis de los enlaces O-sídicos en medio ácido y la deshidratación de los monosacáridos liberados para formar derivados de furfural que reaccionan con el fenol y dan el color amarillo a la solución (Figura 16). La cantidad de color es proporcional a la cantidad de furfural que se ha formado, por lo cual, los azúcares neutros libres se convierten en furfural utilizando un coeficiente del 99.01 %, como se muestra en la Figura 17-A. Todas las fracciones aumentaron considerablemente el contenido de azúcares después de la purificación, con porcentajes entre el 33 – 40 %, con respecto al extracto crudo.

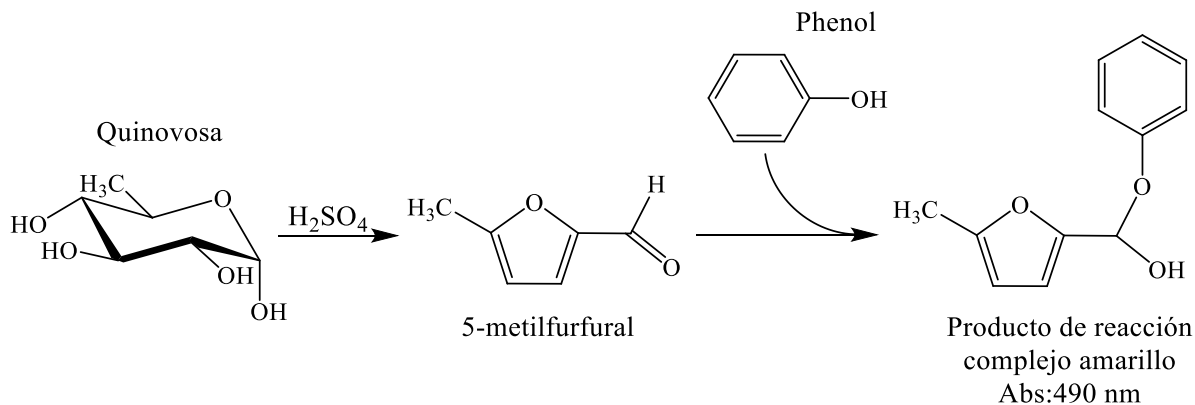


Figura 16. Descripción general del método de Dubois.

El análisis del contenido de azúcares sulfonados se determinó a partir de la curva de calibración usando como patrón de referencia el condroitín sulfato (Figura 17-B). La interacción electrostática del compuesto catiónico DMB con las cargas negativas de los grupos sulfonados presente en los glicolípidos de tipo sulfoquinovosilgliceroles, provoca un cambio de coloración de violeta a rosado (Figura 18). Tanto el extracto crudo como las fracciones en glicolípidos, presentaron carbohidratos sulfonados, con el mayor porcentaje para las fracciones GL-5 (11.56 %) y GL-6 (11.93 %).

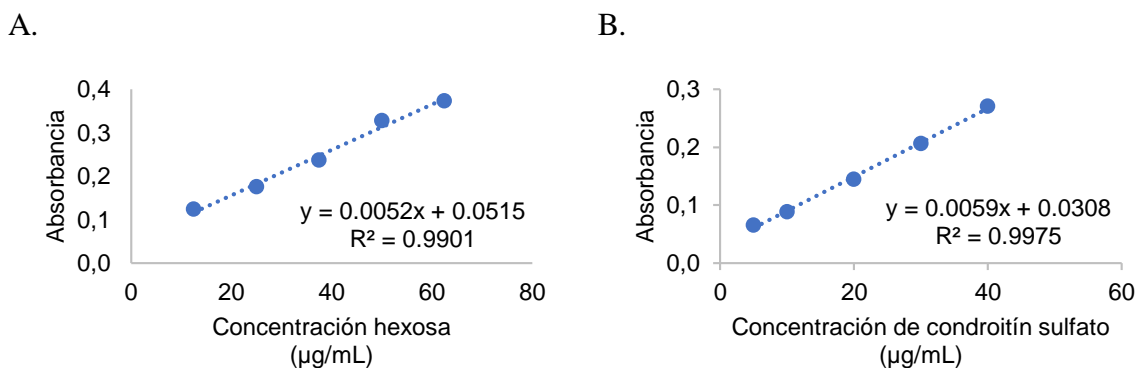


Figura 17. Curvas de calibración para: A. Contenido de azúcares neutros, y B. Contenido de azúcares sulfonados.

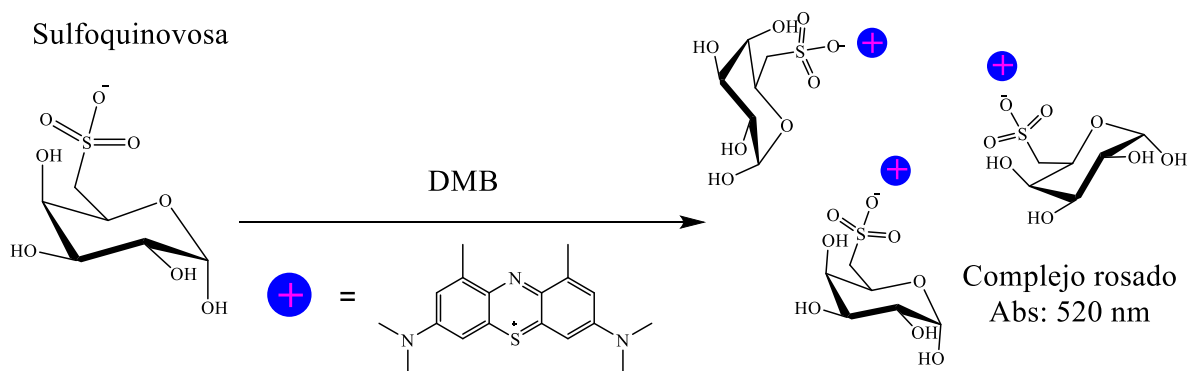


Figura 18. Descripción general de la interacción DMB con los glicolípidos.

7.3 Caracterización química de los glicolípidos

7.3.1 Análisis de espectroscopia UV-Visible

El estudio de la absorbancia de los rayos UV-Visible en las fracciones enriquecidas en glicolípidos se observan en la Figura 19. Todos los compuestos presentaron una absorbancia en la región ultravioleta, con una longitud de onda máxima en 205 nm, atribuible a la detección de ácidos grasos saturados e insaturados, además de una banda débil a 230 nm, correspondiente a los dienos conjugados presentes en ácidos grasos (Rusoff et al., 1945). Los glicolípidos de las algas pardas como se mencionó anteriormente, son de naturaleza anfipática, en donde la porción hidrofóbica está conformada por ácidos grasos saturados e insaturados con cadenas largas entre 16 a 18 átomos de carbono, principalmente (Sanina et al., 2012; Santos et al., 2019). Los ácidos grasos conjugados absorben energía más fácilmente que los dobles enlaces aislados porque la brecha de energía para transiciones electrónica de $\pi \rightarrow \pi^*$ es muy pequeña, por lo que, estas moléculas conjugadas absorben energía incluso de longitudes de onda más bajas del espectro UV-Visible y son responsables de la absorción de radiación UV (Anil Kumar & Viswanathan, 2013).

Por otro lado, los espectros UV-Visible permitieron evidenciar la pureza de los compuestos aislados. En el caso del espectro de la fracción GL-8, se observaron bandas de máxima absorbancia a 407 nm y 665 nm, característico de sustancias contaminantes como las clorofilas, carotenoides, ficocianinas entre otras (Fitch K and Kemker C, 2014), que fueron co-extraídos durante el proceso de fraccionamiento. La intensidad de absorbancia refleja la

concentración del pigmento. Por este motivo, la fracción GL-8 fue descartada, mientras que las fracciones de la GL-1 a GL-7, fueron seleccionadas para los análisis posteriores.

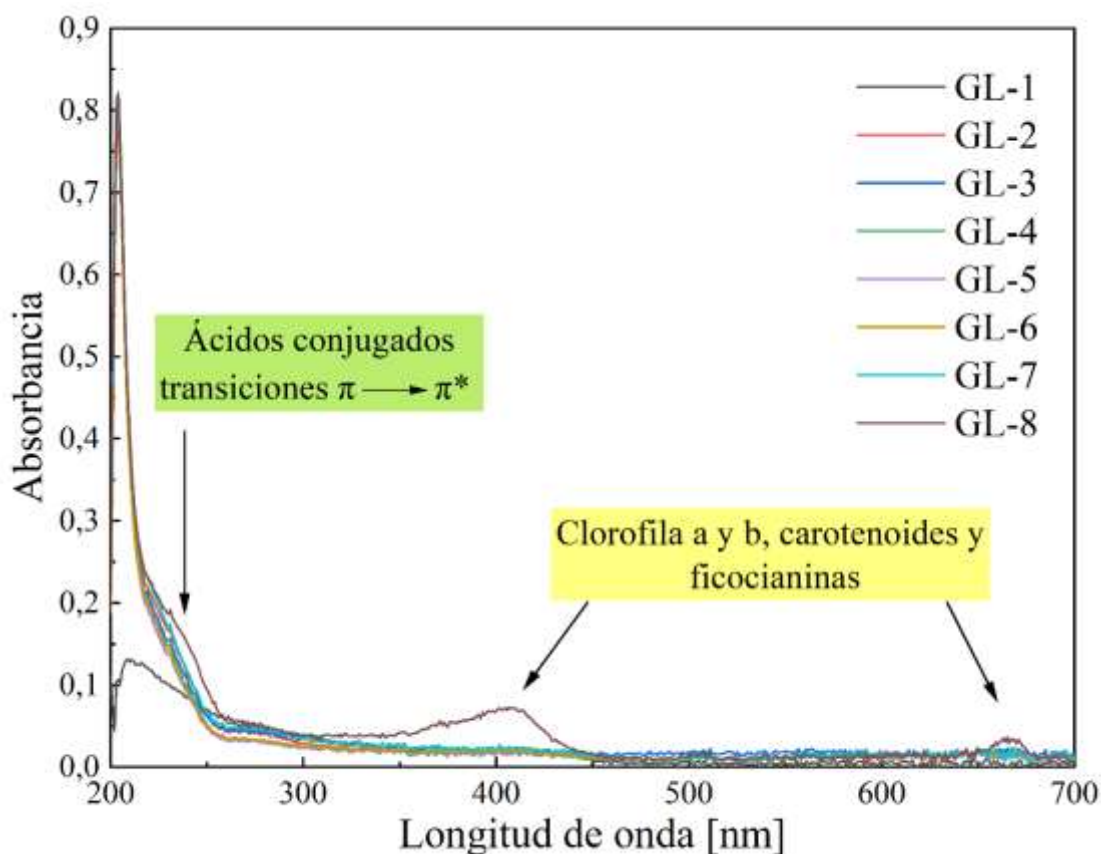


Figura 19. Espectro de absorción UV-Visible de las fracciones enriquecida en glicolípidos.

7.3.2 *Análisis de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)*

El análisis de grupos funcionales mediante espectroscopia infrarrojo de las fracciones seleccionadas, se presentan en las Figuras 20 y 21. Las absorciones a 2920, 2850 y 1465 cm^{-1} corresponden a las tensiones simétricas, asimétricas y flexiones respectivamente, asignadas a las bandas C-H ($\text{CH}_2 - \text{CH}_3$) de la cadena hidrocarbonada; mientras que la banda de vibración a 1647 cm^{-1} , pertenece a los alquenos conjugados de doble enlace C=C, presente en los ácidos grasos (Beekes et al., 2007). La banda de absorción en 3414 cm^{-1} se asignó a las vibraciones de los grupos O-H, unidos a la piranosa de los glicolípidos y la banda de absorción relativamente fuerte a 1728 cm^{-1} , es propia de las tensiones del éster carboxílico C=O de los ácidos grasos (Z. Cui et al., 2001; Rahelivao et al., 2015). La banda de absorción

en 1168 cm^{-1} , se asignó al estiramiento asimétrico del átomo de oxígeno del puente C-O-C y del átomo de carbono del anillo (enlace glucosídico), además de la vibración del esqueleto que implica el estiramiento del O-C-O a 1035 cm^{-1} (Islam et al., 2019). La región entre 700 y 950 cm^{-1} se considera una huella dactilar de carbohidratos y, a menudo, presenta algunos picos relacionados con el carbono anomérico (Fusconi et al., 2010). Finalmente se observó la presencia de una banda de vibración de tensión moderada del grupo S=O a 1371 cm^{-1} , confirmando la presencia de los grupos sulfonados en las fracciones enriquecidas en glicolípidos (SigmaAldrich, 2021).

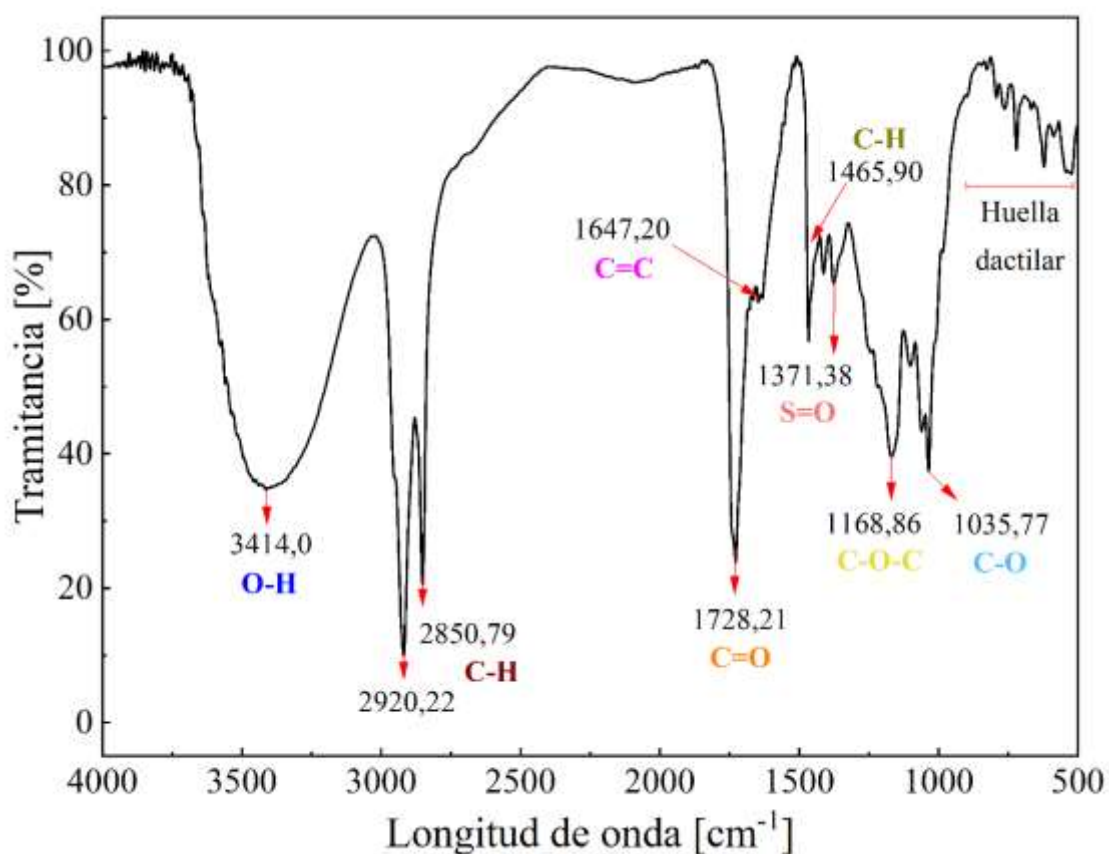


Figura 20. Espectro FTIR de la fracción GL-3.

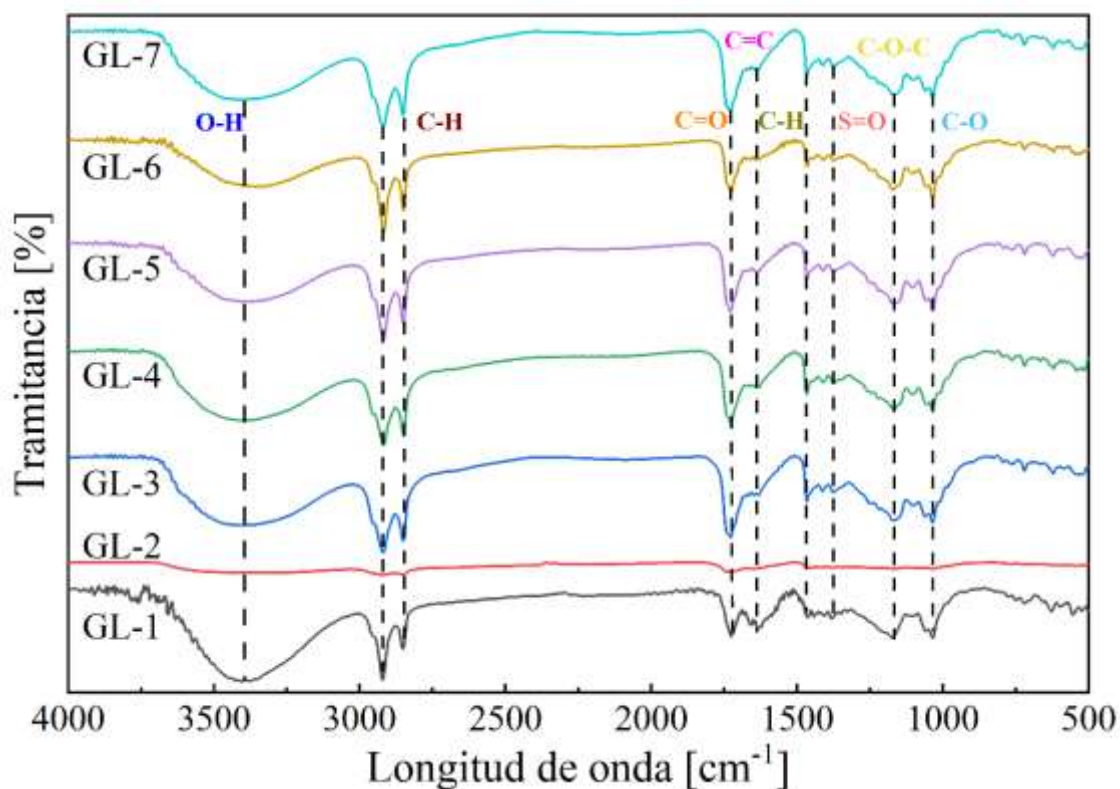


Figura 21. Comparación de espectros FTIR de las fracciones enriquecidas en glicolípidos.

7.3.3 *Análisis de Resonancia Magnética Nuclear*

El análisis de los espectros unidimensionales RMN ^1H y ^{13}C y bidimensionales COSY, HSQC y HMBC, de las fracciones enriquecidas en glicolípidos, permitió confirmar la presencia de compuestos de tipo sulfoquinovosilgliceroles, a partir de las señales características del núcleo del glúcido, el esqueleto del glicerol y la cadena de ácidos grasos que constituyen al glicolípidio. Así, en las Figuras 22 y 23, se identificó la presencia de señales en la región entre 0.8 - 2.6 ppm y 12.0 – 38.0 ppm, correspondientes a los protones y carbonos de los grupos metileno y metilo de la cadena de los ácidos grasos (negro), respectivamente; la región entre 2.9 - 5.5 y 52.6 – 99.0 ppm se asignó a los grupos metileno y metino de la hexosa (azul) y el esqueleto del glicerol (rosa); además de los carbonos cuaternarios del grupo carboxílico de los ácidos grasos entre 173.5 – 174.0 ppm. Se destacó la señal característica del protón anomérico H-1/4.79 ppm, que se encuentra acoplada con el carbón anomérico C-1/98.67 ppm, característico de la unidad $\alpha\text{-D}$ -quinovosa (Z. Cui et al., 2001) confirmado por la técnica de correlación heteronuclear HSQC (Figura 24), señales de núcleos menos

apantallados desplazados hacia campo bajo por el efecto desprotector del heteroátomo de oxígeno. Una región de los protones entre 5.3 – 6.0 ppm y carbonos entre 127.5 – 136.5, se aprecia para los grupos metinos de doble enlace, que corroboran la presencia de ácidos grasos de tipo insaturados (Anexo 1). El espectro HSQC (Figura 24), muestra los acoplamientos entre los carbonos y protones del glúcido, y la cadena de glicerol. Estas interacciones permitieron confirmar la presencia de glicolípidos de tipo 6-sulfo- α -quinovosilglicerol, por ejemplo, las señales de acoplamiento del C-6, con sus respectivos protones dirigidas hacia campo alto, se debe al ambiente químico protector de grupo sulfonado (Y. H. Kim et al., 2007; Plouguerné et al., 2010, 2013).

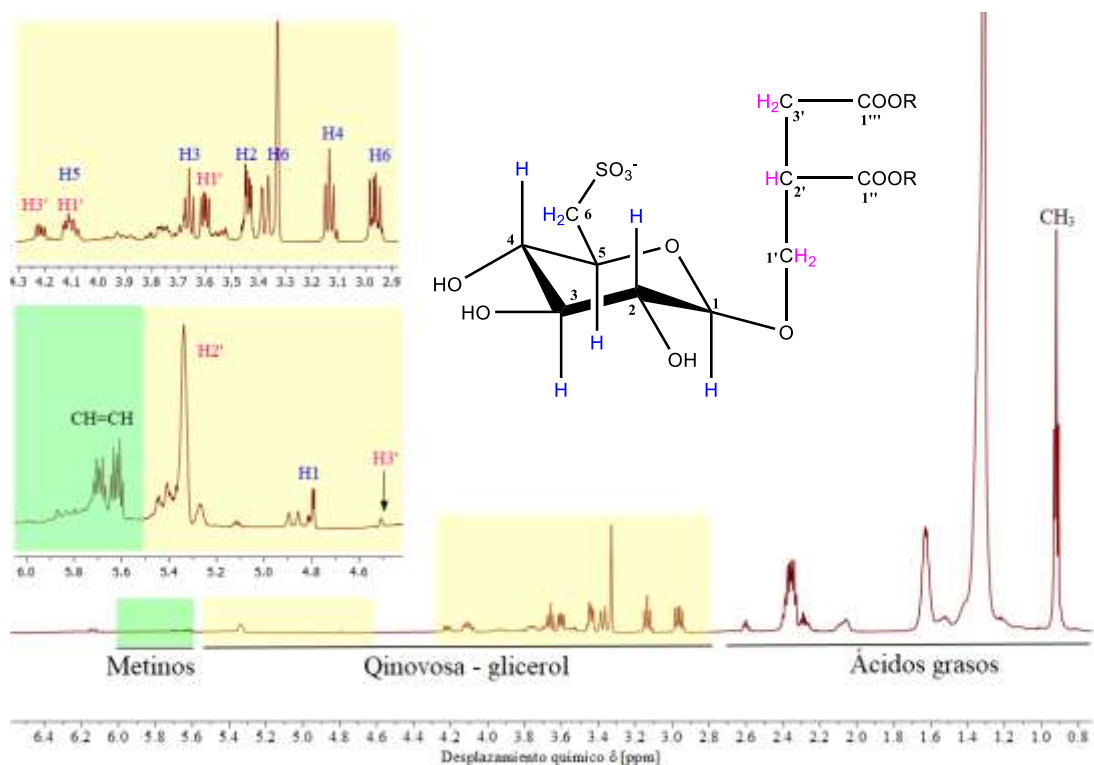


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, señal del MeOD δ_{H} : 3.32 ppm) del glicolípidio GL-4.

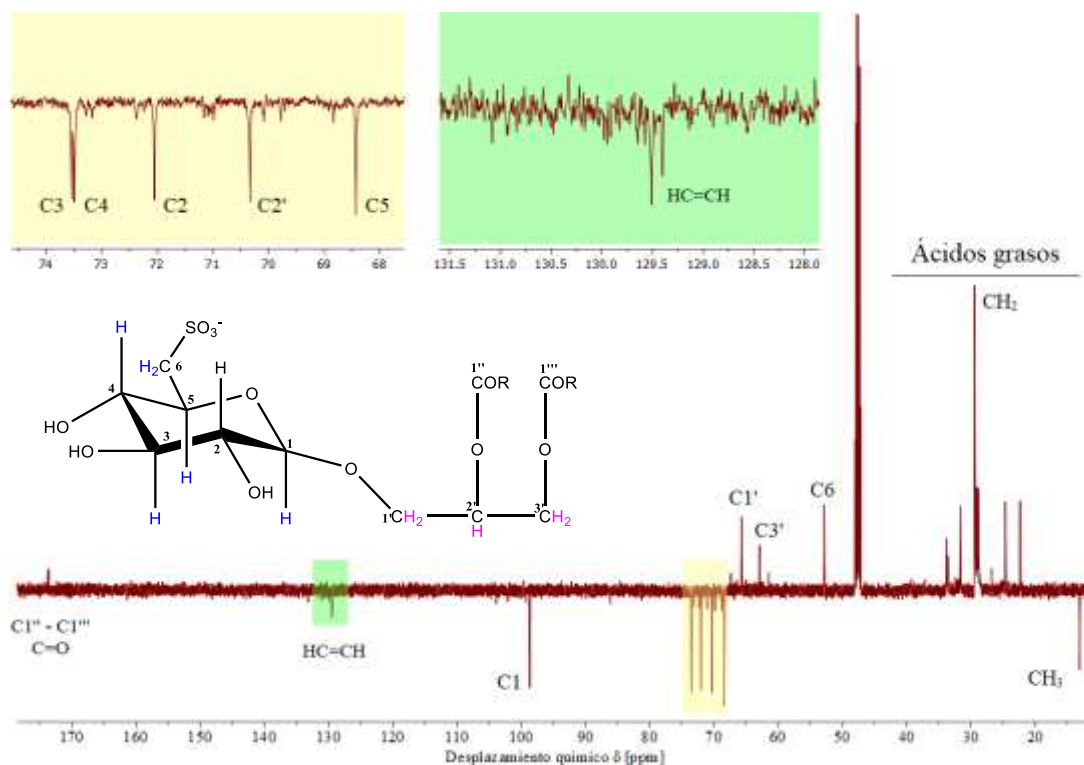


Figura 23. Espectro RMN ¹³C del glicolípido GL-4. Señal del MeOD (δ C:47.62 ppm)

Por otro lado, la asignación de señales mediante la técnica COSY permite establecer los ejes de conectividad de cada uno de los protones vecinales correspondientes, a lo largo de toda la unidad del sacárido y el glicerol (Figura 25). Así, se observó que el protón anomérico (H-1) de la quinovosa establece un eje de conectividad con el H-2 y a su vez, este último presenta un eje de conectividad con el protón H-3. De esta manera, se realizaron secuencias de interacciones vecinales restantes H-3→H-4→H-5→H-6 confirmando la estructura de la quinovosa sulfonada. En cuanto a las correlaciones entre los protones del esqueleto del glicerol, se evidenciaron correlaciones de H-1'→H-2'→H-3'. Adicionalmente, se logró apreciar el acoplamiento de los protones de los grupos metinos con los protones del grupo metilo terminal (triplete), así como la interacción entre los mismos, asignados a los ácidos grasos que componen la porción hidrofílica de los glicolípidos (Anexo 1).

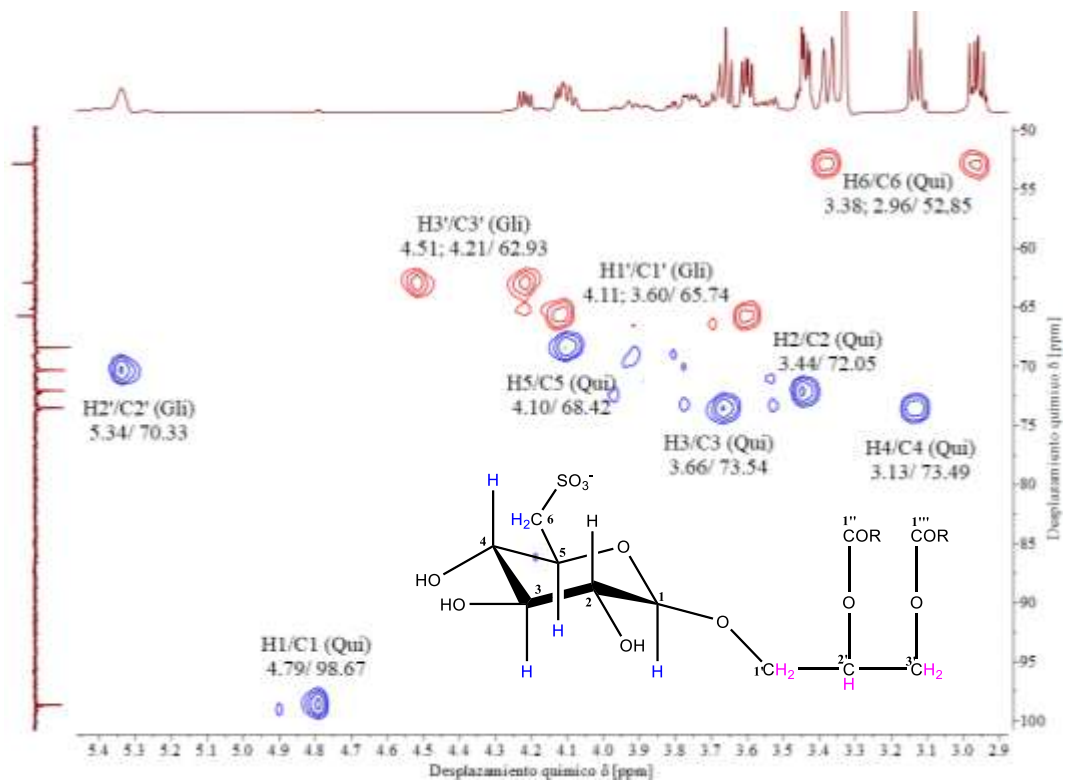


Figura 24. Espectro HSQC del núcleo del glúcido y el esqueleto del glicerol del glicolípido GL-4. Correlaciones (1J_{C-H}), abreviaciones: Gli= Glicerol, Qui= Quinovosa sulfonada.

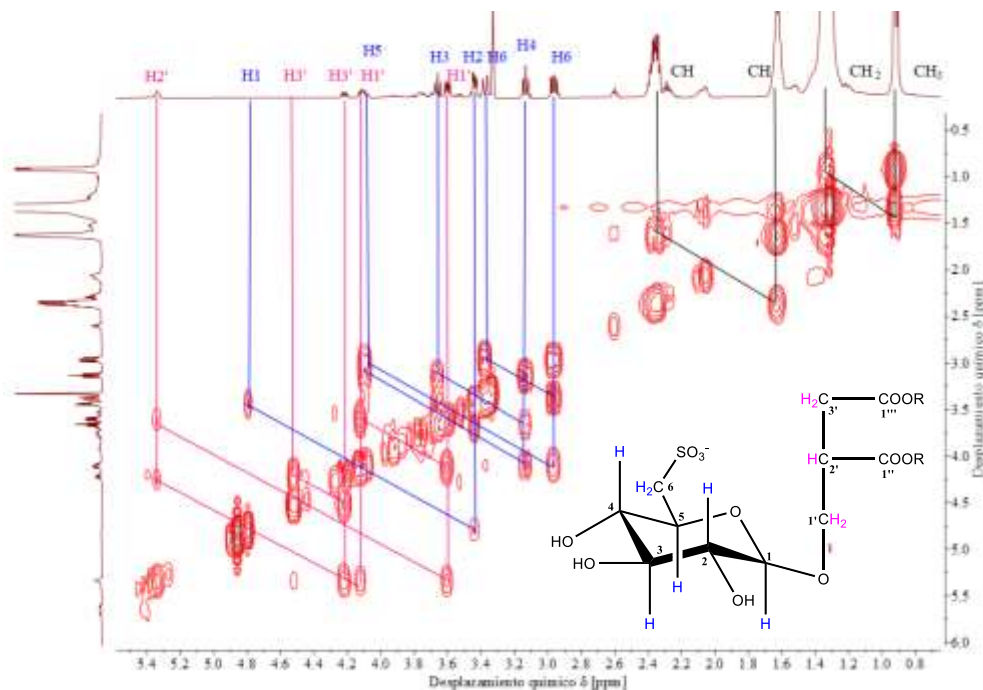


Figura 25. Espectro COSY de correlación entre protones (3J_{H-H}) del glicolípido GL-4.

A partir del experimento HMBC (Figura 26), se observaron las conectividades $^{2,3}J_{C-H}$ interpiranosídica, al mismo tiempo se comprobaron los cuadros de conectividad del azúcar con el esqueleto del glicerol de la siguiente manera: entre Gli C-1' (δ_C :65.74) y Qui H-1 (δ_H :4.79); Gli H-1' (δ_H :4.11 y 3.60) y Qui C-1 (δ_C :98.67). Así mismo, en la Figura 27 se aprecia la conectividad entre el glicerol y los carbonos cuaternarios de los esteres carboxílicos de los ácidos grasos así: Gli C-3' (δ_C :62.93) y Gli H-1' (δ_H :4.11 y 3.60); Gli H-1' y Cq-1'' (δ_C :173.5); Gli H-3' (δ_H :4.51 y 4.21) y Cq-1''' (δ_C :173.7) y las correlaciones a larga distancia entre los grupos metilenos de la cadena de ácidos grasos con los carbonos de doble enlace de los grupos metino. Finalmente, la Figura 28 muestra las conectividades entre los protones y carbonos que conforman a la porción hidrofóbica de los glicolípidos.

La estructura de los compuestos mayoritarios presente en las fracciones purificadas fue identificada como sulfoquinovosilgliceroles, que pueden estar sustituido por uno (SQMG) o dos (SQDG) cadenas de ácidos grasos. En la Tabla 4 se listan los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento asignados para los protones y los carbonos del núcleo del glúcido, el esqueleto del glicerol y los carbonos cuaternarios de los esteres carboxílico de los ácidos grasos.

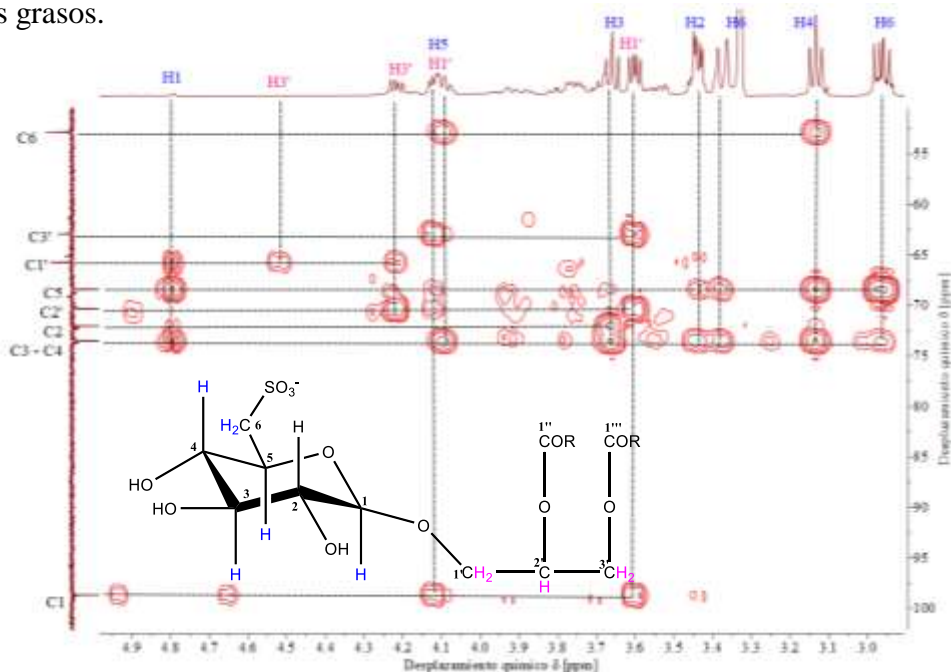


Figura 26. Espectro HMBC del glicolípidio GL-4.

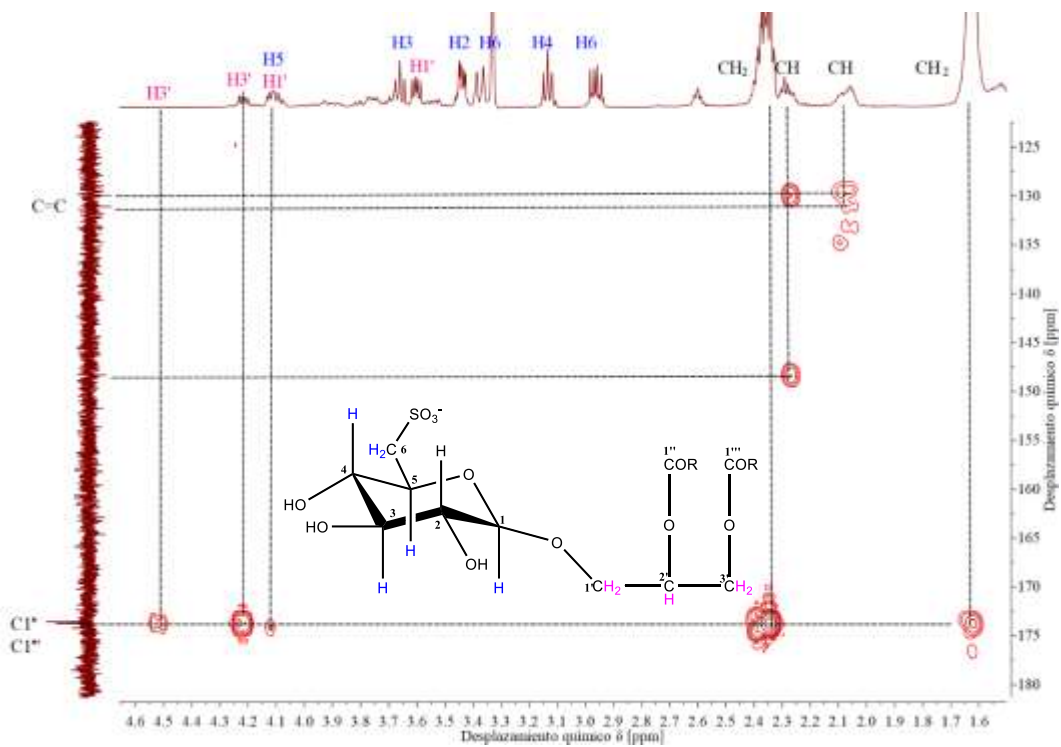


Figura 27. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.

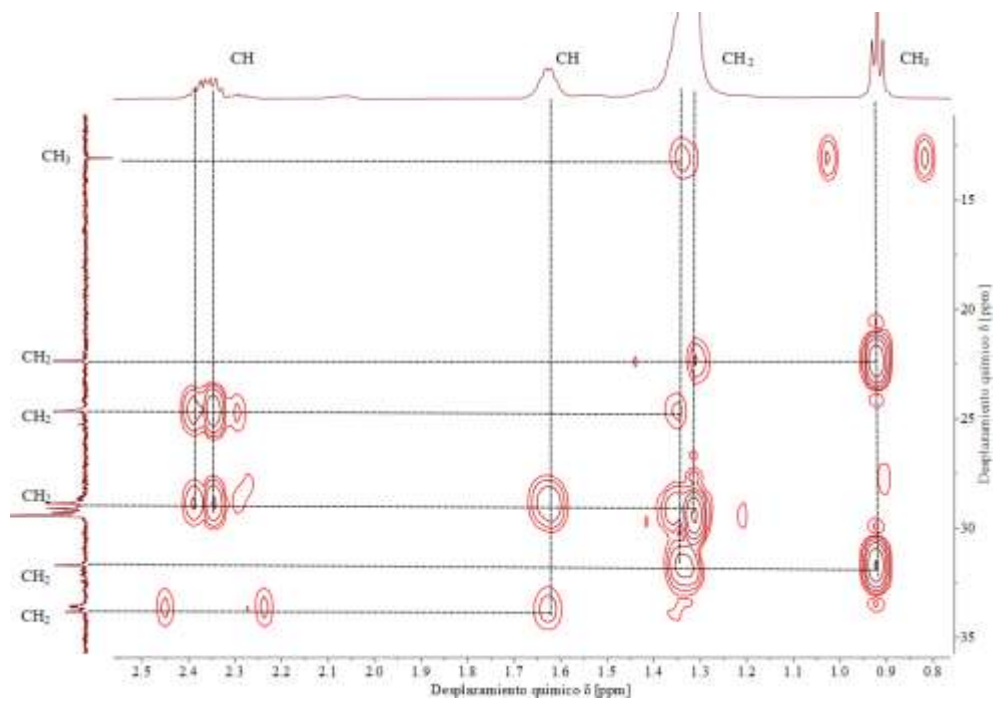


Figura 28. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.

Tabla 4. Correlación espectroscópica de los glicolípidos, determinada por RMN ^1H y ^{13}C .

	GL-1		GL-2		GL-3		GL-4		GL-5		GL-6			
	SQMG		SQDG		SQDG		SQDG		SQDG		SQDG		SQMG	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1'	69.01	4.07 (m) 3.44 (d)	65.75	4.11 (m) 3.61 (q)	65.74	4.11 (m) 3.61 (q)	65.74	4.11 (m) 3.60 (q)	65.73	4.11 (m) 3.60 (q)	65.72	4.11 (m) 3.59 (q)	65.15	4.21 (q) 4.11 (m)
2'	-	-	70.33	5.33 (m)	70.33	5.34 (m)	70.33	5.34 (m)	70.33	5.33 (m)	70.34	5.34 (m)	69.93	3.81 (m)
3'	65.16	4.21 (q) 4.13 (m)	62.94	4.52 (m) 4.21 (m)	62.94	4.52 (m) 4.22 (q)	62.93	4.51 (m) 4.21 (q)	62.93	4.51 (m) 4.21 (q)	62.95	4.51 (m) 4.21 (dd)	63.66	3.82 (m) 3.67 (dd)
1	98.71	4.83 (d)	98.67	4.79 (d)	98.67	4.79 (d)	98.67	4.79 (dd)	98.65	4.79 (dd)	98.64	4.79 (d)	98.75	4.89 (d)
2	72.14	3.47 (dd)	72.05	3.44 (dd)	72.05	3.44 (dd)	72.05	3.44 (dd)	72.04	3.44 (m)	72.05	3.44 (m)	72.24	3.44 (m)
3	73.68	3.69 (tr)	73.53	3.66 (m)	73.54	3.67 (tr)	73.54	3.66 (m)	73.54	3.66 (dd)	73.56	3.66 (dd)	73.71	3.66 (dd)
4	73.37	3.14 (tr)	73.50	3.13 (tri)	73.50	3.12 (tr)	73.49	3.13 (q)	73.48	3.12 (q)	73.50	3.12 (q)	73.50	3.12 (q)
5	68.42	4.12 (m)	68.41	4.09 (m)	68.42	4.11 (m)	68.42	4.10 (m)	68.43	4.09 (m)	68.46	4.10 (m)	68.42	4.10 (m)
6	52.76	3.39 (m) 2.98 (q)	52.86	3.38 (d) 2.97 (q)	52.86	3.39 (d) 2.96 (q)	52.85	3.38 (dd) 2.96 (sep)	52.84	3.37 (dd) 2.95 (sep)	52.83	3.37 (dd) 2.95 (sep)	52.83	3.37 (dd) 2.95 (sep)
1''	-	-	173.74	-	173.72	-	173.76	-	173.76	-	173.77	-	-	-
1'''	174.33	-	173.54	-	173.55	-	173.56	-	173.57	-	173.59	-	174.24	-

Los desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H se encuentran expresados en ppm. Los patrones de acoplamiento están expresados como: d = señal doble, dd = señal doble de doble, tri = señal triple, q = señal cuarteteado, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC, HMBC).

7.3.4 Análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La composición molecular de las especies de sulfoglicolípidos presentes en las fracciones de *S. filipendula* fue establecida a través del análisis por LC-MS. En la Figura 29, se muestra el cromatograma (TIC, del inglés *Total ion current*) de las fracciones enriquecidas en glicolípidos, en donde se observó la separación de los compuestos presentes en cada fracción y su intensidad. Un total de 10 iones desprotonados con m/z 555, 577, 793, 765, 805, 819, 821, 835, 875 y 877 fueron identificados, los cuales pueden estar presentes en más de una fracción (Tabla 5). La confirmación de la estructura de los ácidos grasos que conforman al sulfoglicolípidos, se realizó mediante la fragmentación de los iones pseudomoleculares $[M - H]^-$ (MS^1). Los iones moleculares mostraron los fragmentos m/z 225, 165 y 95 característicos del residuo 6-desoxi-6-sulfonato-hexosilo de sulfoquinovosilglicerol (Figura 30 y 31); similares a los reportados para los (SQDGs) aislados de *S. vulgare* (Plouguerné et al., 2013).

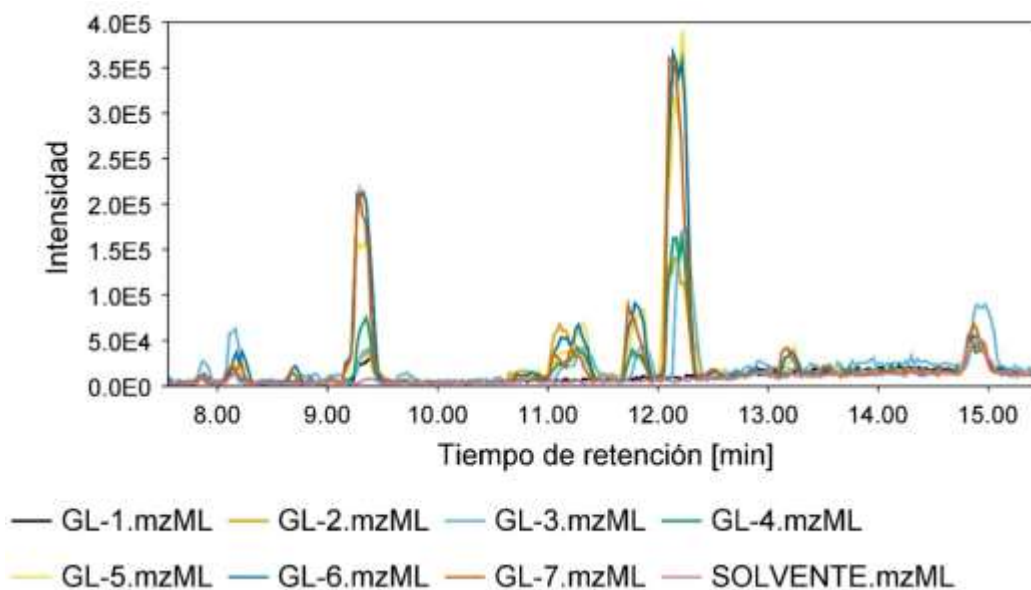


Figura 29. Perfil cromatográfico (TIC) de las fracciones enriquecidas en glicolípidos de *S. filipendula*.

El ion con relación m/z 793.5, fue el más abundante para todas las fracciones de glicolípidos a excepción de GL-1. Este ion, presentó fragmentos en m/z 537.3 ($M - C_{16:0}$, desde la posición sn-2), 537.03 ($M - C_{16:0}$, desde la posición sn-1), 225, 165, 153 y 95, como se indica en la ruta de fragmentación, consistente con una estructura SQDG denominado del 1,2-di-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol, esterificada por dos ácidos

palmíticos (C16:0) (Figura 30). La estructura de este compuesto, es comparable al SQDG aislado del extracto lipídico de hojas de espinaca y de la cianobacteria *Gloeotheca sp.* (E. da Costa et al., 2020; Zianni et al., 2013).

La vía de fragmentación de los iones desprotonados aislados de *S. filipendula* es compatible con la estructura de SQDG, los cuales se presentan en la Tabla 5 y el Anexo 3. Adicionalmente, los iones pseudomoleculares $[M - H]^-$ 793, 765, 835 y 819, fueron reportados previamente en la especie *S. vulgare* (Plouguerné et al., 2013).

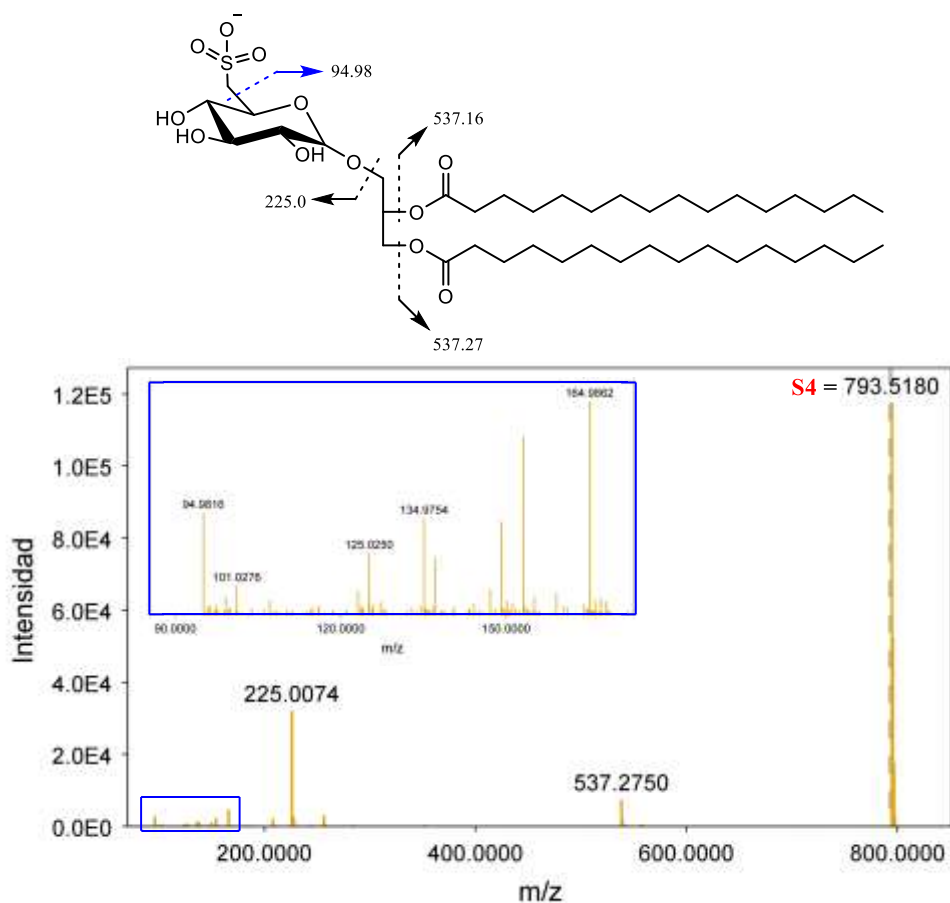


Figura 30. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion $m/z = 793.5$ (compuesto S4) y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1,2-di-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

Por otro lado, la fracción GL-1 mostró dos compuestos de tipo sulfoquinovosilmonoacilglicerol (SQMG), identificado por los iones con m/z 577.3 y 555.3 (Tabla 1). El compuesto 1-mono-2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol con ion molecular de m/z 555.3 fue el más abundante, con iones fragmentos en m/z 299.0 (M – C16:0 desde la posición sn-2), 225, 165 y 95 que coinciden con una estructura de SQMG esterificada por un ácido palmítico (C:16:0) (Figura 31). Este tipo de glicolípidos no ha sido reportado para el género *Sargassum*, sin embargo, se han identificado en el extracto lipídico de la cianobacteria *Gloeothece sp.* (E. da Costa et al., 2020).

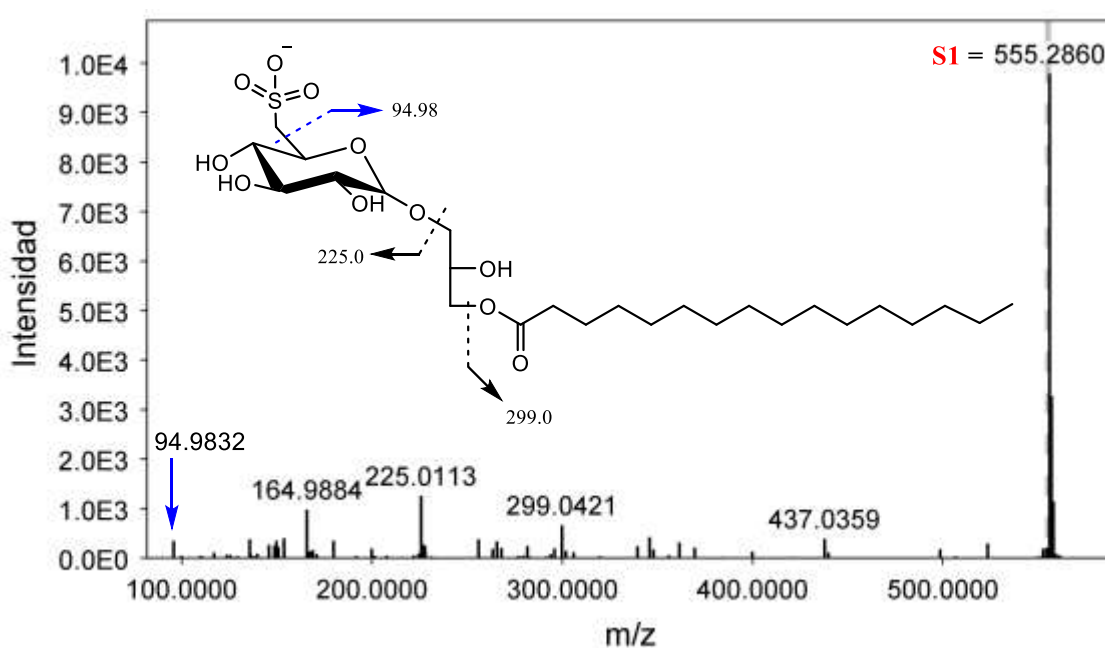


Figura 31. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 555 (compuesto S1) y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-mono-2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

Tabla 5. Identificación de los sulfoquinovosilgliceroles presente en las fracciones de glicolípidos de *S. filipendula*.

Clave	Compuesto	Formula molecular	Peso molecular	R1/R2	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	[M-R1] ⁻ <i>m/z</i>	[M-R2] ⁻ <i>m/z</i>	Tiempo de retención (min)
GL – 1, GL – 5-7	S1	C ₂₅ H ₄₈ O ₁₁ S	556	C _{16:0}	555.3	299	-	9:40
GL – 1	S2	C ₂₇ H ₄₆ O ₁₁ S	578	C _{18:3}	577.3	299	-	9:32
GL – 2-7	S3	C ₃₉ H ₇₄ O ₁₂ S	766	C _{14:0/} C _{16:0}	765.5	537.3	509.3	11:72
GL – 2-7	S4	C ₄₁ H ₇₈ O ₁₂ S	794	C _{16:0/} C _{16:0}	793.5	537.2	537.3	12:06
GL – 4	S5	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₂ S	806	C _{17:1/} C _{16:0}	805.5	537.3	549.2	10:91
GL – 2	S6	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₂ S	820	C _{18:1/} C _{16:0}	819.5	537.3	563.3	12:16
GL – 6	S7	C ₄₃ H ₈₂ O ₁₂ S	822	C _{18:0/} C _{16:0}	821.6	537.3	565.3	12:52
GL – 3, GL – 4, GL – 6	S8	C ₄₄ H ₈₄ O ₁₂ S	836	C _{19:0/} C _{16:0}	835.5	537.3	579.3	11:02
GL – 2	S9	C ₄₇ H ₈₈ O ₁₂ S	876	C _{22:0/} C _{16:1}	875.5	537.3	621.3	12:22
GL – 5-7	S10	C ₄₇ H ₉₀ O ₁₂ S	878	C _{22:0/} C _{16:0}	877.6	537.3	621.3	13:19

7.4 Evaluación de la actividad de inhibición de los miembros de la familia ABC involucrados en la resistencia a múltiples fármacos en líneas celulares de Lucena-1

7.4.1 Análisis de actividad de los transportadores ABC

La actividad de los transportadores ABC puede evaluarse mediante el transporte de sustratos fluorescentes como se describió en la metodología. Este ensayo adoptó el protocolo de análisis propuesto por Da Costa, K (2017), donde un diagrama de puntos para los parámetros dispersión de luz frontal (representativa del tamaño) y dispersión de luz lateral (representativa de la complejidad/granularidad) se realiza con el programa Summit, con el fin de analizar los eventos que surgen de la lectura en el citómetro de flujo (Figura 32). En dicho gráfico se demarcó la región correspondiente a la población celular estudiada.

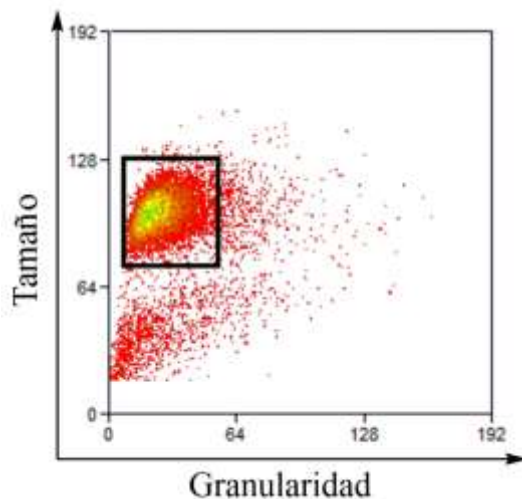


Figura 32. Diagrama de puntos de tamaño vs granularidad de células de leucemia mieloide crónica Lucena-1.

El recuadro negro encierra 10.000 eventos (puntos), que representan la población de células viables para el análisis de transporte.

El análisis de la actividad de eflujo se realizó mediante un histograma de la intensidad de fluorescencia para el colorante (Figura 33), que muestra únicamente los eventos provenientes de la región previamente demarcada. En el ensayo, se requieren al menos tres condiciones para la cuantificación de la actividad: (1) control negativo, (2) control de salida de sustrato y (3) inhibición de salida de sustrato. Las células de control negativo no fueron expuestas al sustrato en el ensayo de eflujo, representando así la auto-fluorescencia de la célula, condición

necesaria para el ajuste del dispositivo, posicionando las células entre 10^0 y 10^1 en el eje referente a la intensidad de fluorescencia del sustrato. En presencia del sustrato solo (control de salida, condición 2), las células muestran diferentes intensidades de fluorescencia y pueden ocupar diferentes regiones del histograma. La intensidad de fluorescencia del sustrato en cada célula depende de la permeabilidad celular, la concentración del sustrato y la temperatura, caracterizándose esta condición como control del ensayo. Una región etiquetada como sustrato negativo incluye arbitrariamente la región de auto-fluorescencia de las células y el 95 % de las células que se muestran en el histograma en la condición 2. En consecuencia, la región positiva incluye el 5 % restante de las células. Las células que han estado expuestas tanto al sustrato como al inhibidor (condición 3) deben tener una intensidad de fluorescencia alta, si muestran actividad portadora. Por lo tanto, una vez que se inhibe el transportador, las células no pueden expulsar el sustrato y se encuentran en la región positiva, como se muestra en la Figura 26. Una cuarta condición se agregó al ensayo para verificar la acumulación de sustrato en condiciones normales. En esta condición, las células fueron expuestas al sustrato en la etapa de acumulación, pero sin posibilidad de eflujo (acumulo, condición 4).

La actividad de eflujo de un sustrato dado se puede medir de dos formas: por la mediana de la intensidad de fluorescencia del sustrato (MIF) y por el porcentaje de células sustrato positivo (CF, Rho123 o MTX) en presencia del modulador de transporte. La MIF es mayor en las células que tienen el transportador inhibido (condición 3) en comparación con aquellas que tienen el transportador en ausencia de inhibidores (condición 2/control). El aumento del porcentaje sustrato (+) junto con la MIF en presencia del modulador indica mayor capacidad de inhibición. Sin embargo, otra forma de determinar la actividad de modulación es a través del índice de inhibición de eflujo de sustrato (Δ), que está representado por la relación de MIF del sustrato en la célula en presencia del inhibidor y MIF del sustrato en la célula en ausencia del inhibidor (CTL, control). Valores > 1 de esta relación indican la actividad de inhibición del transportador. Finalmente, a partir del porcentaje de sustrato + se calculó el porcentaje de células moduladas o inhibidas por los glicolípidos mediante la diferencia entre el porcentaje de células sustrato (+) en presencia del modulador, y en su ausencia (CTL).

A partir de esta interpretación, la actividad funcional y, por tanto, la capacidad de inhibición de los transportadores ABCC1, ABCB1 y ABCG2 involucrados en el fenotipo de MDR en cáncer fue determinada para un modelo celular de Lucena-1 resistente a fármacos. Para ello, se emplearon como moduladores los siete glicolípidos aislados de *S. filipendula* en concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

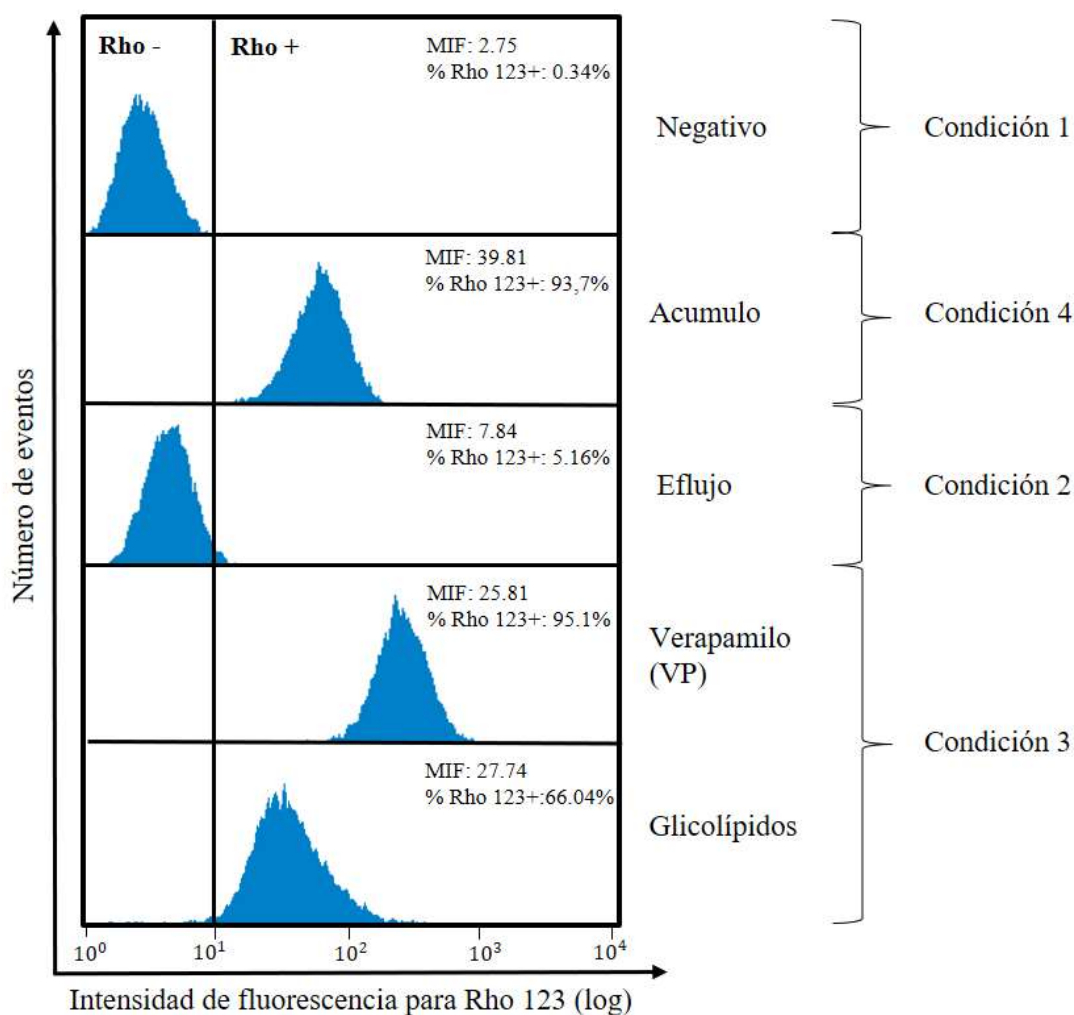
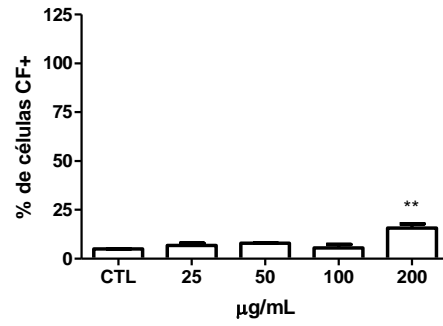
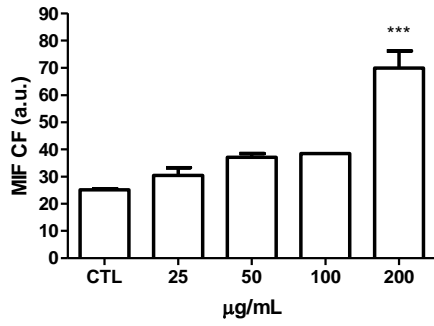


Figura 33. Ensayo de eflujo del sustrato rodamina 123 (Rho 123) en células Lucena-1. Esta figura explica la condición de acumulo, eflujo e inhibición del transporte por medio de la delimitación de las regiones negativa y positiva de los sustratos.

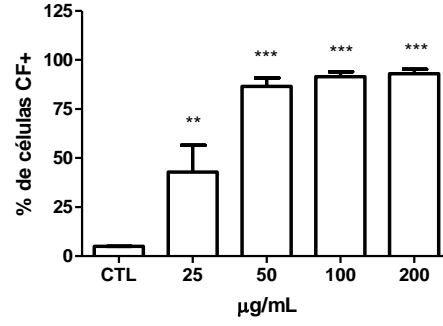
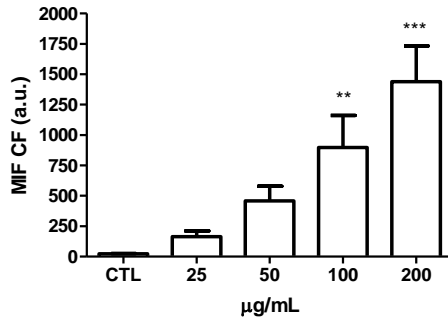
7.4.2 *Proteína transportadora ABCC1*

Para estimar la actividad funcional del transportador ABCC1 se utilizó el sustrato CFDA, el cual es desacetilado por esterasas intracelulares produciendo el compuesto fluorescente CF, y se usó como control positivo el inhibidor específico MK-571 a 25 μ M. Una elevada actividad de inhibición/modulación del transporte de la proteína transmembrana ABCC1 en presencia de los glicolípidos fue observada a través del porcentaje de CF+ y la MIF de CF, con excepción del compuesto denominado GL-1 (Figura 34). Para GL-1, la MIF fue de 25.19 para el control, entre 30.4 – 38.8 para las concentraciones de 25, 50 y 100 μ g/mL y 69.89 para 200 μ g/mL (valores medios representados en barra). En cuanto al porcentaje de células, solo el 10.74% de las células fueron inhibidas a la concentración más alta de GL-1, mientras que, a concentraciones bajas del modulador, no presenta diferencia significativa con respecto al control, con porcentajes de células inhibidas inferiores al 5%. Esta actividad no moduladora de GL-1, podría estar relacionada con su estructura, ya que este solo presenta una cadena de ácido graso, mientras que el resto de los glicolípidos sulfonados están conformados por dos ácidos grasos; de allí, es probable que la afinidad de compuesto hacia el transportador este inclinado más hacia la hidrofobicidad conferida por las cadenas carbonadas (Chang, 2007). Por otro lado, GL-2, GL-3 y GL-4 presentan una MIF entre 103.67 – 158.4, 289.13 – 487.67, 701.06 – 892.09 y 1031.72 – 1433.92 para 25, 50, 100 y 200 μ g/mL respectivamente; valores superiores a los observados para los compuestos GL-5, GL-6 y GL-7, que no dejan de ser significativos en cuanto a su capacidad para inhibir el transporte de la proteína ABCC1. Respecto al porcentaje de células inhibidas, podemos confirmar que estos glicolípidos de *S. filipendula* son moduladores naturales de ABCC1 con el potencial de inhibir el 50% de las células a una concentración de 50 μ g/mL e igual o superiores al 80% a 200 μ g/mL. En este sentido, la proteína ABCC1 transporta una variedad de xenobióticos hidrofóbicos, así como conjugados de aniones orgánicos relativamente hidrofílicos o moléculas conjugadas con sulfato (Jedlitschky et al., 1996; Qian et al., 2001), es por ello que se sugiere que la inhibición competitiva de los glicolípidos hacia el transportador ABCC1, se deba a la alta afinidad de los compuestos hacia los sitios de unión de proteína, conferida principalmente a la carga negativa del grupo sulfonado y el carácter anfifílica de las moléculas otorgado por los ácidos grasos de cadena larga.

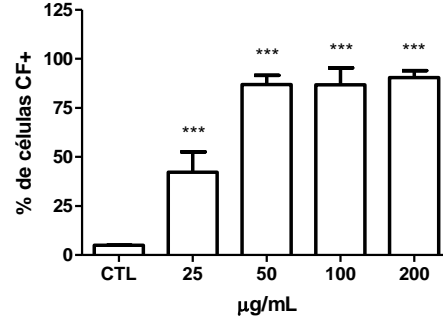
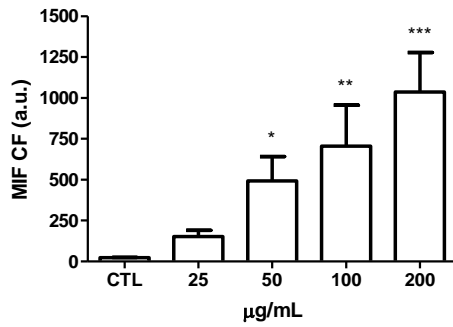
GL-1



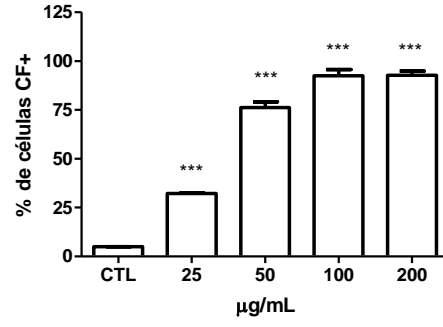
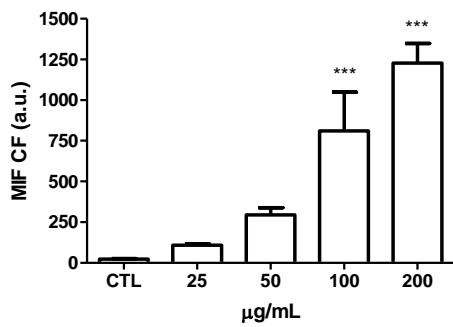
GL-2



GL-3



GL-4



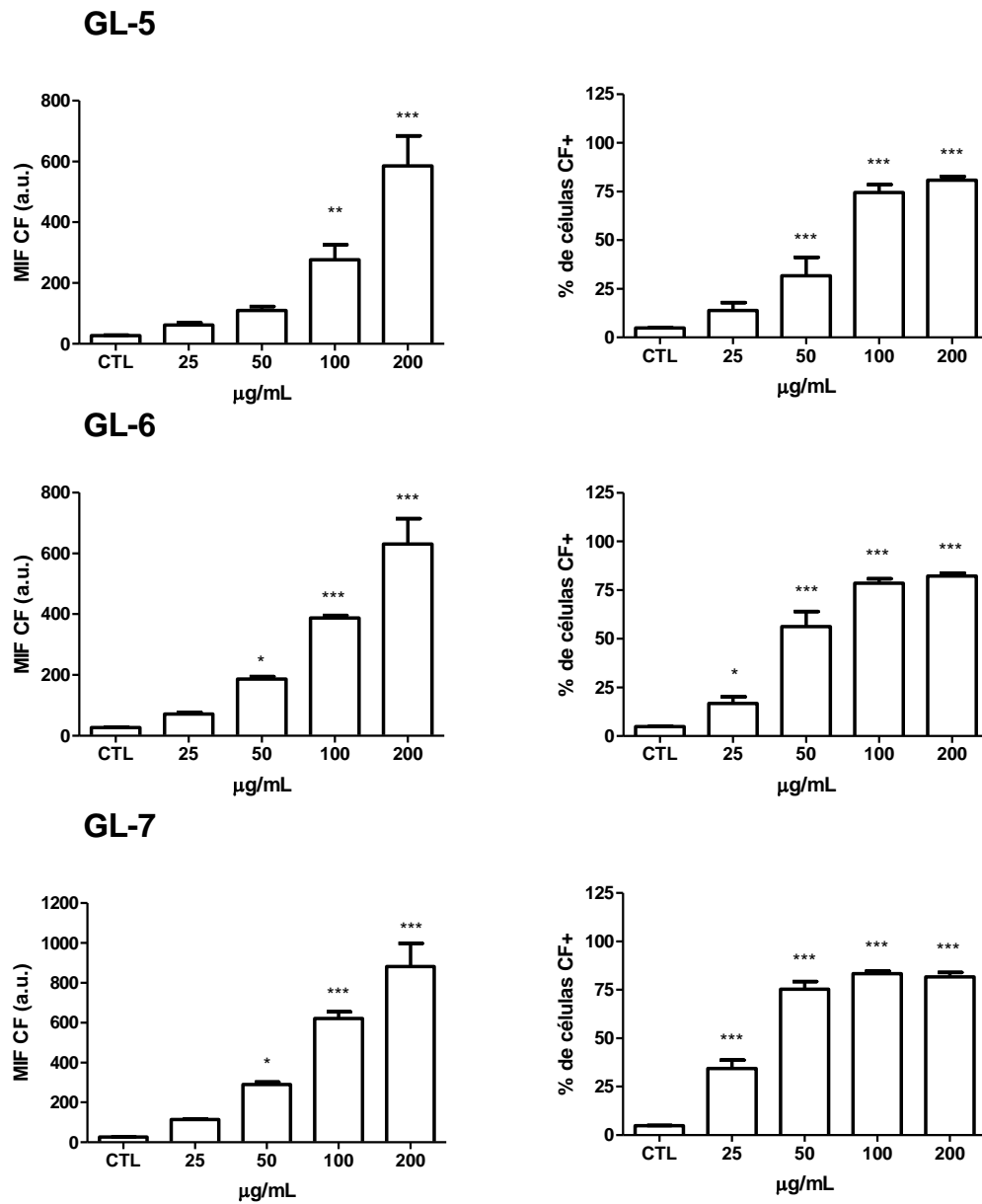


Figura 34. Actividad de inhibición del transporte de ABCC1 en líneas celulares de Lucena-1 por los glicolípidos de *S. filipendula*. El control (CTL) corresponde al inhibidor específico MK-571 a 25 µM.

También, se ha reportado en la literatura que la inhibición de la proteína está relacionada con el transporte competitivo o con el co-transporte con GSH reducido (S. P. C. Cole, 2014b; Laberge et al., 2007; Leslie et al., 2004) y no interfiere en la función del transportador.

Estos resultados, representan el primer hallazgo de glicolípidos de origen natural capaces de modular la actividad de transporte de la proteína ABCC1 involucrada en el mecanismo de resistencia a fármacos en cáncer.

La Figura 35 muestra los valores de $\Delta > 1$ de los glicolípidos sulfonados, confirmando actividad de modulación frente el transportador de membrana ABCC1, particularmente los compuestos GL-2, GL-3 y GL-4. Además, es posible observar que la salida de CF fue mayor a medida que aumentaba la concentración del inhibidor. Adicionalmente, los resultados muestran la presencia de actividad transportadora de ABCC1 en el modelo celular de Lucena-1.

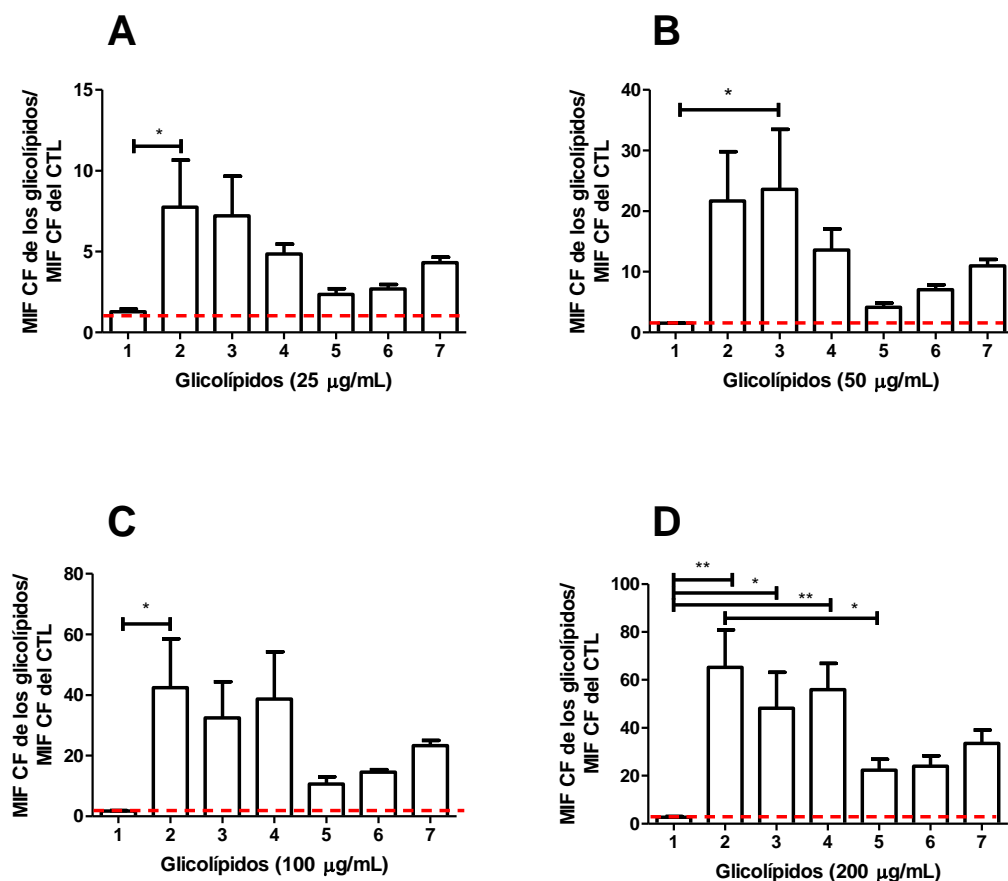


Figura 35. Índice de inhibición del transporte CF (Δ) para las líneas celulares de Lucena-1 en presencia de los glicolípidos a: A) 25 µg/mL, B) 50 µg/mL, C) 100 µg/mL y D) 200 µg/mL.

Teniendo en cuenta los resultados del potencial de modulación de los GL, también es importante determinar su nivel de citotoxicidad con el fin de continuar con etapa siguiente relacionada con la reversión de la resistencia y distinguir claramente cualquier efecto de potenciación (actividad de inhibición) de un posible sinergismo o efecto aditivo entre un compuesto activo y el agente antineoplásico cuando estos sean coadministrador en el ensayo de reversión de la resistencia. Por tanto, con el fin de correlacionar tanto los ensayos como sus resultados, se usaron las mismas concentraciones de los glicolípidos, evaluados en el ensayo de salida de CF y en el ensayo de viabilidad celular PI. El análisis del histograma de fluorescencia se dividió en dos regiones: PI-negativo (izquierda de la Figura 36), que representa el 95 % de las células viables que no sufren tinción del colorante y PI-positivo (derecha de la Figura 36), correspondiente a las células con colorante que penetra sólo en las membranas celulares dañadas. La condición de control hace referencia a las células que recibieron el sustrato fluorescente en ausencia de los glicolípidos y se utilizó el PFA como control positivo (Figura 36).

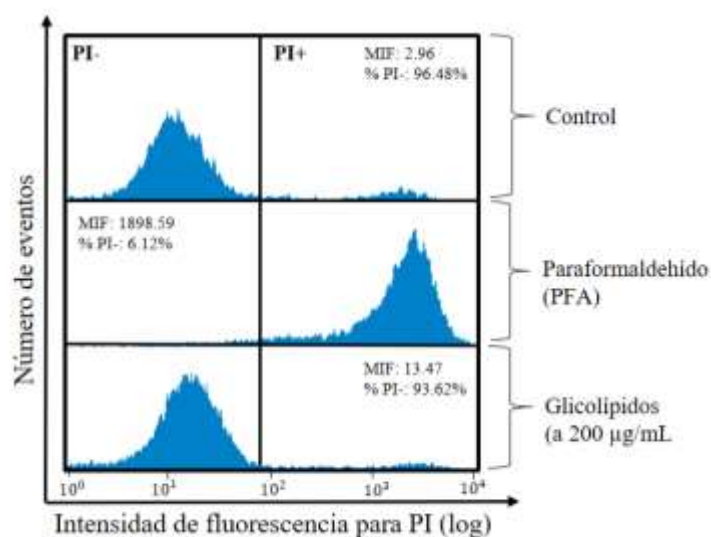


Figura 36. Histograma del ensayo de viabilidad celular determinada por el método de tinción PI.

Bajo estas condiciones, después de 24 horas de incubación a 37 °C (Figura 37), los compuestos mostraron un porcentaje de viabilidad celular superior al 80 % en una concentración de 200 µg/mL, valor comparable con el de las células del control. Finalmente, los resultados revelaron que, independientemente de la dosis suministrada, no hay variación

en la viabilidad celular (Anexo 2). Estos resultados, son acordes con los reportados para un sulfoglicolípido aislado de *S. horneri*, el cual no presentó efecto citotóxico en líneas celulares normales de colon CCD-18Co en concentraciones de 50 y 100 μM (Hossain et al., 2005).

Una vez determinado que los glicolípidos no presentaron un efecto toxico bajos las concentraciones evaluadas, se prosiguió con los ensayos de eflujo para ABCB1 y ABCG2 en el modelo celular de Lucena-1.

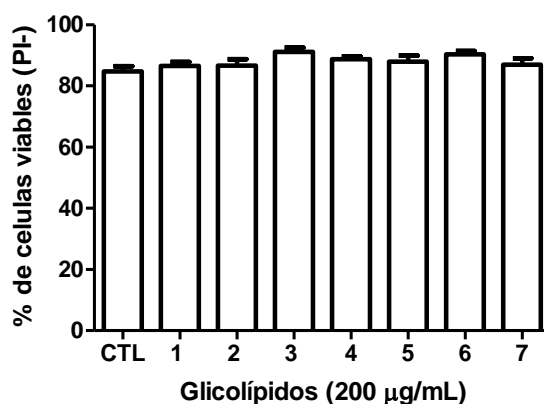
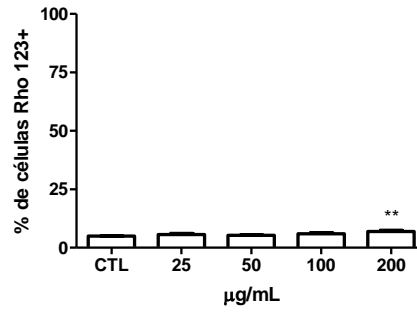
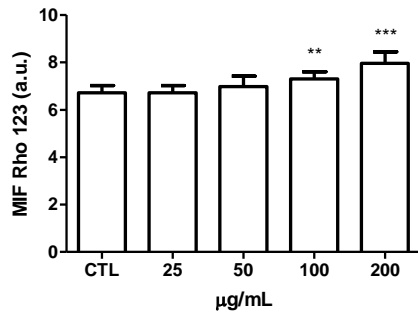


Figura 37. Viabilidad celular determinada por el ensayo PI en el modelo celular de Lucena-1 después del tratamiento con los glicolípidos.

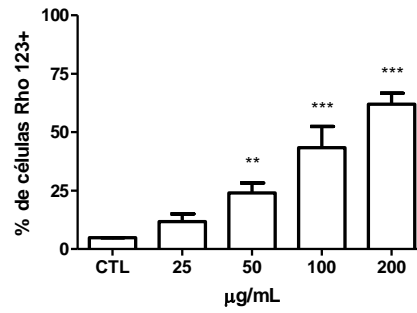
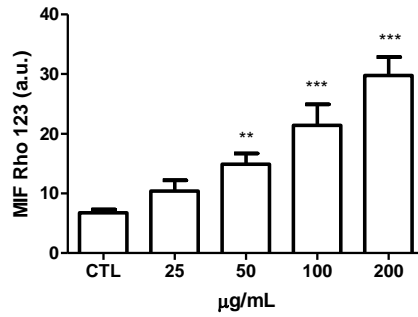
7.4.3 *Proteína transportadora ABCB1*

El sustrato Rho123 se usó para evaluar la actividad funcional del transportador ABCB1, el cual tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática a favor de su gradiente de concentración, acumulándose en el citoplasma y las mitocondrias y también puede transportarse en contra de su gradiente al medio extracelular (K. Da Costa, 2017; Twentyman et al., 1994); y como control positivo se utilizó el inhibidor específico VP a 30 μM . Se observó una moderada actividad de inhibición/modulación del transporte de la proteína transmembrana ABCB1 en presencia de todos los glicolípidos a excepción del compuesto GL-1 (Figura 38). Para GL-1, la MIF fue de 6.71 para el control y entre 6.71 – 7.96 para las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ (valores medios representados en barra, Figura 31).

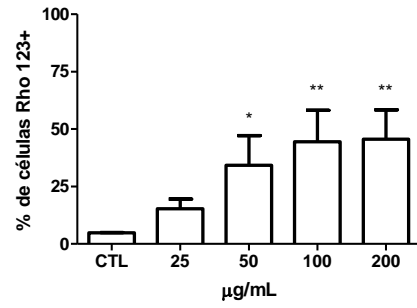
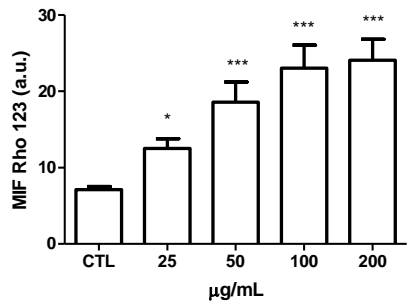
GL-1



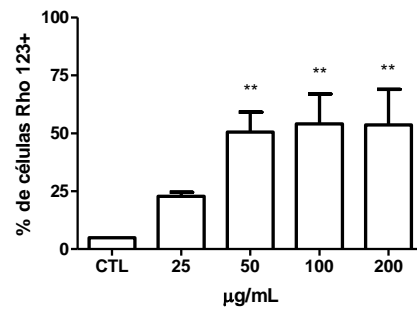
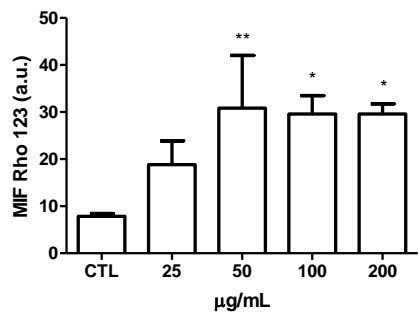
GL-2



GL-3



GL-4



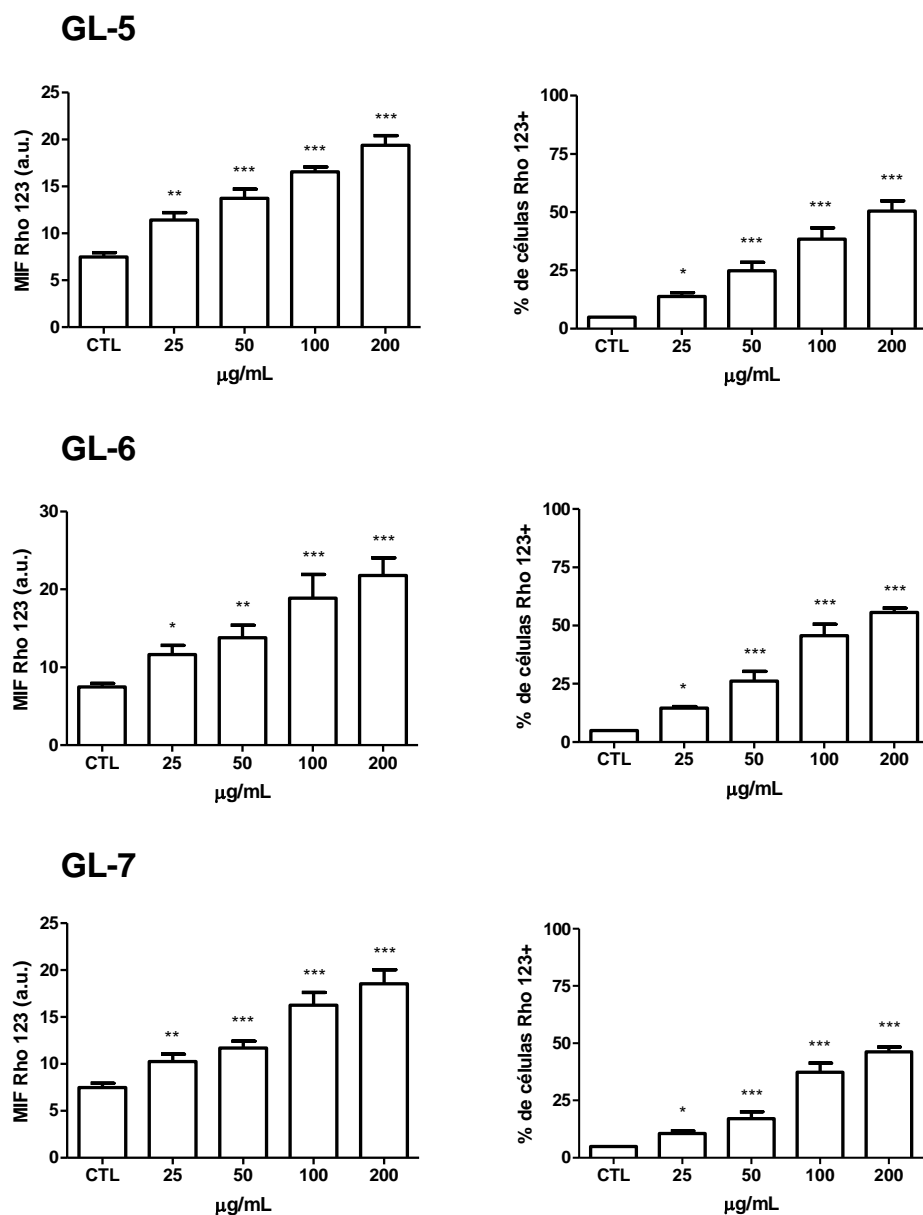


Figura 38. Actividad de inhibición del transporte de ABCB1 en líneas celulares de Lucena-1 por los glicolípidos de *S. filipendula*. El control (CTL) corresponde al inhibidor específico VP a 30 µM.

En cuanto al porcentaje de células, GL-1 no presentó diferencia significativa con respecto al control, con porcentajes de células inhibidas inferiores al 5 %. Al igual que para la proteína ABCB1, la fracción GL-1 no modula la actividad del transportador ABCB1, resultado que, como se mencionó anteriormente, podría deberse a la ausencia de una cadena de ácido graso en su estructura. Sin embargo, los glicolípidos GL-2, GL-3 y GL-4 presentan una MIF entre

10.37 – 18.80, 14.90 – 30.85 para 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, y entre 21.43 – 29.79 para 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, valores superiores a los observados para los compuestos GL-5, GL-6 y GL-7, que al igual que para la proteína ABCB1, no dejan de ser significativos en cuanto a su capacidad para modular el transporte de la proteína ABCB1. Con respecto al porcentaje de células inhibidas, se puede inferir que los fitoconstituyentes aislados de *S. filipendula*, son moduladores naturales de ABCB1, con el potencial de inhibir ($> 20\%$ inhibición) las células a las concentraciones evaluadas. Cabe resaltar que, el GL-4 a diferencia del resto de glicolípidos, alcanzó una capacidad de inhibición del 18 y 45.68 % a una concentración de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y $> 50\%$ para la concentración más alta, infiriendo que es el glicolípido con mayor capacidad para modular la proteína ABCB1.

En este contexto, la proteína ABCB1 involucrada en el fenotipo de la MDR, es el transportador más estudiado desde su descubrimiento en 1972, capaz de expulsar hacia fuera de la célula sustratos principalmente hidrofóbicos, aunque también compuestos xenobióticos neutros o cargados positivamente (Sharom, 2011; Silva et al., 2015). Sin embargo, esta proteína ocasionalmente puede exportar fuera de la célula compuestos anfipáticos, razón por la cual, posiblemente los glicolípidos presentan una capacidad moderada para inhibir la actividad del transportador ABCB1. En este sentido, la unión entre los glicolípidos sulfonados y la proteína ABCB1, se debe a las propiedades generales de los inhibidores específicos de ABCB1. Por ejemplo, su peso molecular considerable, de más de 18 átomos que pueden cubrir más de una región de unión de la proteína, así como también grupos carbonilos, que pueden generar fuertes interacciones entre el ligando y la proteína (Mollazadeh et al., 2018). Un claro ejemplo de ello, se observó en el glicolípido murocoidina V, aislado de plantas terrestres, especialmente de la familia *Convolvulácea*; (Figueroa-González et al., 2012), que aumentó significativamente la acumulación intracelular de Rho 123, y moduló la resistencia a fármacos causada por la sobreexpresión de la proteína ABCB1, en líneas celulares de cáncer de mama.

El efecto modulador que genera los glicolípidos de *S. filipendula* posiblemente, se deba a una competición por la salida, con el sustrato fluorescente Rho 123 (inhibición competitiva) (Amin, 2013; Varma et al., 2003). A diferencia de ABCB1, la unión de ABCB1 con los

glicolípidos sulfonados podría producirse principalmente en los dominios transmembrana, a través de una gran cavidad hidrofóbica, en donde probablemente se den las interacciones de van der Waals con los grupos hidroxilo de la piranosa o uniones nucleofílicas, así como interacciones de enlaces hidrofóbicos con los ácidos grasos que constituyen a los glicolípidos. El resultado de esta unión provoca los cambios conformacionales de la proteína y con ello el transporte del sustrato fuera de la célula (Ambudkar et al., 2003; Ibrahim et al., 2022; Loo & Clarke, 2005; Mollazadeh et al., 2018).

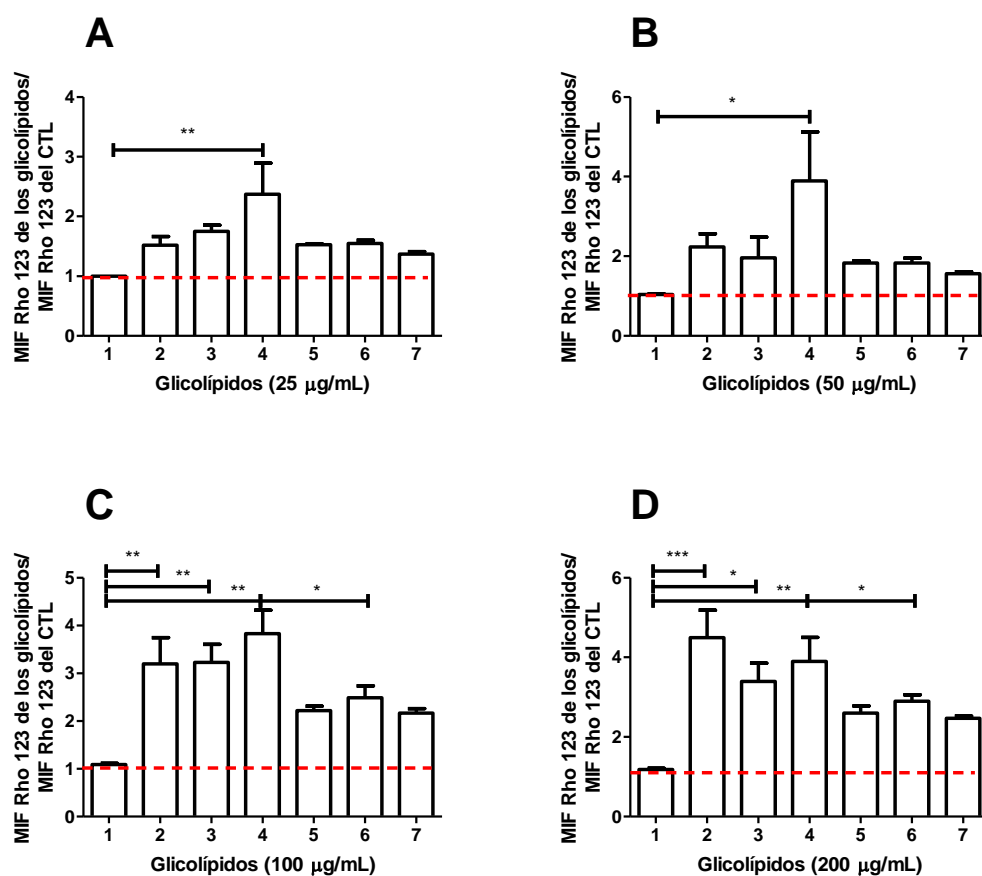


Figura 39. Índice de inhibición del transporte CF (Δ) para las líneas celulares de Lucena-1 en presencia de los glicolípidos a: A) 25 µg/mL, B) 50 µg/mL, C) 100 µg/mL y D) 200 µg/mL.

Finalmente, en la Figura 39 se observan los valores de $\Delta > 1$ de los glicolípidos, confirmando la actividad transportadora y la modulación de la proteína ABCB1, particularmente de los compuestos GL-2, GL-3 y GL-4. Además, se observa que el índice de inhibición de eflujo

de Rho123 (Δ) es directamente proporcional a la concentración del inhibidor, sin embargo, tiende a permanecer constante después de 100 $\mu\text{g/mL}$.

7.4.4 Proteína transportadora ABCG2

La actividad funcional del transportador ABCG2 se determinó usando el sustrato fluorescente MTX, el cual se transporta gracias a su propiedad lipofílica, a través de la membrana celular por un mecanismo de translocación de lípidos transmembrana (*flip-flop*) (Regev et al., 2005); y KO-143 se utilizó como inhibidor específico. Los sulfoglicolípidos de *S. filipendula* mostraron valores de $\Delta \leq 1$, infiriendo que la modulación fue nula frente a la proteína de transmembrana ABCG2 (Figura 40).

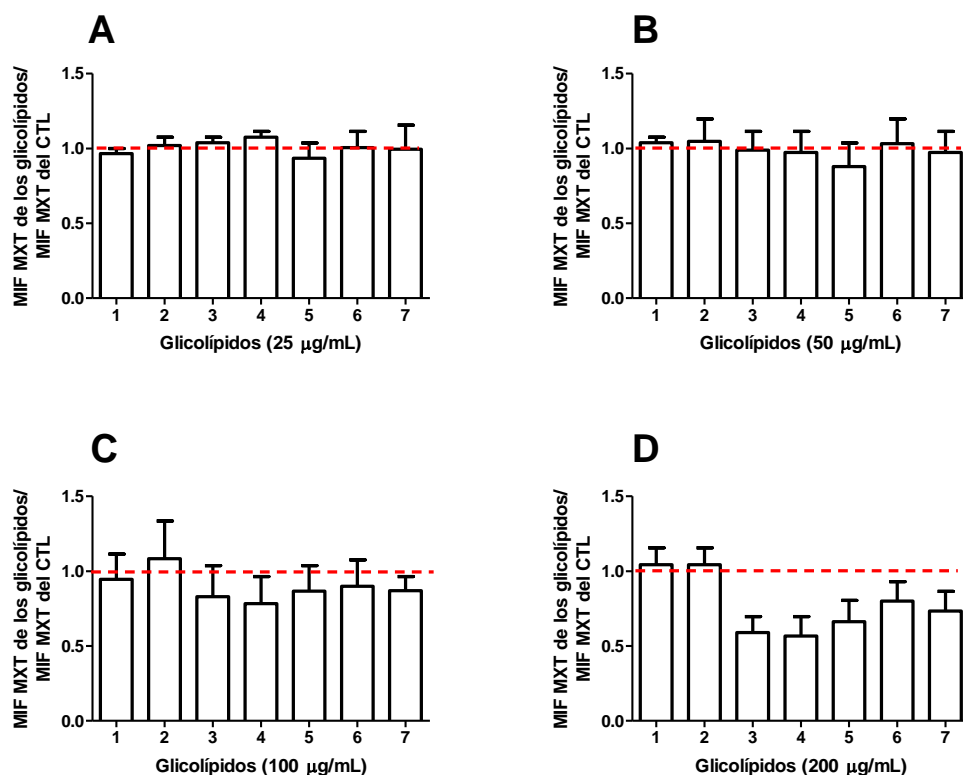


Figura 40. Índice de inhibición de transporte de MTX (Δ) para las líneas celulares de Lucena-1 en presencia de los glicolípidos a: A) 25 $\mu\text{g/mL}$, B) 50 $\mu\text{g/mL}$, C) 100 $\mu\text{g/mL}$ y D) 200 $\mu\text{g/mL}$.

Esta baja afinidad de los glicolípidos hacia el transportador ABCG2, se debe a que esta proteína transporta principalmente metabolitos de tipo esteroides sulfonados o glucoronizados y ácidos orgánicos. Sin embargo, la ABCG2 tiende a presentar una alta

afinidad de sus sitios de unión con sustratos sulfatados, una característica similar presente en la estructura de los glicolípidos de *S. filipendula* y también suele transportar la mayoría de los sustratos de ABCB1 (recordando que esta proteína presentó una actividad de modulación) así como compuestos relativamente hidrófobos (Grigoreva et al., 2022; Keogh, 2012). Por otro lado, se observó una baja expresión del transportador ABCG2 en las células de Lucena-1, ya que no se evidenció un transporte activo del sustrato específico MTX cuando es modulado con KO-143, mostrando solamente un porcentaje de células inhibidas del 10 % aproximadamente. Por esta razón, se propone para futuras investigaciones, evaluar la actividad de inhibición de los glicolípidos sulfonados de *S. filipendula* en un modelo celular resistente que sobreexpresa en mayor medida el transportador ABCG2, como es el caso de las líneas celulares de cáncer de mama.

7.5 Análisis de la reversión de la resistencia inducida por los transportadores ABC

Una vez establecida la capacidad de los glicolípidos para inhibir los transportadores ABC involucradas en el fenotipo de la MDR, se evaluó la reversión de la resistencia (quimiosensibilización) a través de la potencialización de la susceptibilidad de VCR por la fracción GL-4 en células de Lucena-1, a través del ensayo de viabilidad MTT (Figura 41).

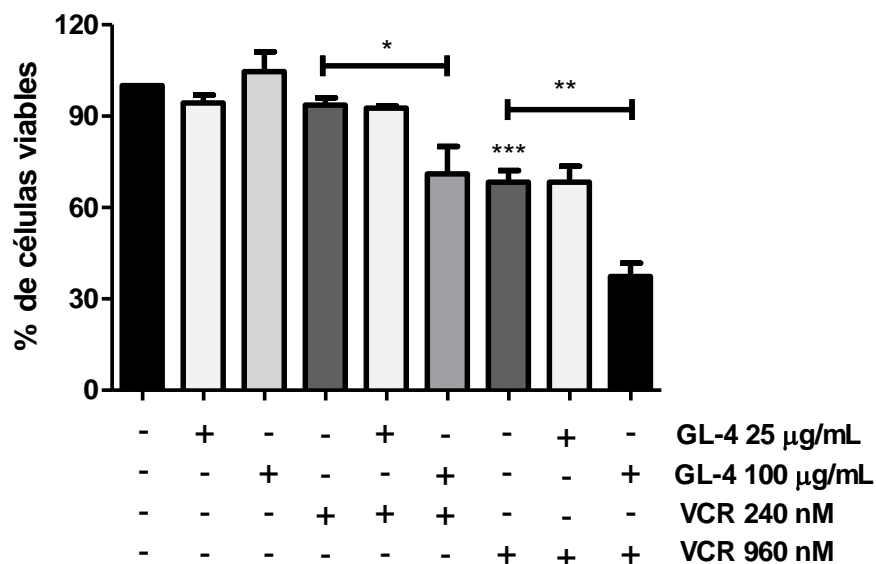


Figura 41. Reversión de la actividad MDR en células de Lucena-1 por la fracción GL-4.

La fracción GL-4 fue seleccionada para el ensayo de reversión, ya que esta mostró una elevada actividad para modular los transportadores ABCB1 y ABCC1, en comparación con el resto de las fracciones de glicolípidos. Para observar con claridad el efecto de reversión de la resistencia en las células MDR de Lucena-1, se utilizaron dos concentraciones de VCR: 240 nM (concentración prácticamente no toxica) con el 93.6 % de viabilidad celular y 960 nM (concentración moderadamente toxica) con el 68 % de viabilidad celular (Figura 41).

En la Figura 41 se evidenció que la fracción GL-4 a 100 µg/mL aumentó significativamente la sensibilización de VCR a 960 y 240 nM, con una disminución de la viabilidad celular del 68 al 37.3 % y del 93.6 al 71 % respectivamente, para la línea celular de Lucena-1. Sin embargo, GL-4 a una concentración de 25 µg/mL, no mostró un efecto de quimiosensibilización, lo anterior podría atribuirse al carácter dosis dependiente para inhibir los transportadores ABC involucrados en el fenotipo de MDR. Finalmente, este ensayo preliminar permitió confirmar la ausencia de citotoxicidad de GL-4 en la línea celular de Lucena-1 a 48 h, con valores de viabilidad celular por encima del 95 % (Figura 41). A partir de estos resultados, es posible inferir que existe un efecto de reversión de la resistencia, ya que GL-4 aumentó la susceptibilidad de VCR (provocada por la inhibición de los transportadores ABC) y, además, se observó que no existió un efecto aditivo o sinérgico entre el compuesto activo y el agente antineoplásico. Este resultado de quimiosensibilización, es similar al reportado para el SQDG aislado de *S. horneri*, el cual aumentó la muerte celular en células de carcinoma de colon Caco-2, cuando fue coadministrado en una concentración de 100 µM, con el fármaco antiproliferativo NaBT a 1.0 mM. Sin embargo, este precedente difiere a esta investigación, ya que se utilizaron células cancerosas no resistentes. Este es la primera investigación que coloca a los glicolípidos de las algas marinas, en particular del género *Sargassum*, como agentes prometedores que revierten el mecanismo de la MDR.

Capítulo 8

Conclusiones

- El presente trabajo de investigación describe el primer estudio químico de los glicolípidos intactos de la especie de macroalga marina *Sargassum filipendula*. Se identificaron 10 glicolípidos de tipo sulfoquinovosilgliceroles de los cuales seis se reportan por primera vez para el género *Sargassum*, siendo las principales diferencias entre ellos, el número de esterificación y los tipos de ácidos grasos que conforman a los glicolípidos.
- El empleo de las diferentes técnicas espectroscópicas, tales como infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), UV-visible y resonancia magnética nuclear mono (^1H y ^{13}C) y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC), en conjunto con la espectrometría de masas por electrospray (MS/ESI), permitieron caracterizar la porción hidrofílica de los glicolípidos como el 6-sulfo- α -quinovosilglicerol e identificar la porción hidrofóbica correspondiente a los ácidos grasos de cadena larga saturados o insaturados (entre 14 - 22 átomos de carbono). Los compuestos S1 y S2 resultaron ser de tipo SQMG, mientras que los compuestos S3 – S10 se identificaron como SQDG.
- Se demostró mediante experimentos de fluorescencia que seis de las fracciones enriquecidas en glicolípidos inhibieron la actividad de los transportadores ABCB1 y ABCC1 de manera dosis-dependiente, mientras que, la fracción GL-1 no mostró ningún efecto inhibitor en dichos transportadores. Las fracciones GL-2, GL-3 y GL-4, mostraron una mayor capacidad de inhibición, entre el 80 y 50 %, de las células con actividad para los transportadores de membrana ABCC1 y ABCB1, respectivamente; lo que sugiere una mayor afinidad por el transportador ABCC1.

Ninguno de las fracciones resultó ser tóxica para el modelo celular de leucemia resistente al agente antitumoral vincristina (Lucena-1).

- Se sugiere que la actividad de inhibición de las fracciones enriquecidas en glicolípidos, está asociada a la diferencia estructural de los sulfoglicolípidos que los componen, particularmente por el tamaño de las cadenas de carbono que conforman a los ácidos grasos, así como al grado de insaturación de la molécula. Estas diferencias pueden afectar la unión de estos glicolípidos a los sitios de transporte y, en consecuencia, su eflujo. Adicionalmente, los SQDG, al ser compuestos orgánicos aniónicos, podrían ser inhibidores competitivos y, posiblemente, una fuente de agentes fitoterapéuticos capaces de revertir el fenotipo MDR en células cancerosas.
- La fracción GL-4 resultó ser el agente no tóxico, que en combinación con el fármaco antineoplásico, mostró una actividad moduladora, potenciando la citotoxicidad de la vincristina en líneas celulares de Lucena-1. Este es el primer reporte de glicolípidos aislados de *S. filipendula*, que se convierten en una clase prometedora de novedosos prototipos más seguros y eficaces para la inhibición de las bombas de eflujo y con ello contrarrestar la resistencia adquirida a los agentes antineoplásicos de uso común en los tratamientos de quimioterapia, disminuyendo sus dosis terapéuticas efectivas y, por lo tanto, los efectos tóxicos indeseables.

Bibliografía

- Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., & El-Halawany, A. M. (2015). P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 45–62. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.008>
- Abdelrheem, D. A., Rahman, A. A., Elsayed, K. N. M., Abd El-Mageed, H. R., Mohamed, H. S., & Ahmed, S. A. (2021). Isolation, characterization, in vitro anticancer activity, dft calculations, molecular docking, bioactivity score, drug-likeness and admet studies of eight phytoconstituents from brown alga *Sargassum platycarpum*. *Journal of Molecular Structure*, 1225, 129245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129245>
- Abdullah, L. N., & Chow, E. K.-H. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-3>
- Alzarea, S. I., Elmaidomy, A. H., Saber, H., Musa, A., Al-Sanea, M. M., Mostafa, E. M., Hendawy, O. M., Youssif, K. A., Alanazi, A. S., Alharbi, M., Sayed, A. M., & Abdelmohsen, U. R. (2021). Potential Anticancer Lipxygenase Inhibitors from the Red Sea-Derived Brown Algae *Sargassum cinereum*: An In-Silico-Supported In-Vitro Study. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040416>
- Ambudkar, S. V, Kim, I.-W., & Sauna, Z. E. (2006). The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 27(5), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.10.010>
- Ambudkar, S. V, Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., & Gottesman, M. M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22(47), 7468–7485. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206948>
- American Cancer Society. (2019). *How Chemotherapy Drugs Work*. <https://www.cancer.org/>
- Amin, M. L. (2013). P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights*, 7, 27–34. <https://doi.org/10.4137/DTI.S12519>
- Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>
- Anil Kumar, K., & Viswanathan, K. (2013). Study of UV Transmission through a Few Edible Oils and Chicken Oil. *Journal of Spectroscopy*, 2013, 540417. <https://doi.org/10.1155/2013/540417>
- Arias-Echeverri, J. P., Zapata-Ramírez, P. A., Ramírez-Carmona, M., Rendón-Castrillón, L.,

- & Ocampo-López, C. (2022). Present and Future of Seaweed Cultivation and Its Applications in Colombia. In *Journal of Marine Science and Engineering* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/jmse10020243>
- Bakos, E., Evers, R., Calenda, G., Tusnády, G. E., Szakács, G., Váradi, A., & Sarkadi, B. (2000). Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *Journal of Cell Science*, *113 Pt 24*, 4451–4461. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4451>
- Bar-Zeev, M., Livney, Y. D., & Assaraf, Y. G. (2017). Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, *31*, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2017.05.002>
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., & Pereda-Miranda, R. (2015). Jalapinoside, a Macrocyclic Bisdesmoside from the Resin Glycosides of *Ipomea purga*, as a Modulator of Multidrug Resistance in Human Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, *78(1)*, 168–172. <https://doi.org/10.1021/np500762w>
- Becher, U. M., Ghanem, A., Tiyerili, V., Fürst, D. O., Nickenig, G., & Mueller, C. F. H. (2011). Inhibition of leukotriene C4 action reduces oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes and impedes remodeling after myocardial injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *50(3)*, 570–577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.013>
- Beekes, M., Lasch, P., & Naumann, D. (2007). Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary Microbiology*, *123(4)*, 305–319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010>
- Blanco-Llamero, C., García-García, P., & Señoráns, F. J. (2021). Combination of Synergic Enzymes and Ultrasounds as an Effective Pretreatment Process to Break Microalgal Cell Wall and Enhance Algal Oil Extraction. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10(8)*. <https://doi.org/10.3390/foods10081928>
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, *92(16)*, 1295–1302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
- Bula-Meyer, G. (2004). Las macroalgas marinas en la agronomía y el uso potencial del *Sargassum* flotante en la producción de fertilizantes en el archipiélago de San Andrés y Providencia, Colombia. *Intropica*, *1(1)*, 91–103. <https://revistas.unimagdalena.edu.co>
- Camacho, O., Mattio, L., Draisma, S. G. A., Fredericq, S., & Diaz-Pulido, G. (2015). Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. nov. and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity*, *13*, 105–130.

- Carreira-Casais, A., Otero, P., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Carpena, M., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 17). <https://doi.org/10.3390/ijerph18179153>
- Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Cruz-Morales, S., Fragoso-Serrano, M., & Pereda-Miranda, R. (2017). HPLC-MS profiling of the multidrug-resistance modifying resin glycoside content of *Ipomoea alba* seeds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 434–439. http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2017000400434&nrm=iso
- Chang, X. (2007). A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(1), 15–37. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9041-7>
- Chen, C.-Y., Wang, S.-H., Huang, C.-Y., Dong, C.-D., Huang, C.-Y., Chang, C.-C., & Chang, J.-S. (2021). Effect of molecular mass and sulfate content of fucoidan from *Sargassum siliquosum* on antioxidant, anti-lipogenesis, and anti-inflammatory activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(4), 359–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.005>
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., & Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5088), 1650–1654. <https://doi.org/10.1126/science.1360704>
- Cole, S. P. C. (2014a). Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 30880–30888. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609248>
- Cole, S. P. C. (2014b). Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135959>
- Cole, S. P. C., & Deeley, R. G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.008>
- Conde, E., Moure, A., & Domínguez, H. (2015). Supercritical CO₂ extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 957–964. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0389-0>
- Cortés, J., Samper-Villarreal, J., & Bernecker, A. (2014). Seasonal phenology of *Sargassum liebmannii* J. Agardh (Fucales, Heterokontophyta) in an upwelling area of the Eastern Tropical Pacific. *Aquatic Botany*, 119, 105–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.08.009>
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Figueroa-González, G., Mendoza-García, A. D.,

- Lorence, A., & Pereda-Miranda, R. (2012). Mammalian multidrug resistance lipopentasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds. *Journal of Natural Products*, 75(9), 1603–1611. <https://doi.org/10.1021/np300414d>
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Fragoso-Serrano, M., Figueroa-González, G., Lorence, A., & Pereda-Miranda, R. (2016). Resin Glycosides from *Ipomoea alba* Seeds as Potential Chemosensitizers in Breast Carcinoma Cells. *Journal of Natural Products*, 79(12), 3093–3104. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00782>
- Cui, H., Zhang, A. J., Chen, M., & Liu, J. J. (2015). ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Current Drug Targets*, 16(12), 1356–1371. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150330113506>
- Cui, Z., Li, Y. S., Liu, H. B., Yuan, D., & Lu, B. R. (2001). Sulfoglycolipid from the marine brown alga *Sargassum hemiphylum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 3(2), 117–122. <https://doi.org/10.1080/10286020108041378>
- da Costa, E., Amaro, H. M., Melo, T., Guedes, A. C., & Domingues, M. R. (2020). Screening for polar lipids, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Gloeothece sp.* lipid extracts pursuing new phytochemicals from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3015–3030. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02173-6>
- Da Costa, K. (2017). *Atividade de transportadores ABC em Trypanosoma cruzi e sua relação com a resistência ao benznidazol*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Daflon-Yunes, N., Pinto-Silva, F. E., Vidal, R. S., Novis, B. F., Berguetti, T., Lopes, R. R. S., Polycarpo, C., & Rumjanek, V. M. (2013). Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 383(1–2), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1761-0>
- Dembitsky, V. M., Rozentsvet, O. A., & Pechenkina, E. E. (1990). Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry*, 29(11), 3417–3421. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85249-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85249-F)
- Dickens, E., & Ahmed, S. (2021). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 39(4), 215–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.01.009>
- Diego A. (2021). Efecto del extracto de *Sargassum buxifolium* (Chauvin)M. J. Wynne. sobre la expresión de Bcl-6 en líneas celulares de Carcinoma decérvix [Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://tesiuam.dgb.unam.mx/>
- Doyle, L. A., & Ross, D. D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 22(47), 7340–7358. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206938>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

- Elmore, L. W., Greer, S. F., Daniels, E. C., Saxe, C. C., Melner, M. H., Krawiec, G. M., Cance, W. G., & Phelps, W. C. (2021). Blueprint for cancer research: Critical gaps and opportunities. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(2), 107–139. <https://doi.org/10.3322/caac.21652>
- Fidai, Y. A., Dash, J., Tompkins, E. L., & Tonon, T. (2020). A systematic review of floating and beach landing records of *Sargassum* beyond the Sargasso Sea. *Environmental Research Communications*, 2(12), 122001. <https://doi.org/10.1088/2515-7620/abd109>
- Figueroa-González, G., Jacobo-Herrera, N., Zentella-Dehesa, A., & Pereda-Miranda, R. (2012). Reversal of multidrug resistance by morning glory resin glycosides in human breast cancer cells. *Journal of Natural Products*, 75(1), 93–97. <https://doi.org/10.1021/np200864m>
- Fitch K and Kemker C. (2014). *Algae, Phytoplankton and Chlorophyll. Fundamentals of Environmental Measurements*. Fundamentals of Environmental Measurements.
- Folch, J. M. L., Lees, M. P., & Stanley, G. H. A. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Fomenko, S. E., Kushnerova, N. F., Sprygin, V. G., Drugova, E. S., Lesnikova, L. N., Merzlyakov, V. Y., & Momot, T. V. (2019). Lipid Composition, Content of Polyphenols, and Antiradical Activity in Some Representatives of Marine Algae. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(6), 942–949. <https://doi.org/10.1134/S1021443719050054>
- Food and Agriculture Organization. (2020). *The state of world fisheries and aquaculture 2020: sustainability in action*. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Fox, E., & Bates, S. E. (2007). Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 7(4), 447–459. <https://doi.org/10.1586/14737140.7.4.447>
- Fusconi, R., Maria Nascimento Assunção, R., de Moura Guimarães, R., Rodrigues Filho, G., & Eduardo da Hora Machado, A. (2010). Exopolysaccharide produced by *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 in GYM commercial medium and sugarcane molasses alternative medium: FT-IR study and emulsifying activity. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 403–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.023>
- Garcia-Vaquero, M., Sweeney, T., O'Doherty, J., & Rajauria, G. (2021). Recent Advances in the Use of Greener Extraction Technologies for the Recovery of Valuable Bioactive Compounds from Algae. In *Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing* (pp. 96–122). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119542650.ch4>
- Gavio, B., Rincón, N., & Santos, A. (2015). Massive quantities of pelagic *Sargassum* on the shores of San Andres island, Southwestern Caribbean. *Acta Biológica Colombiana*, 20, 239–241. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-

548X2015000100027&nrm=iso

- Gavio, B., & Santos, A. (2018). Floating *Sargassum* in serranilla bank, caribbean colombia, may jeopardize the race to the ocean of baby sea turtles. *Acta Biol̃textthreesuperiorgica Colombiana*, 23, 311–314. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2018000300311&nrm=iso
- Graf, G. A., Li, W.-P., Gerard, R. D., Gelissen, I., White, A., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5), 659–669. <https://doi.org/10.1172/JCI16000>
- Grigoreva, T. A., Sagaidak, A. V., Novikova, D. S., & Tribulovich, V. G. (2022). Implication of ABC transporters in non-proliferative diseases. *European Journal of Pharmacology*, 935, 175327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175327>
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, 48(5), 1057–1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Gupta, D., Silva, M., Radziun, K., Martinez, D. C., Hill, C. J., Marshall, J., Hearnden, V., Puertas-Mejia, M. A., & Reilly, G. C. (2020). Fucoidan Inhibition of Osteosarcoma Cells Is Species and Molecular Weight Dependent. *Marine Drugs*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/md18020104>
- Hakim, M. M., & Patel, I. C. (2020). A review on phytoconstituents of marine brown algae. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00147-6>
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Hossain, Z., Kurihara, H., Hosokawa, M., & Takahashi, K. (2005). Growth inhibition and induction of differentiation and apoptosis mediated by sodium butyrate in Caco-2 cells with algal glycolipids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 41(5–6), 154–159. <https://doi.org/10.1290/0409058.1>
- Huang, C.-Y., Huang, C.-Y., Yang, C.-C., Lee, T.-M., & Chang, J.-S. (2022). Hair growth-promoting effects of *Sargassum glaucescens* oligosaccharides extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 134, 104307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtice.2022.104307>
- Huang, L., Wu, C., Gao, H., Xu, C., Dai, M., Huang, L., Hao, H., Wang, X., & Cheng, G. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520>
- Ibrahim, M. A. A., Abdeljawaad, K. A. A., Abdelrahman, A. H. M., Jaragh-Alhadad, L. A.,

- Oraby, H. F., Elkaeed, E. B., Mekhemer, G. A. H., Gabr, G. A., Shawky, A. M., Sidhom, P. A., Soliman, M. E. S., Moustafa, M. F., Paré, P. W., & Hegazy, M.-E. F. (2022). Exploring Natural Product Activity and Species Source Candidates for Hunting ABCB1 Transporter Inhibitors: An In Silico Drug Discovery Study. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103104>
- Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(11), 463–468. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90489-v](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90489-v)
- Islam, N., Wang, H., Maqbool, F., & Ferro, V. (2019). In Vitro Enzymatic Digestibility of Glutaraldehyde-Crosslinked Chitosan Nanoparticles in Lysozyme Solution and Their Applicability in Pulmonary Drug Delivery. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071271>
- Janice Ann Gabriel. (2007). *The biology of cancer* (Jhon Wiley).
- Jaramillo, A. C., Saig, F. Al, Cloos, J., Jansen, G., & Peters, G. J. (2018). How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resistance*, 1(1), 6–29. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.02>
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., & Keppler, D. (1996). Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Research*, 56(5), 988–994.
- Jones, P. M., & George, A. M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(6), 682–699. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3336-9>
- Kalsum, L., Dewi, E., Margarety, E., & Ningsih, A. S. (2019). Lipid Extraction from Microalgae *Spirulina Platensis* for Raw Materials of Biodiesel. *Journal of Physics: Conference Series*, 1167(1), 12051. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1167/1/012051>
- Keogh, J. P. (2012). Membrane transporters in drug development. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 63, 1–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398339-8.00001-X>
- Kerr, I. D., Haider, A. J., & Gelissen, I. C. (2011). The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *British Journal of Pharmacology*, 164(7), 1767–1779. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01177.x>
- Kim, Y.-H., Park, S., Kim, M. H., Choi, Y.-K., Yang, Y.-H., Kim, H. J., Kim, H., Kim, H.-S., Song, K.-G., & Lee, S. H. (2013). Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [Bmim][MeSO₄]. *Biomass and Bioenergy*, 56, 99–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.022>
- Kim, Y. H., Kim, E.-H., Lee, C., Kim, M.-H., & Rho, J.-R. (2007). Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Lipids*, 42(4), 395–399. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3035-7>

- Krohn, M., Lange, C., Hofrichter, J., Scheffler, K., Stenzel, J., Steffen, J., Schumacher, T., Brüning, T., Plath, A.-S., Alfen, F., Schmidt, A., Winter, F., Rateitschak, K., Wree, A., Gsponer, J., Walker, L. C., & Pahnke, J. (2011). Cerebral amyloid- β proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(10), 3924–3931. <https://doi.org/10.1172/JCI57867>
- Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2010). Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry*, *120*(3), 749–757. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.006>
- Laberge, R.-M., Karwatsky, J., Lincoln, M. C., Leimanis, M. L., & Georges, E. (2007). Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, *73*(11), 1727–1737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.02.005>
- Laurent, G., & Jaffrézou, J.-P. (2001). Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood*, *98*(4), 913–924. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V98.4.913>
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *204*(3), 216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>
- Leslie, E. M., Haimeur, A., & Waalkes, M. P. (2004). Arsenic Transport by the Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1): EVIDENCE THAT A TRI-GLUTATHIONE CONJUGATE IS REQUIRED*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(31), 32700–32708. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M404912200>
- Ling, V., & Thompson, L. H. (1974). Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *Journal of Cellular Physiology*, *83*(1), 103–116. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040830114>
- Loe, D. W., Almquist, K. C., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (1996). Multidrug Resistance Protein (MRP)-mediated Transport of Leukotriene C4 and Chemotherapeutic Agents in Membrane Vesicles: DEMONSTRATION OF GLUTATHIONE-DEPENDENT VINCRISTINE TRANSPORT (*). *Journal of Biological Chemistry*, *271*(16), 9675–9682. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9675>
- Logvinov, S., Gerasimenko, N., Esipov, A., & Denisenko, V. A. (2015). Examination of the structures of several glycerolipids from marine macroalgae by NMR and GC-MS. *Journal of Phycology*, *51*(6), 1066–1074. <https://doi.org/10.1111/jpy.12338>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, *3*(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Loo, T. W., & Clarke, D. M. (1999). The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(35), 24759–24765. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24759>

- Loo, T. W., & Clarke, D. M. (2005). Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through “gates”? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(2), 419–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.134>
- Luna-Pérez, Y., Ríos-López, L. G., Otero-Tejada, E. L., Mejía-Giraldo, J. C., & Puertas-Mejía, M. Á. (2023). *Sargassum filipendula*, a Source of Bioactive Compounds with Antioxidant and Matrix Metalloproteinases Inhibition Activities In Vitro with Potential Dermocosmetic Application. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antiox12040876>
- Ma, A.-C., Chen, Z., Wang, T., Song, N., Yan, Q., Fang, Y.-C., Guan, H.-S., & Liu, H.-B. (2014). Isolation of the molecular species of monogalactosyldiacylglycerols from brown edible seaweed *Sargassum horneri* and their inhibitory effects on triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 11157–11162. <https://doi.org/10.1021/jf503068n>
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., van De Vijver, M. J., Scheper, R. J., & Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*, 61(8), 3458–3464.
- Mao, Q., Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (1999). ATPase activity of purified and reconstituted multidrug resistance protein MRP1 from drug-selected H69AR cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1461(1), 69–82. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00150-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00150-9)
- Mattio, L., Anderson, R. J., & Bolton, J. J. (2015). A revision of the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) in South Africa. *South African Journal of Botany*, 98, 95–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.008>
- Milledge, J. J., & Harvey, P. J. (2016). Golden Tides: Problem or Golden Opportunity? The Valorisation of *Sargassum* from Beach Inundations. In *Journal of Marine Science and Engineering* (Vol. 4, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/jmse4030060>
- Mo, W., & Zhang, J.-T. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3 1, 1–27.
- Mollazadeh, S., Sahebkar, A., Hadizadeh, F., Behravan, J., & Arabzadeh, S. (2018). Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sciences*, 214, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>
- Moore, A., & Pinkerton, R. (2009). Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? *Pediatric Blood & Cancer*, 53(7), 1180–1187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pbc.22161>
- Motta, L., & S, R. (2020). *Evaluación del potencial del uso de las algas de arribazon conocidas como Sargazo (Sargassum spp.)*. Fundación Universidad de América, Bogotá D.C.

- Murata, N., & Siegenthaler, P.-A. (2006). *Lipids in Photosynthesis: An Overview* (Vol. 6, pp. 1–20). https://doi.org/10.1007/0-306-48087-5_1
- National Cancer Institute. (2022). *Cancer Basics*. <https://www.cancer.gov>
- Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., & Sugimoto, Y. (2009). Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.07.003>
- Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., & Sarkadi, B. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *285*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5130>
- Palmeira, A., Sousa, E., Vasconcelos, M. H., & Pinto, M. M. (2012). Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(13), 1946–2025. <https://doi.org/10.2174/092986712800167392>
- Pan, S.-T., Li, Z.-L., He, Z.-X., Qiu, J.-X., & Zhou, S.-F. (2016). Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *43*(8), 723–737. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12581>
- Partanen, T., Monge, P., & Wesseling, C. (2009). Causas y prevención del cáncer ocupacional. *Acta Médica Costarricense*, *51*, 195–205. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022009000400003&nrm=iso
- Patel, A., Matsakas, L., Sartaj, K., & Chandra, R. (2020). *Chapter 2 - Extraction of lipids from algae using supercritical carbon dioxide* (Inamuddin, A. M. Asiri, & A. M. B. T.-G. S. P. for C. and E. E. and S. Isloor (eds.); pp. 17–39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817388-6.00002-7>
- Plouguerné, E., de Souza, L. M., Sasaki, G. L., Cavalcanti, J. F., Villela Romanos, M. T., da Gama, B. A. P., Pereira, R. C., & Barreto-Bergter, E. (2013). Antiviral Sulfoquinovosyl diacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Marine Drugs*, *11*(11), 4628–4640. <https://doi.org/10.3390/md11114628>
- Plouguerné, E., de Souza, L. M., Sasaki, G. L., Hellio, C., Trepos, R., da Gama, B. A. P., Pereira, R. C., & Barreto-Bergter, E. (2020). Glycoglycerolipids From *Sargassum vulgare* as Potential Antifouling Agents. *Frontiers in Marine Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00116>
- Plouguerné, E., Ioannou, E., Georgantea, P., Vagias, C., Roussis, V., Hellio, C., Kraffe, E., & Stiger-Pouvreau, V. (2010). Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, *12*(1), 52–61. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9199-9>
- Puente, Javier; Velazco, G. (2019). *Cáncer*. <https://seom.org>

- Qian, Y. M., Song, W. C., Cui, H., Cole, S. P., & Deeley, R. G. (2001). Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6404–6411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008251200>
- Raguz, S., & Yagüe, E. (2008). Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *British Journal of Cancer*, 99(3), 387–391. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604510>
- Rahelivao, M. P., Gruner, M., Andriamanantoanina, H., Bauer, I., & Knölker, H.-J. (2015). Brown Algae (Phaeophyceae) from the Coast of Madagascar: preliminary Bioactivity Studies and Isolation of Natural Products. *Natural Products and Bioprospecting*, 5(5), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0068-0>
- Rebucci, M., & Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1219–1226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.017>
- Regev, R., Yeheskely-Hayon, D., Katzir, H., & Eytan, G. D. (2005). Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 70(1), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.03.032>
- Renes, J., De Vries, E. G. E., Nienhuis, E. F., Jansen, P. L. M., & Müller, M. (1999). ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *British Journal of Pharmacology*, 126(3), 681–688. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702360>
- Robey, R. W., To, K. K. K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., & Bates, S. E. (2009). ABCG2: A perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(1), 3–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.003>
- Rosenberg, M. F., Oleschuk, C. J., Wu, P., Mao, Q., Deeley, R. G., Cole, S. P. C., & Ford, R. C. (2010). Structure of a human multidrug transporter in an inward-facing conformation. *Journal of Structural Biology*, 170(3), 540–547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.01.011>
- Ruiz, I., Oliva, M., Soto, M., Sarabia, M., Hernández, A., Mendoza, J., & Garibay, E. (2016). Algas marinas: potencial fuente de compuestos contra el cáncer. *Revista Ciencias*. <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/>
- Rumjanek, V. M., Trindade, G. S., Wagner-Souza, K., Meletti-De-Oliveira, M. C., Marques-Santos, L. F., Maia, R. C., & Capella, M. A. M. (2001). Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 73(1), 57–69. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652001000100007>
- Rushdi, M. I., Abdel-Rahman, I. A. M., Saber, H., Attia, E. Z., Abdelraheem, W. M., Madkour, H. A., Hassan, H. M., Elmaidomy, A. H., & Abdelmohsen, U. R. (2020). Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*. *RSC Advances*, 10(42), 24951–24972. <https://doi.org/10.1039/d0ra03576a>

- Rusoff, I. I., Platt, J. R., Klevens, H. B., & Burr, G. O. (1945). Extreme Ultraviolet Absorption Spectra of the Fatty Acids^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, *67*(4), 673–678. <https://doi.org/10.1021/ja01220a051>
- Sanina, N. M., Goncharova, S. N., & Kostetsky, E. Y. (2004). Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes. *Phytochemistry*, *65*(6), 721–730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.01.013>
- Sanina, N. M., Goncharova, S. N., & Kostetsky, E. Y. (2008). Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes. *Phytochemistry*, *69*(7), 1517–1527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.014>
- Sanina, N. M., Kostetsky, E. Y., Shnyrov, V. L., Tsybulsky, A. V, Novikova, O. D., Portniagina, O. Y., Vorobieva, N. S., Mazeika, A. N., & Bogdanov, M. V. (2012). The influence of monogalactosyldiacylglycerols from different marine macrophytes on immunogenicity and conformation of protein antigen of tubular immunostimulating complex. *Biochimie*, *94*(4), 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.009>
- Santana, A., Jesus, S., Larrayoz, M. A., & Filho, R. M. (2012). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Algal Lipids for the Biodiesel Production. *Procedia Engineering*, *42*, 1755–1761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.569>
- Santos, J., Guihéneuf, F., Fleming, G., Chow, F., & Stengel, D. (2019). Temporal stability in lipid classes and fatty acid profiles of three seaweed species from the north-eastern coast of Brazil. *Algal Research*, *41*, 101572. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101572>
- Sharom, F. J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in Biochemistry*, *50*, 161–178. <https://doi.org/10.1042/bse0500161>
- Sierra, L. S., Dixon, C. K., & Wilken, L. R. (2017). Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Research*, *25*, 149–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.004>
- SigmaAldrich. (2021). *IR Spectrum Table & Chart*. Sigma Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, *149*, 1–123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- Sreekumar, P. G., Spee, C., Ryan, S. J., Cole, S. P. C., Kannan, R., & Hinton, D. R. (2012). Mechanism of RPE cell death in α -crystallin deficient mice: a novel and critical role for MRP1-mediated GSH efflux. *PLoS One*, *7*(3), e33420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033420>
- Stacy, A. E., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. (2013). Molecular pharmacology of ABCG2

- and its role in chemoresistance. *Molecular Pharmacology*, 84(5), 655–669. <https://doi.org/10.1124/mol.113.088609>
- Tagliapietra, B. L., & Clerici, M. T. P. S. (2023). Brown algae and their multiple applications as functional ingredient in food production. *Food Research International*, 167, 112655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112655>
- Terme, N., Boulho, R., Kendel, M., Kucma, J.-P., Wielgosz-Collin, G., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2017). Selective extraction of lipid classes from *Solieria chordalis* and *Sargassum muticum* using supercritical carbon dioxide and conventional solid–liquid methods. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2513–2519. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1084-8>
- Tsai, C.-J., & Sun Pan, B. (2012). Identification of sulfoglycolipid bioactivities and characteristic fatty acids of marine macroalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), 8404–8410. <https://doi.org/10.1021/jf302241d>
- Twentyman, P. R., Rhodes, T., & Rayner, S. (1994). A comparison of rhodamine 123 accumulation and efflux in cells with P-glycoprotein-mediated and MRP-associated multidrug resistance phenotypes. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 30A(9), 1360–1369. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)90187-2](https://doi.org/10.1016/0959-8049(94)90187-2)
- Uribe-Martínez, A., Berriel-Bueno, D., Chávez, V., Cuevas, E., Almeida, K. L., Fontes, J. V. H., van Tussenbroek, B. I., Mariño-Tapia, I., Liceaga-Correa, M. de los Á., Ojeda, E., Castañeda-Ramírez, D. G., & Silva, R. (2022). Multiscale distribution patterns of pelagic rafts of sargasso (*Sargassum spp.*) in the Mexican Caribbean (2014–2020). *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.920339>
- Varma, M. V. S., Ashokraj, Y., Dey, C. S., & Panchagnula, R. (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological Research*, 48(4), 347–359. [https://doi.org/10.1016/s1043-6618\(03\)00158-0](https://doi.org/10.1016/s1043-6618(03)00158-0)
- Wakabayashi, K., Tamura, A., Saito, H., Onishi, Y., & Ishikawa, T. (2006). Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology. *Drug Metabolism Reviews*, 38(3), 371–391. <https://doi.org/10.1080/03602530600727947>
- Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2015). The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(2), 220–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.012>
- Westlake, C. J., Cole, S. P. C., & Deeley, R. G. (2005). Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), 2483–2492. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1113>
- World Health Organization. (2019). *International Classification of Diseases for Oncology, 3rd Edition (ICD-O-3)*.

- World Health Organization. (2022). *World Health Organization*. <https://www.who.int/>
- Wu, C.-P., Hsieh, C.-H., & Wu, Y.-S. (2011). The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 1996–2011. <https://doi.org/10.1021/mp200261n>
- Xiao, Y., Ji, W.-S., Jin, W.-K., Wen, P., Shan, L.-H., Hou, Z.-R., Li, X.-H., Zhou, X.-L., Liu, Y.-J., Xu, J.-B., & Gao, F. (2023). Synthesis, antiproliferative and anti-MDR activities of lathyrane diterpene derivatives based on configuration inversion strategy. *Bioorganic Chemistry*, 131, 106329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106329>
- Yang, A.-K., Zhou, Z.-W., Wei, M. Q., Liu, J.-P., & Zhou, S.-F. (2010). Modulators of multidrug resistance associated proteins in the management of anticancer and antimicrobial drug resistance and the treatment of inflammatory diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(17), 1732–1756. <https://doi.org/10.2174/156802610792928040>
- Yende, S. R., Harle, U. N., & Chaugule, B. B. (2014). Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. *Pharmacognosy Reviews*, 8(15), 1–7. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125514>
- Yoshioka, M., Sagara, H., Takahashi, F., Harada, N., Nishio, K., Mori, A., Ushio, H., Shimizu, K., Okada, T., Ota, M., Ito, Y. M., Nagashima, O., Atsuta, R., Suzuki, T., Fukuda, T., Fukuchi, Y., & Takahashi, K. (2009). Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(1), L30-6. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00026.2008>
- Zghaibi, N., Omar, R., Mustapa Kamal, S. M., Awang Biak, D. R., & Harun, R. (2019). Microwave-Assisted Brine Extraction for Enhancement of the Quantity and Quality of Lipid Production from Microalgae *Nannochloropsis sp.* In *Molecules* (Vol. 24, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193581>
- Zhang, Y.-K., Wang, Y.-J., Gupta, P., & Chen, Z.-S. (2015). Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *The AAPS Journal*, 17(4), 802–812. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9757-1>
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, J. A., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Cao, H., Xiao, J., & Barba, F. J. (2022). Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*, 384, 132236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132236>
- Zhou, S.-F., Wang, L.-L., Di, Y. M., Xue, C. C., Duan, W., Li, C. G., & Li, Y. (2008). Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Current Medicinal Chemistry*, 15(20), 1981–2039. <https://doi.org/10.2174/092986708785132870>
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., & Sorrentino, B. P. (2001). The

ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine*, 7(9), 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1028>

Zianni, R., Bianco, G., Lelario, F., Losito, I., Palmisano, F., & Cataldi, T. R. I. (2013). Fatty acid neutral losses observed in tandem mass spectrometry with collision-induced dissociation allows regiochemical assignment of sulfoquinovosyl-diacylglycerols. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 48(2), 205–215. <https://doi.org/10.1002/jms.3149>

Anexos

Anexo 1. Espectros de RMN bidimensionales de los glicolípidos de *S. filipendula*.

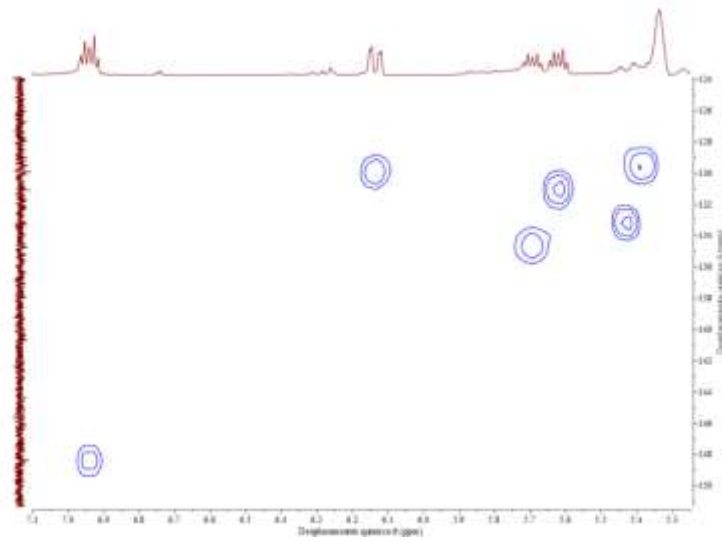


Figura 42. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.

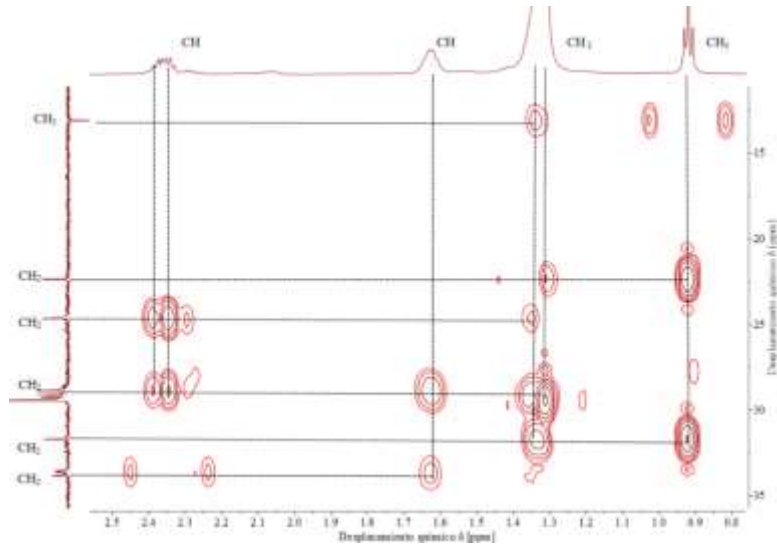


Figura 43. Espectro HMBC del glicolípido GL-4.

Anexo 2. Ensayo de viabilidad celular de los glicolípidos de *S. filipendula*.

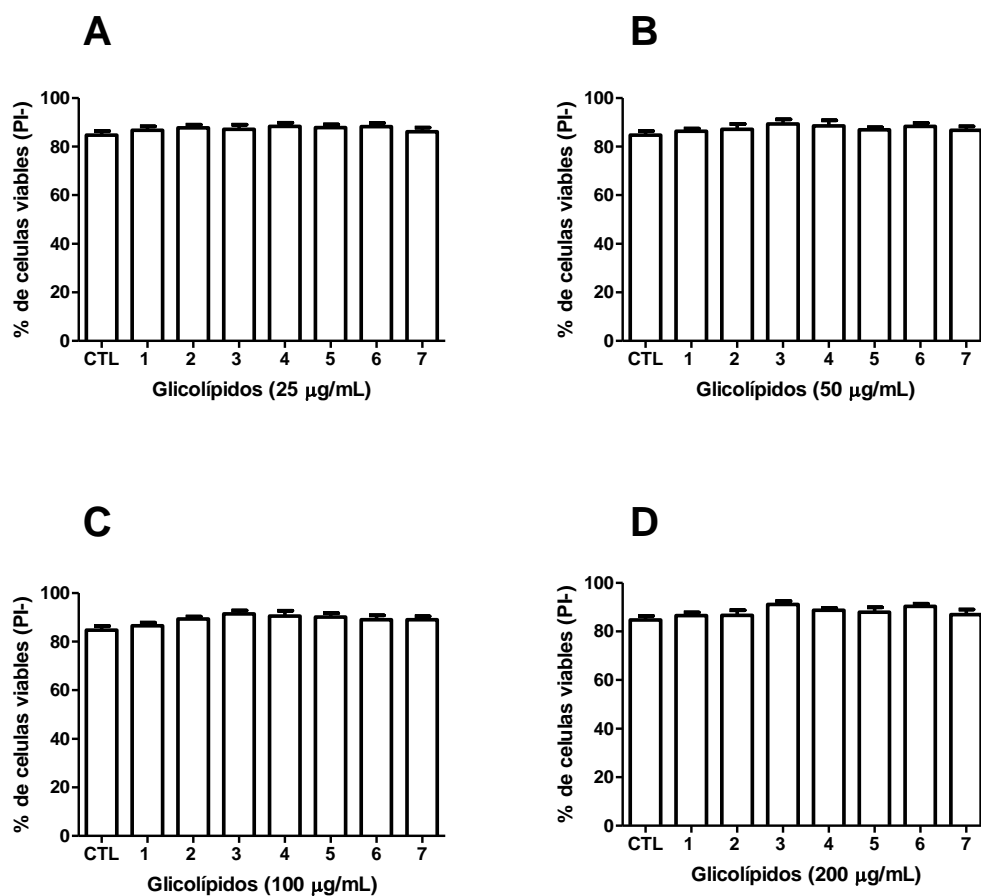


Figura 44. Viabilidad celular determinada por el ensayo PI en el modelo celular de Lucena-1. Ensayo evaluado para los glicolípidos de *S. filipendula* a las concentraciones de: A) 25 µg/mL, B) 50 µg/mL, C) 100 µg/mL y D) 200 µg/mL.

Anexo 3. Perfiles característicos de MS en tándem (MS¹) obtenidos de glicolípidos de tipo SQMG y SQDG aislados de *S. filipendula*.

La fragmentación indicó diferencias en las longitudes de las cadenas de ácidos grasos y se representaron las estructuras putativas para cada especie de sulfoglicolípido.

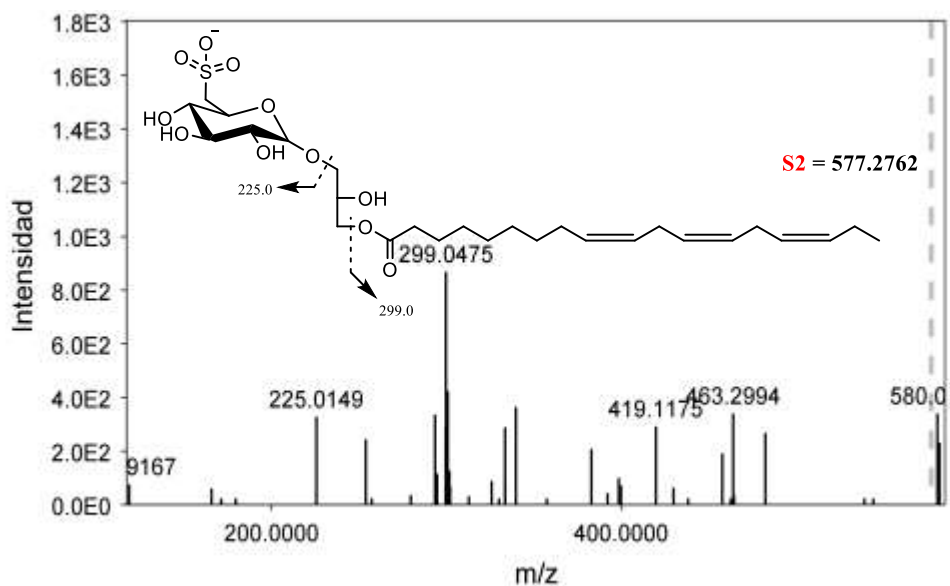


Figura 45. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 577.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-mono-2-O-(9,12,15-octadecatrienol)-3-O-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

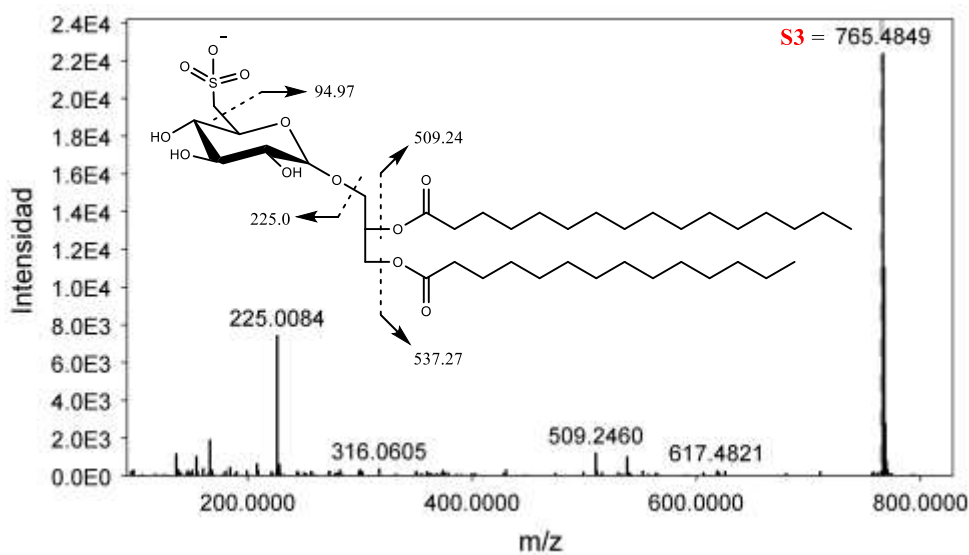


Figura 46. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 765.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-O-tetradecanoil,2-O-hexadecanoil-3-O-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

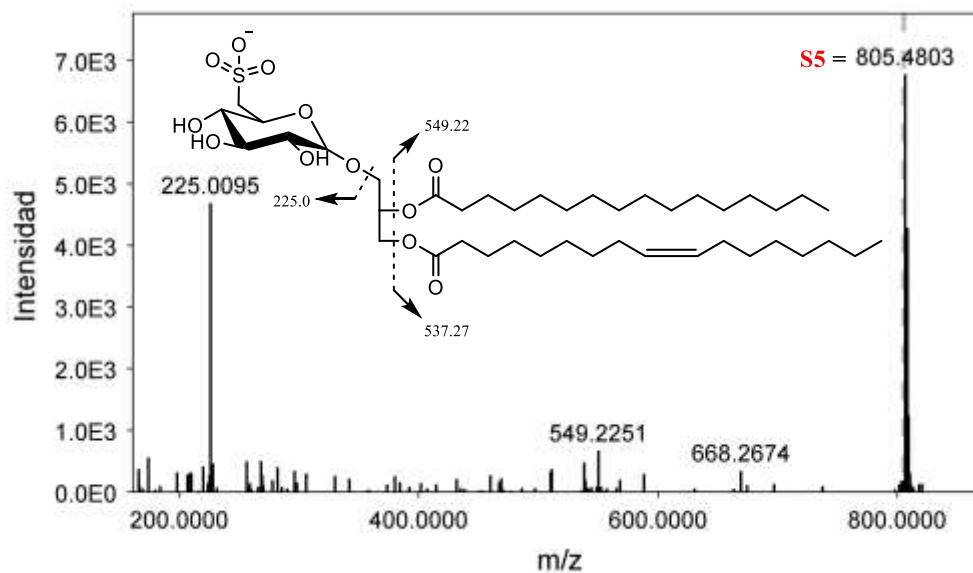


Figura 47. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 805.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-*O*-(9-heptadecenoil),2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

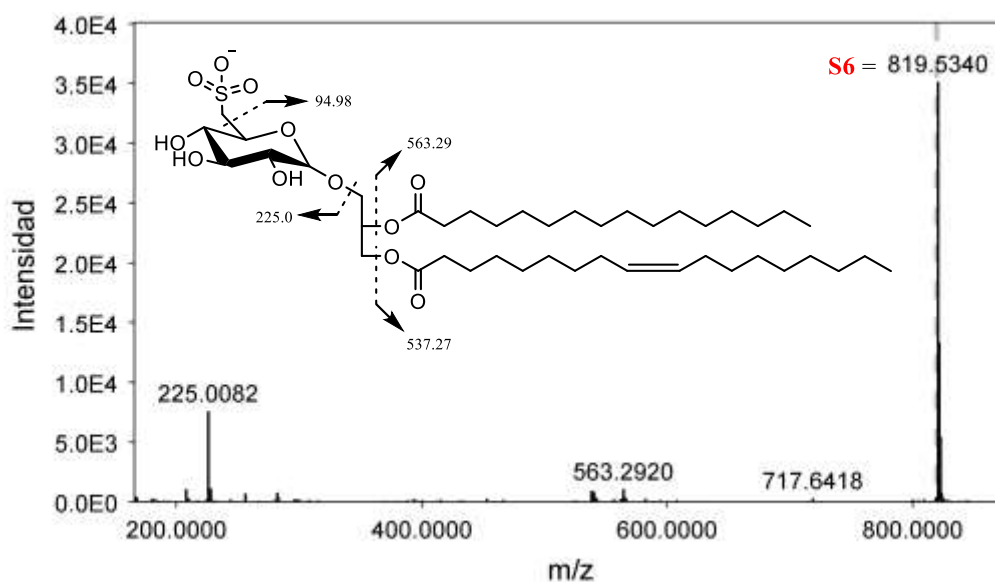


Figura 48. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 819.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-*O*-(9-octadecenoil),2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

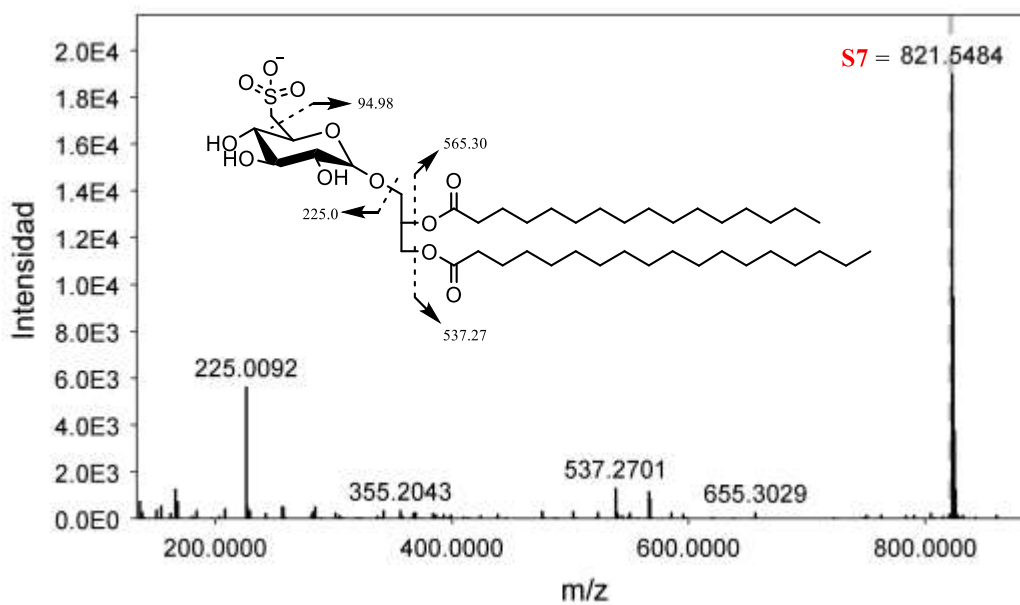


Figura 49. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 821.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-*O*-octadecanoil,2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

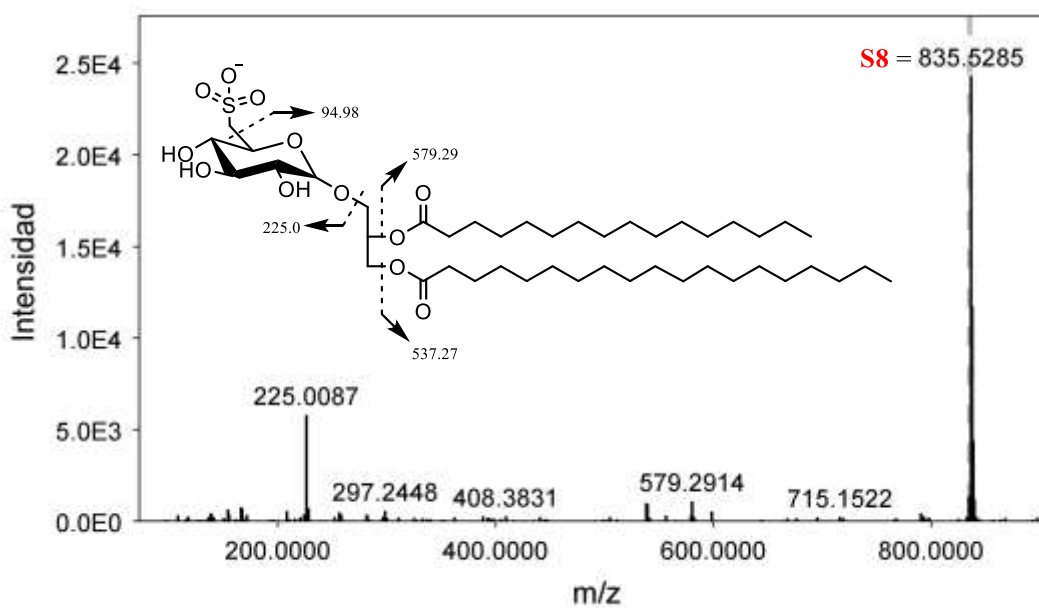


Figura 50. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 835.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-*O*-nonadecanoil,2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

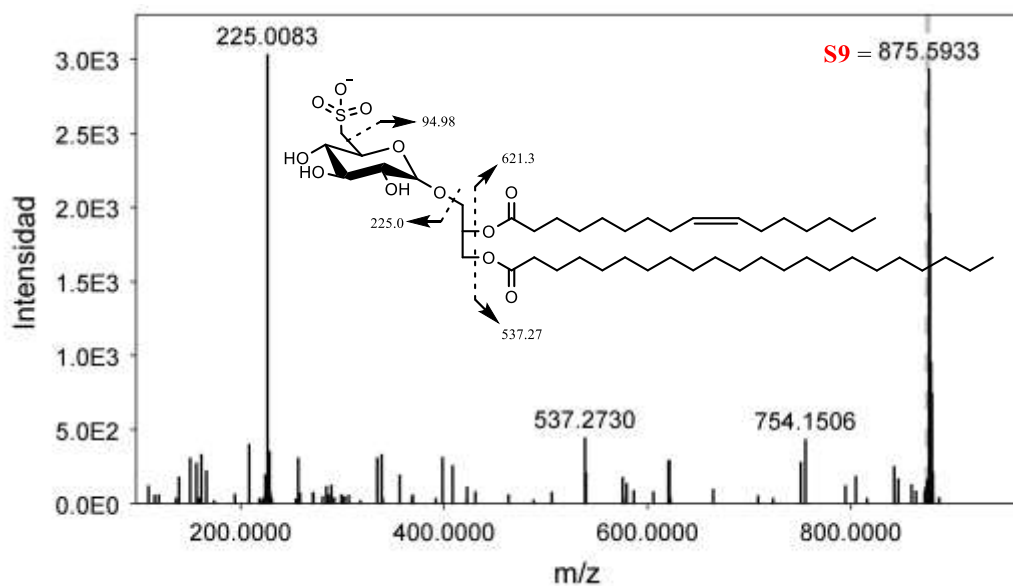


Figura 51. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 875.5 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-*O*-docosanoil,2-*O*-(9-hexadecenoil)-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.

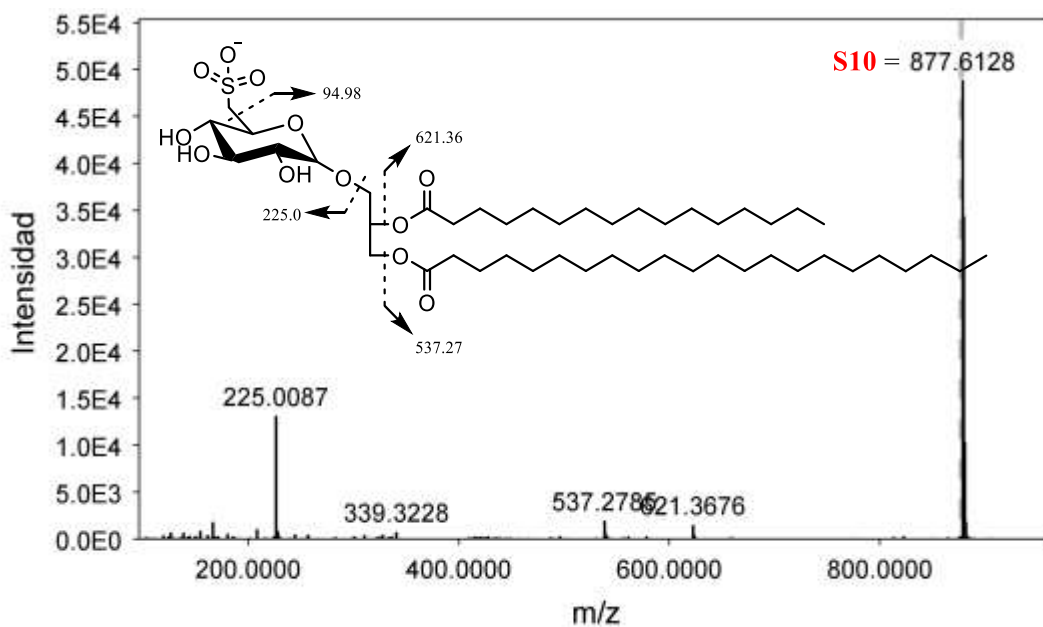


Figura 52. Espectro de MS¹ obtenido en modo de ionización negativa del ion m/z = 877.6 y la vía de fragmentación compatible con la estructura del 1-*O*-docosanoil,2-*O*-hexadecanoil-3-*O*-(6-sulfoquinovopiranosil)-glicerol.