



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
CITOTÓXICA Y PROAPOPTÓTICA DE
COMPUESTOS OXIALQUILADOS Y
DIOXIALQUILADOS DERIVADOS DE
CHALCONAS SOBRE LÍNEAS
CELULARES TUMORALES.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular.**

DANIELA BIRCHMEIER SILVA.

Director de Tesis: Joan Villena García.

Codirector de Tesis: Alejandro Madrid Villegas.

Marzo / 2018



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
CITOTÓXICA Y PROAPOPTÓTICA DE
COMPUESTOS OXIALQUILADOS Y
DIOXIALQUILADOS DERIVADOS DE
CHALCONAS SOBRE LÍNEAS
CELULARES TUMORALES.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular.**

DANIELA BIRCHMEIER SILVA.

**Director de Tesis: Joan Villena García.
Codirector de Tesis: Alejandro Madrid Villegas.**

9 de Marzo de 2018



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y PROAPOPTÓTICA DE COMPUESTOS OXIALQUILADOS Y DIOXIALQUILADOS DERIVADOS DE CHALCONAS SOBRE LÍNEAS CELULARES TUMORALES.”

Daniela Birchmeier Silva.

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Director de Tesis Joan Villena García y del Codirector Alejandro Madrid Villegas en el laboratorio de Biología Celular en las dependencias del edificio Bruno Günther de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Iván Montenegro
Comisión Evaluación Tesis
Presidente Comisión

Dr. Natalia Quiñones
Comisión Evaluación Tesis
Profesor Informante

Dr. Enrique Werner
Comisión Evaluación Tesis
Profesor Informante

**Valparaíso, Chile
2018**

Sin duda la realización del presente trabajo no fue fácil, sin embargo, quiero agradecer a quienes que, sin su ayuda, habría sido imposible llegar al fin de este proceso.

En primer (y merecido) lugar a Joan Villena, por ser mi profesor guía, por su paciencia, apoyo y enseñanzas durante este período de constante aprendizaje.

A Alejandro Madrid por su rol como co-tutor y su aporte con las moléculas utilizadas en la tesis.

A los encargados de los diferentes laboratorios del edificio Bruno Günther, René, Claudio y Caro, por la buena voluntad que siempre tuvieron cuando necesité de su ayuda.

A Víctor por darme todas las facilidades en mi trabajo para la ejecución de esta tesis.

A Osvaldo, mi pareja, por darme ánimo y apoyo en momentos complicados.

Y a mis amigos, por su comprensión cuando los dejaba un poquito de lado por estar creando lo que leerán a continuación.

Muchas gracias.

ABREVIATURAS

AIF: Factor inductor de apoptosis.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

HDAC: Histonas Desacetilasas.

KW: Prueba no paramétrica de Kruskall Wallis.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

MMPs: Metaloproteinasas de matriz.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SRB: Sulforodamina B.

TCA: Ácido tricloroacético.

TNF α : Factor de necrosis tumoral α .

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado a X.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Definición y epidemiología:.....	2
Antecedentes históricos del cáncer:	3
Terapia convencional contra el cáncer:	7
Nuevos enfoques terapéuticos:.....	8
Chalconas:	9
Biología molecular del cáncer:.....	10
Las chalconas como agentes antitumorales:.....	13
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos.....	17
METODOLOGÍA	18
Células y condiciones de cultivo celular	22
Ensayo de citotoxicidad	23
Morfología celular y nuclear	24
Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	24
Permeabilidad de membrana mitocondrial.....	25
Activación de Caspasas	26
Análisis Estadístico.....	26
RESULTADOS	27
Efecto citotóxico: Ensayo con Sulforrodamina B	27
Análisis estadístico.....	27
Línea celular HT-29:.....	29
Línea celular MCF-7:	34
Línea celular PC-3.....	39
Línea celular CoN:	44
Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀).....	51
Morfología celular y nuclear	52
Microscopía con contraste de fase:.....	52
Microscopía de fluorescencia:	54
Citometría de Flujo: Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	56
Citometría de Flujo: Ensayo con Rodamina 123.....	59
Citometría de Flujo: Ensayo activación de caspasas.....	62
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMEN

Durante las últimas décadas la tasa de mortalidad por tumores malignos ha aumentado, y es la segunda causa de muerte en Chile. Las terapias convencionales contra esta enfermedad producen efectos secundarios y malestares, los cuales podrían ser atenuados mediante el uso de compuestos naturales como agentes terapéuticos en combinación con fármacos antitumorales y también como compuestos quimiopreventivos.

Las chalconas son cetonas α,β -insaturadas, con dos anillos aromáticos que poseen diversos sustituyentes. Pertenecen a la familia de los flavonoides y se encuentran en gran variedad de arbustos. Estos compuestos poseen variadas actividades biológicas, entre ellas, actividad antitumoral. Los compuestos a utilizar en este estudio fueron sintetizados a partir de chalconas naturales aisladas de *Adesmia balsámica*, los cuales fueron aplicados a diferentes líneas celulares con el fin de estudiar su citotoxicidad, morfología celular y nuclear, permeabilidad de membrana, activación de caspasas y generación de especies reactivas de oxígeno. Los resultados mostraron que los compuestos H, L, N, O y P, fueron los que producían más citotoxicidad, además de alterar la estructura celular, el potencial de membrana mitocondrial, activar caspasas y generar especies reactivas de oxígeno.

Palabras clave: Chalconas, Apoptosis, Oxialquilados, Citotoxicidad, Célula Tumoral.

INTRODUCCIÓN

Definición y epidemiología:

El cáncer es una patología que surge a partir de una acumulación gradual de cambios genéticos y epigenéticos que libera a las células neoplásicas de los mecanismos homeostáticos que regulan la proliferación celular normal. En los seres humanos, sólo son necesarias cuatro a seis mutaciones a lo largo del tiempo para alcanzar este estado¹.

En 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad². Más de la mitad de los casos de cáncer se registran en países en desarrollo, sin embargo, los datos epidemiológicos muestran un aumento de casos en el mundo menos desarrollado, en particular en los países "en transición" y países de ingresos medianos. Cerca del 70% de las muertes por cáncer se registran en estas naciones.² Chile no está ajeno a estas cifras. Hoy, por cada 100 fallecimientos, 25 son causados por cáncer, siendo la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares³.

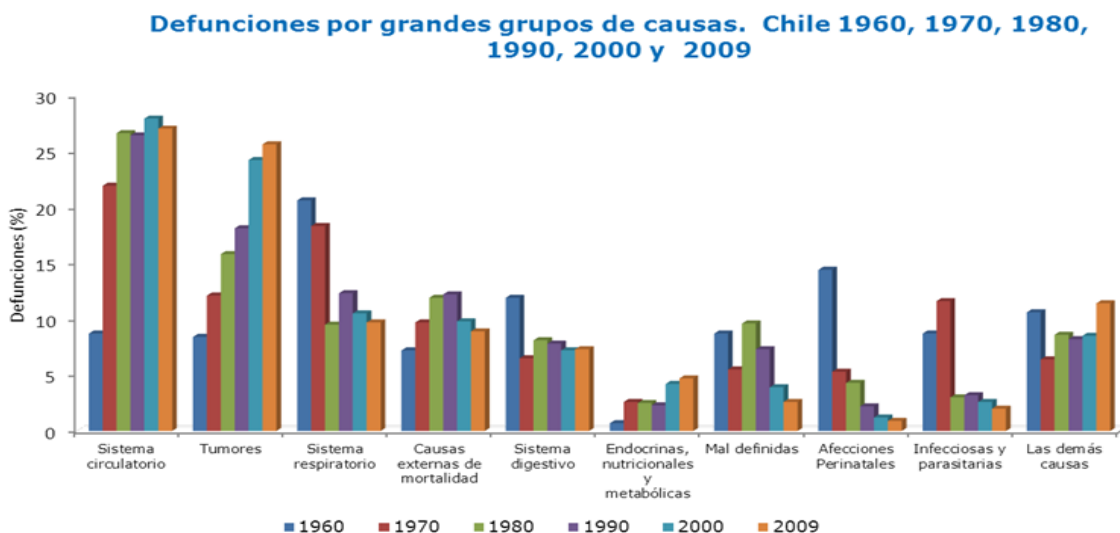


Figura 1: Defunciones por grandes causas en las últimas décadas en Chile. Se observa un aumento desde la década del 60 al 2000 en los fallecimientos asociados a tumores. (Instituto Nacional de Estadísticas INE. Mortalidad en Chile, 2002 y 2012. INE Chile.

Antecedentes históricos del cáncer:

Podría suponerse que el cáncer es una enfermedad de la época moderna, sin embargo, existe evidencia de tumores en momias encontradas en Egipto. El papiro egipcio más antiguo es el de Smith (1600 A.C.), actualmente recopilado en la Academia de Medicina de New York, donde se describen 8 casos de úlceras o tumores removidos con el uso de un "cauterio" y posibles osteosarcomas. En el papiro de Ebers (1500 A.C.), mostraba lesiones tumorales y los órganos afectados, como la piel, el estómago, y útero, así como relatos de extirpaciones quirúrgicas^{4,5}.

Luego en los escritos de Hipócrates (Grecia siglo V), se encuentran las primeras descripciones y el origen etimológico de la palabra cáncer. En el Corpus Hippocraticum, se mencionan lesiones ulcerosas crónicas, a veces endurecidas, que se desarrollan progresivamente y sin control expandiéndose por los tejidos semejando las patas de un cangrejo, sugiriendo el avance del proceso en todas direcciones, por lo que las denominó con la palabra griega *καρκίος* (*karkinos*), dándole un significado técnico a la palabra griega cangrejo. De allí, el término pasa al latín como "cancer" (sin acento) con ambos significados, el del animal y el de úlcera maligna. Siglos después, al formarse el castellano se derivan de la palabra latina dos términos, cangrejo para el crustáceo y cáncer como el término médico este tipo de lesión.^{6,7}



*Figura 1: Se creía que el término cáncer era por la dureza del tumor, refiriéndose al caparazón de un cangrejo, o porque dolía como un pellizco de él. Sin embargo, Hipócrates lo definió así porque el tumor y sus vasos le recordaban al animal (Siddhartha Mukherjee. *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*, 2011).*

Galeno publica un libro dedicado exclusivamente a los tumores: *De tumoribus praeter naturam* (*peri ton para physim onkom*)⁸, en el cual describe diversas lesiones tumorales u *onkoi* ("oncos", que quiere decir "hinchazón")⁹. Considera que las tumoraciones son resultado de una alteración de la "bilis negra". Se debe ayudar al cuerpo a que elimine este "humor alterado" mediante exéresis o cauterizando con fuego, o con sustancias que ayuden a su expulsión.¹⁰

En el siglo XVIII cuando se produce la identificación de las lesiones cancerosas bien diferenciadas como cáncer. Se utilizan como tratamiento plantas medicinales; un ejemplo es el uso de la cicuta postulada por Störck¹¹. Este es el inicio de múltiples medicamentos que se postularon en esa época, como la belladona, el opio y otros que hoy están prohibidos¹².

Nadie había recolectado muestras de tejido para examen microscópico hasta Johannes Müller, quien se dedicó al estudio de tumores. En su monografía sobre el cáncer¹³,

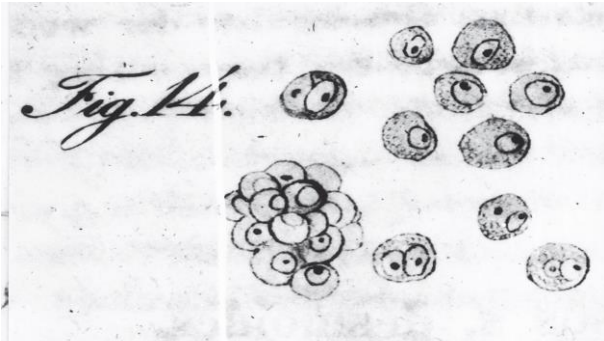


Figura 2: Células mononucleadas y binucleadas de carcinoma mamario. Figura 14 de Ueber den feinem Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste, G. Reimer, Berlin, Johannes Müller, 1838.

publicada en Berlín en 1838, Müller proporciona un análisis sistemático de las características microscópicas de tumores benignos y malignos, por ejemplo, describe las células que observó en el carcinoma mamario (figura 3). Müller atribuye el cáncer a una formación de nuevas células dentro

de un órgano enfermo, con potencial para extenderse a otras partes del cuerpo a través de los vasos sanguíneos.

Él asoció el cáncer con el envejecimiento y creía en la regresión del cáncer por necrosis. Aunque Müller observó que los tejidos tumorales son similares a los tejidos normales, concluyó que el cáncer se desarrollaba a partir de células germinales que se encontraban dispersas en los tejidos^{13,14}.

Luego en 1855 Rudolph Virchow, quien había demostrado que toda célula proviene de otra célula, sugirió que las células cancerosas debían derivar de otras células¹⁵.

A principios del siglo XIX la poca comprensión de la naturaleza del cáncer impulsó un pensamiento terapéutico contra el cáncer basado en su cauterización. Uno de los primeros métodos es el propuesto por Canquoin en 1838 utilizando el cloruro de zinc¹⁶. La intención era formar una escara lo más precisa posible que sólo afectara la lesión cancerosa y no a otros tejidos.

La invención de la radioterapia por Roentgen en 1885¹⁷ fue la forma de tratamiento más eficaz contra los tumores, junto con la cirugía, en la primera mitad del siglo XX, la cual se desarrolló rápidamente, aunque con una metodología primitiva en comparación con las de hoy en día. Un ejemplo fue el tratamiento de leucemias y linfomas en 1902 y 1903, donde se reportó la cura de estas enfermedades, sin embargo, surgieron recaídas y complicaciones, que mermaron el optimismo por esta técnica.^{18, 19}

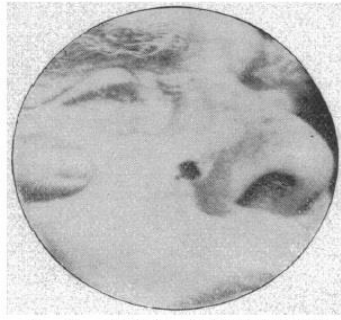


Fig. 9.—Case 8. Cutaneous carcinoma, Nov. 5, 1901.

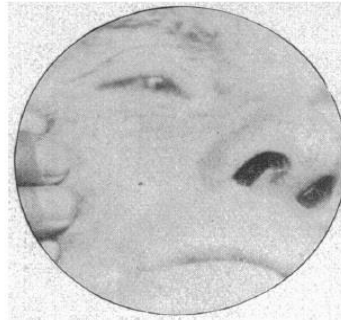


Fig. 10.—Case 8. Feb. 1, 1902.

Figura 3: Epitelioma tratado con los rayos de Roentgen. (Pusey, W A. J Am Med Assoc. 1902;38(15):911-919).

El cirujano William Coley desarrolló una mezcla de toxinas bacterianas, la cual llamó "toxina de Coley" que indujo la regresión de algunos tumores²⁰. Posteriormente, se desarrollaron otros sueros y toxinas bacterianas, debido a que se pensaba que algunos microorganismos no identificados podrían ser causantes del cáncer.²¹

Otras medidas terapéuticas utilizadas fueron: transfusiones de sangre, esplenectomía, tiroidectomía, oxigenoterapia, terapia de la fiebre, extracto de pituitaria y de otros órganos como bazo animal, médula ósea, ganglios linfáticos, páncreas, estómago e intestino delgado²². También la administración de vitaminas y minerales, y dietas de inanición, al observar la caquexia en pacientes con cáncer, se consideraba beneficioso privar al tumor de nutrientes²³.

Un avance importante ocurrió durante los años 20 y 30, y que sería el precursor de los fármacos antitumorales^{24,25}. Durante la Primera Guerra Mundial, se observó que el uso del gas mostaza (mostaza de azufre) provocaba intoxicación en sangre y médula ósea, lo que más tarde fue descrito como depresión de la médula que alcanzaba un máximo a las dos semanas de exposición.

Las muertes se atribuyeron en algunos casos a leucopenia y las autopsias revelaron atrofia del tejido linfático y testicular, e hipoplasia de médula ósea^{26, 27}.

En 1929, Berenblum, al estudiar la carcinogénesis, propuso que la mostaza de azufre era "anti-cancerígeno"²⁸. Junto con Riley-Smith agregaron una solución de gas mostaza, en un modelo animal y observaron que ésta inhibió la inducción de tumores. Además, estudiaron otros irritantes tópicos para la inhibición tumoral, y el único agente no relacionado con el gas mostaza con alguna actividad inhibidora del tumor era la cantaridina²⁹.

Adair y Bagg aplicaron una solución de gas mostaza a la piel normal de ratones y a un tumor inducido por un producto químico carcinógeno³⁰. La regresión tumoral fue evidente en el tumor cutáneo, aunque la autopsia mostró un nódulo pulmonar metastásico en el animal. Para determinar el uso tópico se aplicaron dosis variables en piel de conejo. Luego se aplicó gas mostaza en lesiones cutáneas de doce pacientes e inyección intratumoral en un individuo en 1931³⁰.



FIG. 6.—Showing the lesions of the chest-wall and forearm three days after the application of the mustard-gas solution. The lesion and surrounding tissues are covered with vesicles. (Case 1.)

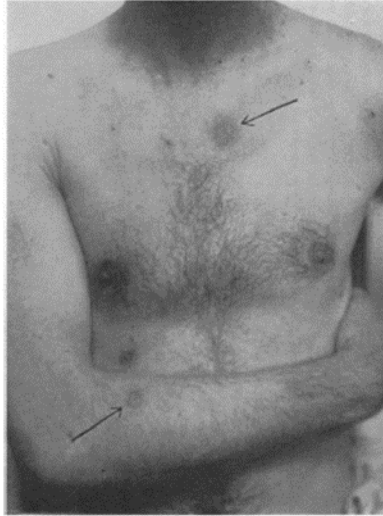


FIG. 7.—Showing the appearance eleven days after that of Fig. 6. The lesion is in the repair stage. (Case 1.)

Figura 5: Lesiones cutáneas en pecho y brazo. A la izquierda, aplicación de gas mostaza a los tres días, las lesiones están cubiertas de vesículas. A la derecha, las mismas lesiones once días después de la aplicación, las lesiones muestran cicatrización. (Adair FE, Bagg HJ. Ann Surg. 1931;93(1):190-9).

Los resultados incluyeron una "violenta reacción terapéutica" y virtual desaparición del tumor después de la inyección intratumoral (figura 5). Todos los tumores estudiados mostraron regresión, sin embargo, no hubo seguimiento a largo plazo. Los autores concluyeron que la solución de gas mostaza representaba otro agente para el tratamiento del cáncer³³.

En 1942, Gilman, Goodman, Philips y Allen descubrieron la actividad antitumoral de la mostaza nitrogenada³¹. Tras su introducción en la práctica clínica, otros agentes alquilantes se desarrollaron muchos de los cuales se encuentran en la práctica clínica actual, por ejemplo, el clorambucil, el melfalán, busufan y la ciclofosfamida³².

El uso de un compuesto antifolato fue informado por Sidney Farber, iniciando el desarrollo de la terapia antimetabólica³³. Esto fue seguido por el uso de purina y análogos de pirimidina. Después antibióticos antitumorales, compuestos de platino, compuestos de imidizol, alcaloides de la planta *Vinca rosea*, taxol, análogos de camptotecina y agentes biológicos forman parte de la lista terapéutica contra las neoplasias³⁴.

La búsqueda de un agente anticancerígeno que sea selectivo para el tumor, evitando el daño a los tejidos sanos continúa hasta nuestros días, gracias al amplio conocimiento de los factores biológicos, genéticos y moleculares del cáncer. Esto ha dado lugar a formas más específicas de terapia, por ejemplo, el uso de anticuerpos como el anti-CD20 para las neoplasias linfoides y el Imatinib que es un inhibidor del transcrito de fusión de los genes BCR-ABL que caracterizan a la leucemia mieloide crónica^{35, 36}.

Terapia convencional contra el cáncer:

Los fármacos usados para la quimioterapia no sólo eliminan las células neoplásicas, sino que también pueden afectar a las células sanas y normales, debido a que estos medicamentos circulan por todo el cuerpo, causando efectos secundarios que es el daño ocasionado a las células sanas³⁷.

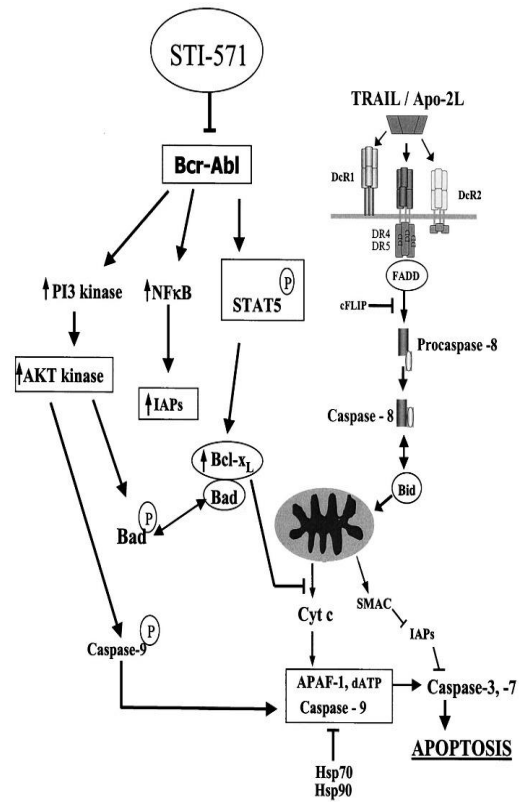


Figura 6: Mecanismos moleculares subyacentes a la sensibilización mediada por STI-571 (Imatinib) de células leucémicas positivas para Bcr-Abl a la apoptosis inducida por Apo-2L / TRAIL. (Ramadevi, N. et al. Clin Cancer Res 2001;7(2):350-357)

De igual modo, en la radioterapia, la radiación no es específica para las células cancerosas y puede dañar las células normales³⁸. La cirugía en ciertos casos puede ser suficiente para eliminar un cáncer, sin embargo, existe el riesgo de no eliminar por completo las células neoplásicas, que éstas hayan invadido otros tejidos o es posible que el tumor esté en un área inaccesible quirúrgicamente.

Los efectos secundarios más comunes durante el tratamiento contra el cáncer son alopecia, náuseas y vómitos, anemia, fatiga, aumento de moretones, inmunodeficiencia, pérdida del apetito, dispepsia, irritación de las membranas mucosas de los ojos, nariz y garganta, erupciones cutáneas, problemas urinarios y cambios de peso, entre otros³⁹.

Además, la terapia con fármacos puede estar limitada por la aparición de quimiorresistencia. Los tumores se caracterizan por su inestabilidad genética y heterogeneidad, que puede generar un repertorio de subpoblaciones muy diverso, entre las cuales se pueden presentar subpoblaciones resistentes a los tratamientos aplicados⁴⁰.

Nuevos enfoques terapéuticos:

El descubrimiento y desarrollo de estas terapias permitió el perfeccionamiento del enfoque terapéutico contra el cáncer, buscando nuevas alternativas que sean más específicas, con mayor o igual efectividad, pero menos citotóxicas que la quimioterapia o la radioterapia, para evitar los efectos colaterales que éstas conllevan. Con este propósito, en las últimas décadas los investigadores han puesto especial atención a los compuestos naturales, obtenidos de plantas, microorganismos y/u organismos marinos, que podrían ser utilizados en la terapia contra el cáncer e incluso como compuestos quimiopreventivos. Además de utilizar estos compuestos en su estado natural, se puede obtener a partir de ellos compuestos sintéticos derivados de las estructuras de estas moléculas naturales⁴¹.

Chalconas:

Entre los diferentes grupos de fitoquímicos se encuentra la familia de las chalconas. Chalcona (1,3-difenil-2E-propeno-1-ona) es un término introducido por Kostanecki y Tabor⁴² que corresponde a compuestos considerados como los precursores de flavonas en la biosíntesis de flavonoides. Su estructura consta de dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos en un sistema α , β -insaturado (Figura 7).

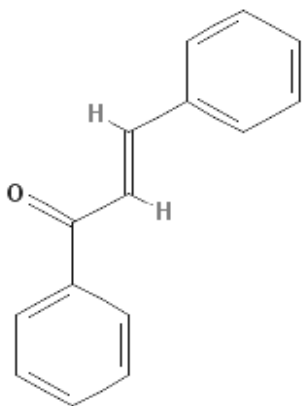


Figura 7: Estructura de la chalcona. (National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database).

Las chalconas oxipreniladas han sido consideradas sólo como intermediarios en la biosíntesis de chalconas C-preniladas durante décadas. Sólo en los últimos diez años han sido caracterizadas como fitoquímicos que ejercen actividades biológicas interesantes. Los subgrupos de chalconas oxipreniladas están representados por un pequeño, pero no insignificante, número de moléculas. Se pueden encontrar en flores que poseen pigmentos amarillos y también están distribuidas en raíces, rizomas, duramen, brotes, hojas y semillas de especies de los géneros *Humulus*, *Scutellaria*, *Parartocarpus*, *Ficus*, *Dorstenia*, *Morus*, *Artocarpus*, etc.⁴³.

El esqueleto de las chalconas despertó el interés en los investigadores en el siglo XXI debido a su composición química simple, facilidad de síntesis, diversidad de sustituyentes y amplia gama de actividades biológicas tales como antidiabético, antineoplásico, antihipertensivo, antiretroviral, antiinflamatorio, antiparasitario, antihistamínico, antimalárico, antioxidante, antifúngico, antiplaquetario, antiangiogénico, antiprotozoario, antibacterial , entre otras⁴⁴.

Biología molecular del cáncer:

La investigación del cáncer ha generado una gran cantidad de conocimiento, revelando que esta es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma o en su expresión, debido a mutaciones descubiertas en células tumorales humanas y animales, las cuales producen la activación de oncogenes y la inhibición de genes supresores de tumores. Las características de las células cancerígenas que los investigadores destacan respecto a esta patología son:



Figura 4: Sellos distintivos de las células tumorales. Modificado de Hanahan y Weinberg, *Cell* 2011;144(5):646-674.

(1) Las células cancerosas estimulan su propio crecimiento: Deben mantener su capacidad para proliferar a través del tiempo. Los tejidos normales controlan la producción y liberación de señales de crecimiento que instruyen la entrada y progresión de la célula en el ciclo celular, asegurando la homeostasis, el mantenimiento de la arquitectura y función del tejido normal. Estas señales son transmitidas por factores de crecimiento que se unen a receptores de superficie de la célula. Estos emiten señales que regulan la progresión a través del ciclo celular y el crecimiento. Las células cancerosas desregulan estas señales, adquiriendo la capacidad de mantener la señalización proliferativa de distintas maneras: produciendo sus propios factores de crecimiento y expresando receptores afines, lo que resulta en proliferación autocrina, enviando señales para estimular a células normales que suministren factores de crecimiento a las células cancerosas⁴⁵, elevan los niveles de

proteínas receptoras en su superficie, o alterar su estructura, haciéndolas hiperreactivas a cantidades limitadas de factores de crecimiento. La independencia del factor de crecimiento también puede conducir a la activación de componentes de las vías de señalización sin la necesidad de estimular los receptores⁴⁶.

(2) Evaden señales inhibitoras que podrían detener su crecimiento: Las células cancerosas deben eludir los mecanismos que regulan negativamente la proliferación celular; muchos de ellos dependen de genes supresores de tumores. La proteína RB (asociada a retinoblastoma) integra señales extracelulares e intracelulares y decide si las células deben pasar por su ciclo de crecimiento y división⁴⁷. Si las células cancerosas poseen defectos en la vía RB, falla este sistema de "guardia" de la progresión del ciclo celular, permitiendo la persistencia en la proliferación celular. La proteína TP53 opera como central de control que rige las decisiones de las células para proliferar, activar la senescencia o la apoptosis. Recibe señales de estrés y anormalidad, como daño excesivo en el genoma, aumento de las especies reactivas de oxígeno o bajo niveles de señales promotoras del crecimiento, glucosa u oxigenación. TP53 puede detener la progresión del ciclo celular hasta que estas condiciones hayan sido normalizadas o desencadenar apoptosis⁴⁸.

(3) Evasión de la apoptosis: La apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer. La maquinaria apoptótica se compone de dos circuitos principales, uno que recibe y procesa señales extracelulares de inducción de la muerte (vía extrínseca), que implica, por ejemplo, el ligando Fas / receptor Fas, y otro sensor e integrador de variadas señales de origen intracelular (vía intrínseca)⁴⁹. Cada uno culmina en la activación de las caspasas 8 y 9, que inicia una cascada de proteólisis que involucra caspasas efectoras, responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, donde la célula se desarma progresivamente y luego es digerida, por sus vecinas y por células fagocíticas. Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o eludir apoptosis. El más común es la pérdida de función del supresor tumoral TP53, eliminando este sensor de daño crítico. También pueden aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de señales de supervivencia (Igf1/2) y mediante la disminución de factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma).

(4) Potencial replicativo ilimitado: Las células cancerosas requieren multiplicarse sin control para poder generar tumores. Los telómeros protegen los extremos de los cromosomas y están involucrados en la capacidad para la proliferación ilimitada⁵⁰. Los telómeros se acortan progresivamente con cada ciclo celular, en consecuencia, la longitud del ADN telomérico dicta cuántas divisiones podrá generar una célula hasta su muerte. La telomerasa, enzima especializada que agrega telómeros, está casi ausente en las células no inmortalizadas. Las células cancerosas presentan niveles significativos de telomerasa. Al extender el ADN telomérico, la telomerasa puede contrarrestar la progresión a senescencia y entrada en apoptosis⁵⁰.

(5) Angiogénesis sostenida: Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar desechos y dióxido de carbono, por lo tanto, es necesario generar nuevos vasos sanguíneos, mediante el proceso de angiogénesis. El gen VEGF-A codifica ligandos que participan en la creación de nuevos vasos sanguíneos durante la etapa embrionaria y postnatal, y luego en la supervivencia homeostática del endotelio, así como en situaciones fisiológicas (ciclo reproductivo femenino) y patológicas (curación de heridas, etc.) pero sólo de manera transitoria. Por el contrario, durante la progresión tumoral, las señales proangiogénicas están activadas permanentemente, causando la formación de vasos que ayudan a mantener la expansión y crecimiento neoplásicos⁵¹. La activación de VEGF a través de tres receptores de tirosina quinasas (VEGFR-1-3) está regulado en múltiples niveles. La expresión del gen VEGF puede verse aumentada por la hipoxia y por señalización oncogénica⁵².

(6) Invaden el tejido local y se extienden a sitios distantes: Las células cancerosas adquieren la capacidad de invadir los tejidos localmente y progresar a metástasis a distancia. Ellas desarrollan alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular. Una de ellas es la pérdida de E-cadherina, una molécula clave en la adhesión celular. La reducción de la expresión de E-cadherina potencia la invasión y metástasis⁵³. Además, expresión de genes que codifican para las moléculas de adhesión de célula a matriz extracelular están alteradas en células cancerosas. Por ejemplo, la N-cadherina, que normalmente se expresa en la migración de neuronas y células mesenquimales durante la organogénesis⁵⁴.

Las chalconas como agentes antitumorales:

Las moléculas que participan en la regulación de los mecanismos descritos anteriormente podrían todas servir de blanco para las nuevas terapias, incluyendo a las chalconas. Estas poseen varios efectos incluyendo el bloqueo del proceso de iniciación carcinogénica, la inducción de apoptosis, la inhibición de la proliferación, la metástasis y la angiogénesis (Figura 9)⁵⁵.

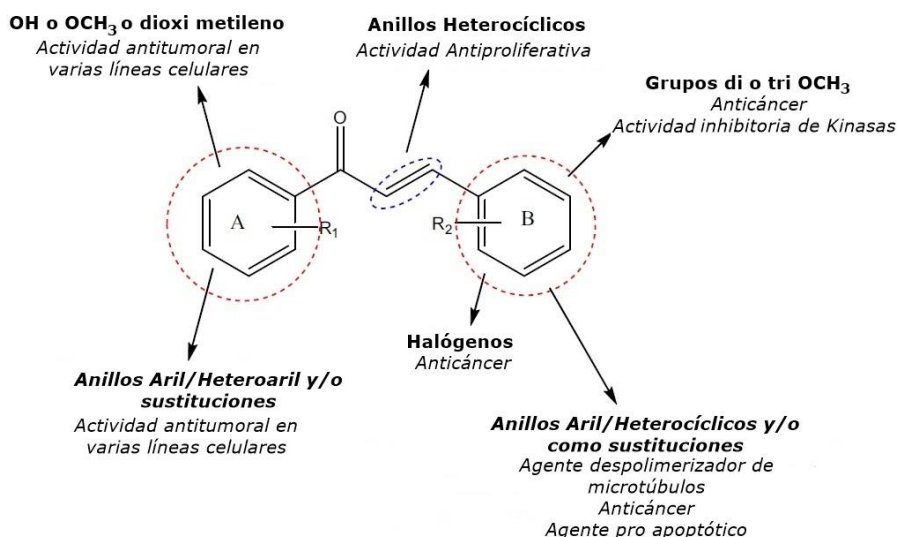


Figura 9: Relación estructura-actividad de los derivados de chalcona. Modificado de Karthikeyan C. et al. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2014;10: 97-115.

Durante la última década, alrededor de 90 chalconas se reportaron con actividad antitumoral. Estas pueden clasificarse a grandes rasgos en 3 grandes grupos: chalconas con sustitución de tipo O, chalconas preniladas por O y por C, aductos de Diels-Alder y otras. Algunos de los mecanismos mediante los cuales las chalconas actúan contra las células tumorales atacando blancos moleculares son:

- **Inhibición de la tubulina:** El componente estructural principal de los microtúbulos es la tubulina. Los microtúbulos son responsables de una variedad de funciones: la mitosis, la motilidad, la arquitectura del citoesqueleto, la secreción y el transporte intracelular. Los derivados de chalconas denominados Ch1 y Ch2, mostraron producir disminución en la expresión de los genes de α -tubulina, α 1-tubulina y β 5-tubulina en células de adenocarcinoma colorectal⁵⁶. Chalconas del tipo fenstatina/ isocombretastatina exhibieron un efecto inhibitorio significativo sobre la

tubulina. Un ensayo de unión competitiva sugirió que estos compuestos se unen en el sitio de unión a la colchicina de la tubulina⁵⁷.

- Inhibidores de NF- κ B: La vía de señalización de NF- κ B regula la supervivencia de las células normales y malignas mediante el control de la expresión de genes inductores de la proliferación y reguladores de la muerte celular. Xanthohumol, un flavonoide de isopreno presente en el lúpulo es eficaz para inhibir la proliferación e inducir la apoptosis del cáncer de hígado humano en células HepG2 a través de la supresión de la expresión de NF-Kb, promoviendo la expresión de p53, PARP, AIF y citocromo c, y disminuyendo la expresión de XIAP y Bcl-2/Bax⁵⁸. Además, estudios en glioblastoma multiforme con derivados de quercetina, también mostraron la inducción de la apoptosis por la inhibición de NF- κ B y la activación de la caspasa-3⁵⁹.

- Inhibidores de la degradación de p53: p53 es una proteína que regula el ciclo celular y funciona como supresor de tumores, media la reparación del ADN, la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, la estabilidad genómica y la activación de genes. p53 es degradado por MDM2 y a través del proteosoma (complejo de proteinasa multicatalítico, responsable de la degradación intracelular de proteínas). Chalconas borónicas han demostrado actividad citotóxica asociada con la acumulación de proteínas p53 y p21 e inducción de apoptosis. Los estudios mostraron que el tratamiento con AM114 inhibió la actividad del proteosoma in vitro, lo que condujo a una acumulación de p53⁶⁰. Se ha encontrado actividad inhibidora del proteosoma en las chalconas 3,5-bis-(ácido 4-benciliden-borónico) y 1-metil-piperidin-4-ona, acumulando p53 e induciendo apoptosis⁶¹. Un estudio en adenocarcinoma de colon demostró que las chalconas preniladas (Figura 10) tienen efecto citotóxico en estas células tumorales. También actividad inhibidora del crecimiento tumoral asociada a la activación de p53, deteniendo el ciclo celular y produciendo apoptosis dependiente de mitocondrias, al interrumpir la interacción p53-MDM2⁶².

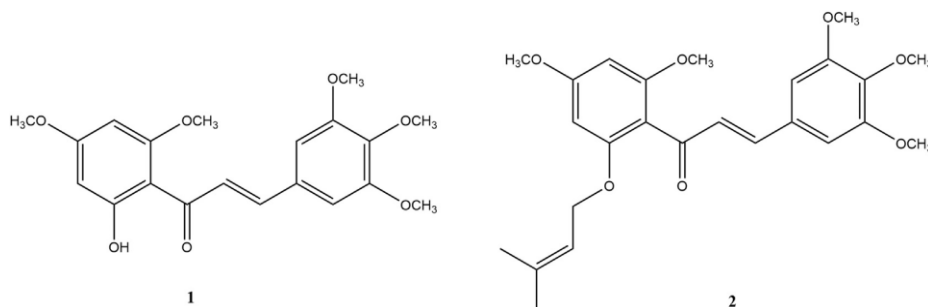


Figura 10: Chalconas preniladas. (Leño M. et al. *Life Sci.* 2015; 142:60–5).

- Activación de caspasas: El efecto del xanthohumol ha sido investigado sobre la apoptosis de la línea celular HepG2 de cáncer de hígado humano⁵⁸ y de glioblastoma maligno humano. La apoptosis inducida por este compuesto se asoció con la activación de la caspasa 3, caspasa 9, escisión de PARP y la regulación negativa de la proteína Bcl-2 antiapoptótica. Además, se observó un aumento de la producción intracelular de ROS, lo que proporcionó un ambiente específico que resultó en muerte celular inducida por MAPK⁶³. En la línea celular de cáncer cervical activó las caspasas 3, 8 y 9⁶⁴. Los compuestos mencionados anteriormente fenstatina e isocombretastatina mostraron activar la caspasa 9.⁵¹

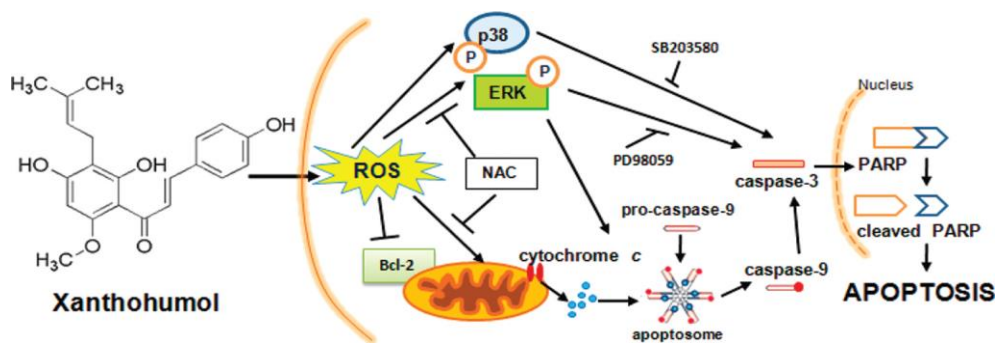


Figura 11: Efecto del xanthohumol. La apoptosis se asoció con la activación de las caspasas 3 y 9, y división de PARP, fue mediada por la vía mitocondrial, como se ejemplifica en despolarización mitocondrial, liberación de citocromo c, y la inhibición de la proteína antiapoptótica Bcl-2. (Festa M. et al. J Nat Prod. 2011;74(12):2505–13).

- Arresto del ciclo celular: Un ensayo de ciclo celular reveló que fenstatina e isocombretastatina detienen en la fase G2 / M y conducen a muerte celular apoptótica.⁵¹ Se observó detención del ciclo celular en fase S en células de cáncer cervical luego de ser tratadas Xanthohumol⁶⁴.
- Inhibición de histonas desacetilasas (HDAC): La activación de HDAC da como resultado la hiperacetilación de las histonas, un efecto epigenético que afecta a la expresión génica. Cuando estas enzimas actúan incorrectamente, pueden evitar la transcripción de genes clave. Este proceso parece ser un paso importante en la formación tumorigénica de algunos tipos de cáncer⁶⁵. Cuatro chalconas, la isoliquiritigenina, la buteina, la homobuteína y la mareína glicosídica mostraron actividad inhibitoria de HDAC. Las tres primeras además inhibieron la actividad NF-κB inducida por TNFα y la actividad de HDAC⁶⁶.

- **Inhibidores de la angiogénesis:** El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señal producida por las células que estimula la angiogénesis. En algunos tumores, la sobreexpresión de VEGF conduce a un mejorado crecimiento y metástasis tumoral, debido a la mayor disponibilidad de reposición de nutrientes a las células. Derivados de chalcona mostraron inducir la disminución de VEGF y poseer potencial anti-angiogénico⁶⁷. Ocho nuevas chalconas (1-8) y 12 chalconas conocidas (9-20) fueron aisladas del vegetal *Medicago sativa* L. Las actividades antiangiogénicas de los compuestos (1-20) se evaluaron y se observó que los compuestos 6, 8, 18 y 19 presentaban actividades antiangiogénicas in vitro⁶⁸.
- **Inhibición de metaloproteinasas:** Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas que tienen la capacidad de degradar moléculas de la matriz extracelular, por ejemplo, el colágeno de la membrana basal, con lo cual se permite la proliferación y la migración celular. Chalconas aisladas de la planta *Dorstenia turbinata* se estudiaron en células de glioblastoma para evaluar su actividad inhibitoria de MMPs. Los resultados mostraron un 80% de inhibición⁶⁹. También se han investigado en el mismo tumor los compuestos quercetina, apigenina, crisina, kaempferol y 30,40-dihidroxi-flavona. Estos indujeron un retraso en la migración celular, relacionado con una reducción en los filopodios y en la expresión y actividad de las metaloproteinasas⁷⁰.

Los antecedentes bibliográficos nos muestran que las chalconas y las modificaciones a su estructura química poseen actividad antitumoral, algunos atacando varios blancos propios de una célula neoplásica. A raíz de ellos, se plantea el siguiente objetivo: **Determinar el efecto sobre viabilidad y muerte celular de los compuestos oxialquilados y dioxi-alquilados derivados de chalconas sobre las líneas celulares tumorales HT-29, MCF-7, PC-3 y no tumoral CoN.**

HIPÓTESIS

Los compuestos oxialquilados y dioxialquilados derivados de chalconas poseen actividad citotóxica y proapoptótica en las líneas celulares HT-29, MCF-7, PC-3 y CoN.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto sobre viabilidad y muerte celular de los compuestos oxialquilados y dioxialquilados derivados de chalconas sobre las líneas celulares tumorales HT-29, MCF-7, PC-3 y no tumoral CoN.

Objetivos Específicos

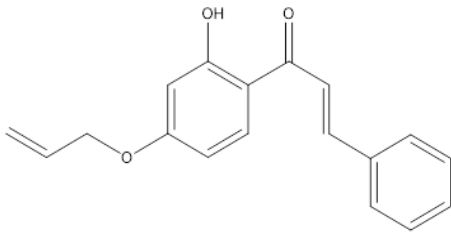
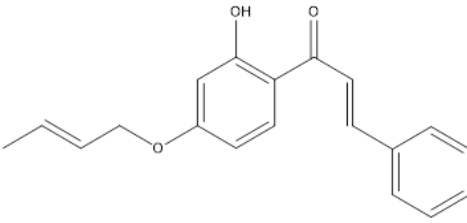
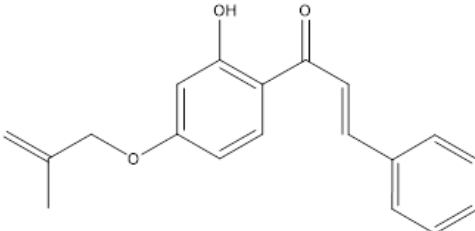
1. Estudiar el efecto citotóxico de los compuestos oxialquilados derivados de chalconas sobre las diferentes líneas celulares de cáncer a través del ensayo con Sulforodamina B.
2. Determinar el efecto de los compuestos oxialquilados derivados de chalconas sobre la morfología celular y nuclear mediante microscopía con contraste de fase y de fluorescencia.
3. Evaluar el efecto de los compuestos oxialquilados derivados de chalconas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo con 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA).
4. Evaluar el efecto de los compuestos oxialquilados derivados de chalconas sobre la funcionalidad de la mitocondria a través de citometría de flujo con Rodamina 123.
5. Analizar el efecto de los compuestos oxialquilados derivados de chalconas sobre la activación de caspasas mediante citometría de flujo con el marcador FITC-VAD-FMK (CaspACE™).

METODOLOGÍA

Los compuestos a utilizar pertenecen a la familia de las chalconas. En este trabajo, la molécula de partida 2',4'-dihidroxicalcona (**G**) e isocordoina (**N**) fueron extraídas desde el arbusto *Adesmia balsamica*, endémico de la región de Valparaíso⁷¹.

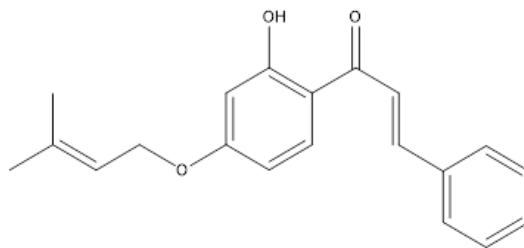
A partir de **G** se sintetizaron 10 compuestos oxialquilados: A, B, C, D, F, H, I, J y K, y 8 compuestos dioxialquilados: L, M, O, P, Q, R, S y T derivados de chalconas, por sustitución nucleófila a través de alquilación selectiva en la posición 4' del anillo A del compuesto, los cuales serán aplicados a las células en cultivo.

Tabla 1: Estructura de los compuestos oxialquilados y dioxialquilados derivados de chalconas.

Nombre	Estructura
A (2E)-1-[4-(allyloxy)-2-hydroxyphenyl]-3-phenylprop-2-en-1-one	
B (2E)-1-{4-[(2E)-but-2-en-1-yloxy]-2-hydroxyphenyl}-3-phenylprop-2-en-1-one	
C (2E)-1-{2-hydroxy-4-[(2-methylprop-2-en-1-yl)oxy]phenyl}-3-phenylprop-2-en-1-one	

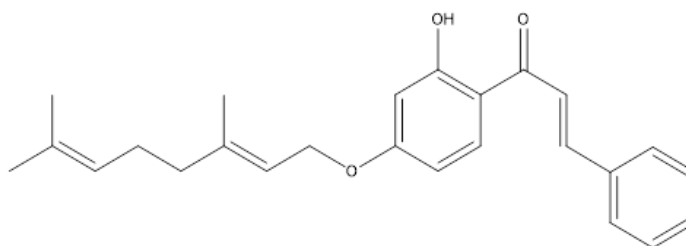
D

(2E)-1-{2-hydroxy-4-[(3-methylbut-2-en-1-yl)oxy]phenyl}-3-phenylprop-2-en-1-one



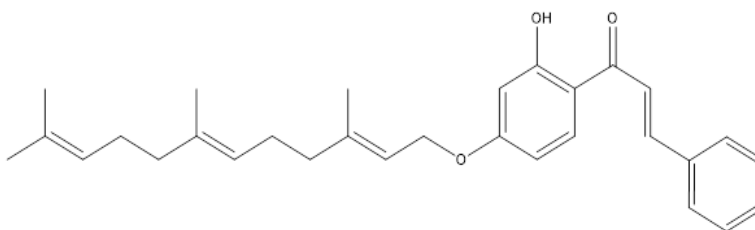
E

(2E)-1-(4-{[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl]oxy}-2-hydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



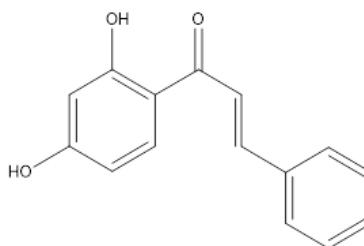
F

(2E)-1-(2-hydroxy-4-{[(2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl]oxy}phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



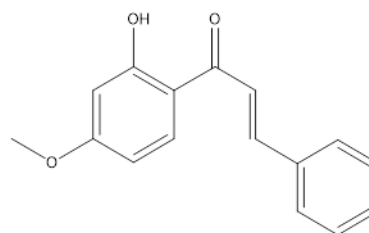
G Chalcona de partida.

(2E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



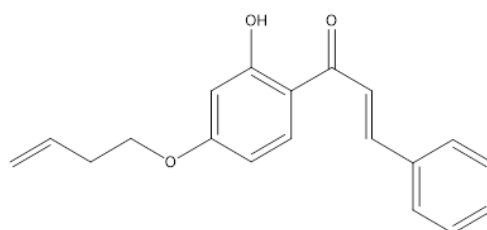
H

(2E)-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



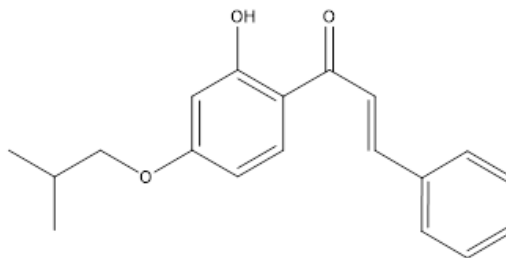
I

(2E)-1-[4-(but-3-en-1-yloxy)-2-hydroxyphenyl]-3-phenylprop-2-en-1-one



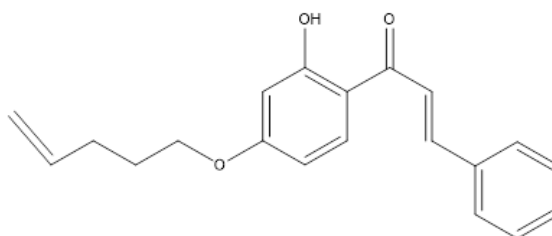
J

(2*E*)-1-(2-hydroxy-4-isobutoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



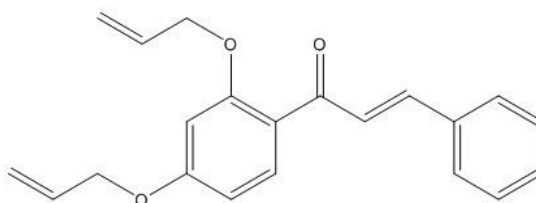
K

(2*E*)-1-[2-hydroxy-4-(pent-4-en-1-yloxy)phenyl]-3-phenylprop-2-en-1-one



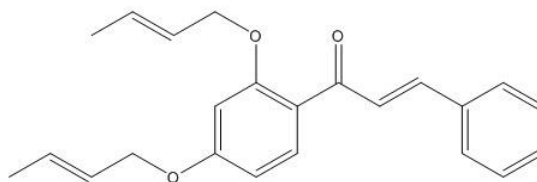
L

(*E*)-1-(2,4-bis(allyloxy)phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



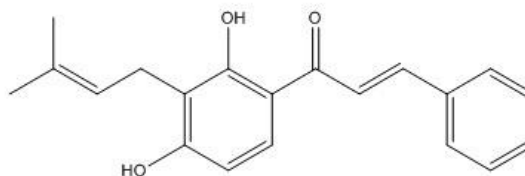
M

(*E*)-1-(2,4-bis(((*E*)-but-2-en-1-yl)oxy)phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



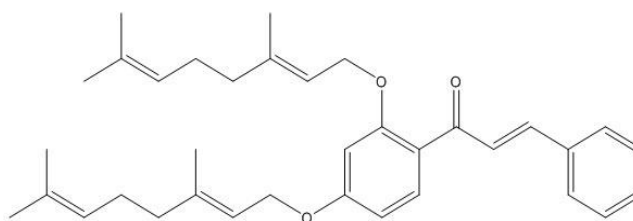
N isocordoina (natural)

(*E*)-1-(2,4-dihydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one



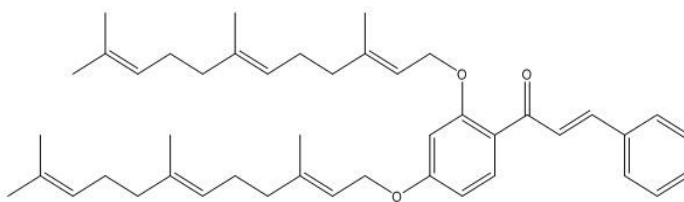
O

(*E*)-1-(2,4-bis(((*E*)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)oxy)phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



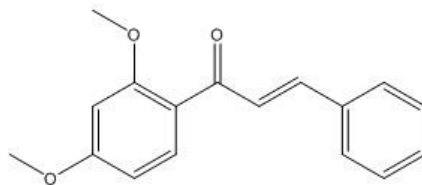
P

(E)-1-(2,4-bis(((2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl)oxy)phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



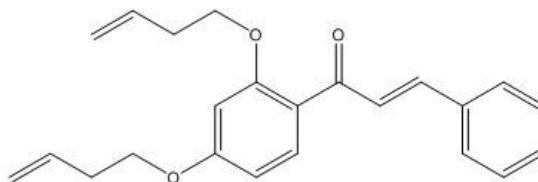
Q

(E)-1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



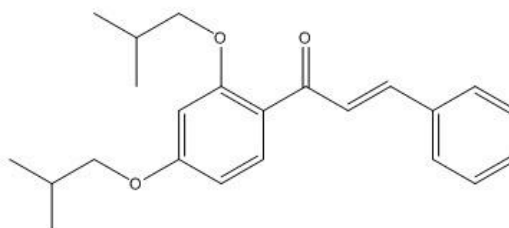
R

(E)-1-(2,4-bis(allyloxy)phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



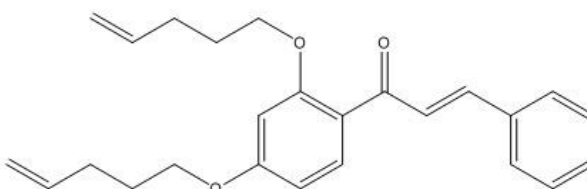
S

(E)-1-(2,4-diisobutoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



T

(E)-1-(2,4-bis(allyloxy)phenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



Además, se trabajó con dos compuestos denominados 2',5'-dihidroxichalcona (**25**) y 2',6'-dihidroxichalcona (**26**) (Figura 12) los cuales tienen sustitución en carbonos diferentes a los derivados de chalconas mostrados en la tabla 1.

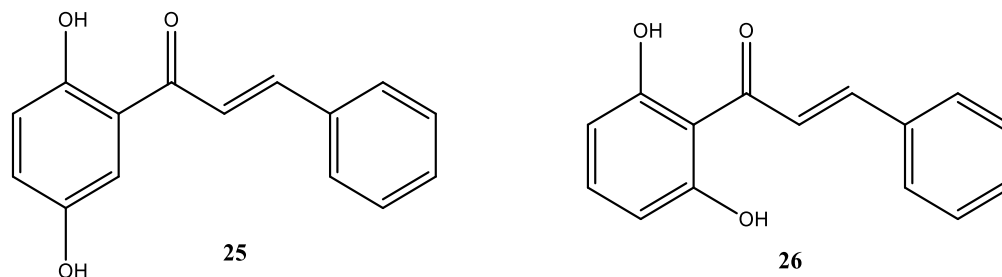


Figura 12: Estructuras de las chalconas análogas de **G**.

Células y condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares fueron obtenidas desde la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) y corresponden a:

HT-29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. La línea es positiva para la expresión de los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis y fos. El antígeno p53 se produce en exceso⁷².

MCF-7: Línea celular epitelial de carcinoma de glándula mamaria; derivado del sitio metastásico, humano. Las células expresan el oncogén WNT7B. El crecimiento de células MCF-7 es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa⁷².

PC-3: Línea celular iniciada a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma de próstata grado IV humano. Las células exhiben actividades de baja fosfatasa ácida y testosterona-5-alfa reductasa⁷².

CCD841 CoN: Línea celular epitelial de colon humano, obtenidas de un feto de 21 semanas de gestación. Las células se parecen a las células epiteliales; sin embargo, las células no contienen queratina.

Las células fueron cultivadas en DMEM: Ham's-F12 (1:1), complementado con 10% de FCS, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 1 mM de glutamina. Las células se mantienen siempre en un incubador a 37° C en 5% CO₂: 95% de aire mezclado. Antes de cada tratamiento, las células son incubadas en estas condiciones durante 24 horas para obtener una óptima confluencia y adhesión.

Inicialmente, para determinar el efecto sobre la viabilidad celular del solvente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado en la preparación de los distintos compuestos, se realizó la incubación con el solvente (concentración final en cultivo de 0.1%) y otra con medio de cultivo, durante 72 horas a 37°C en 5% de CO₂, en las líneas celulares HT-29, MCF-7, PC-3, y CoN.

Para realizar los ensayos de citotoxicidad, morfología nuclear y celular, muerte celular y producción de ROS, las células fueron tratadas con los compuestos oxialquilados y dioxialquilados derivados de chalconas, utilizando el solvente DMSO como control negativo a la concentración final en cultivo de 0,1%.

Ensayo de citotoxicidad

Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos, se empleó el ensayo de Sulforodamina B, el cual permite medir la cantidad de células viables tras cada tratamiento.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a una densidad de 3×10^3 células/pocillo en 100 µL de medio de cultivo y tratadas por triplicado a las concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 µM por 72 horas a 37°C en 5% CO₂. Luego de cada incubación, las células fueron fijadas con 25 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% p/v durante una hora a 4°C (concentración de TCA final 10%). Posteriormente las células son lavadas 3 veces por inmersión en agua destilada. Tras lo cual se tiñen con 50 µL/pocillo de Sulforodamina B (SRB), al 0,1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v), a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la tinción, las células fueron lavadas 3 veces con 150 µL/pocillo de ácido acético al 1% v/v y se dejan secar a temperatura ambiente. El colorante es solubilizado con 150 µL/pocillo de Tris Base 10 mM, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas.

Los valores obtenidos son transformados a porcentajes de células viables respecto del control y promediados para así calcular el valor de IC₅₀ de cada compuesto en las líneas celulares estudiadas, utilizando el software SigmaPlot 12.0. Los porcentajes de viabilidad celular se compararon con el control, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en el efecto sobre la viabilidad celular tras cada tratamiento.

Morfología celular y nuclear

Con el objetivo de examinar cualitativamente los cambios morfológicos tras los tratamientos con cada compuesto sobre las líneas HT-29, MFC-7, PC-3 y CoN. Cada línea fue tratada con una concentración de 50 µM de cada compuesto durante 48 horas. Para observar los fenómenos de modificación de la morfología celular se utilizó contraste de fase. Para analizar cambios en la compactación de la cromatina, las células fueron marcadas con colorante Hoechst durante 30 minutos a 37° C, visualizándolas con filtro DAPI. Las fotografías se capturaron a 20x.

Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos, con una densidad de 16×10^4 células/pocillo en 500 µL de medio de cultivo. La determinación de ROS se realiza mediante el uso de una sonda fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Esta sonda difunde a través de la membrana celular, es hidrolizada por enzimas esterasas intracelulares y se oxida a la fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) en presencia de ROS. Las células fueron marcadas con esta sonda por una hora a 37°C en incubador. Posteriormente se cambió el medio celular y las células fueron tratadas con los compuestos a una concentración de 25 y 50 µM durante 3 horas. A continuación, se recolectó el medio celular. Las células adheridas fueron tripsinizadas para recolectarlas junto al medio celular en tubos Ependorff de 1,5 mL para su posterior centrifugación (10 minutos a 1500 g). El sobrenadante se eliminó y el pellet fue resuspendido en 500 µL de PBS. Como control sin marcaje se utilizó células sin tratamiento, el control positivo fueron células sin tratar y marcadas. Además, se utilizó un control tratado con solvente y marcadas con DCFH-DA y, por último, los tratamientos con los diferentes compuestos.

La fluorescencia se midió mediante citometría de flujo utilizando el filtro FL1. Los resultados obtenidos tras el análisis en el citómetro de flujo fueron representados en histogramas y analizados para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno, utilizando el software Cyflogic 1.2.1.

Permeabilidad de membrana mitocondrial

Para la evaluación del cambio de potencial de membrana mitocondrial, las células fueron marcadas con rodamina 123, sonda catiónica sensible a voltaje que se acumula de forma reversible en las mitocondrias. Las líneas celulares evaluadas fueron HT-29, MCF-7, PC-3 y CoN. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en 500 μ L de medio de cultivo. Luego de 24 horas de incubación, las células se trataron con los compuestos a las concentraciones 25 y 50 μ M durante 48 horas. Tras el tratamiento, se adicionó 5 μ L de rodamina 123 a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras lo cual se analizó la fluorescencia asociada a la rodamina 123 mediante citometría de flujo. Para aquello se recoge el contenido de cada pocillo en tubos de 15 mL, de manera independiente. Posteriormente se adicionan 300 μ L de PBS 1X a cada pocillo y se vuelven a recoger en el mismo tubo de 15 ml a modo de obtener las células desprendidas. Luego se agregan 300 μ L de tripsina, durante 10 minutos, para así, obtener todo el contenido celular de cada pocillo. Cada tubo se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante es retirado y el pellet se resuspende en 500 μ L de PBS 1X. Como control sin marcaje se utilizaron células sin tratar, el control negativo fueron células tratadas con solvente y marcadas con rodamina 123 y por último, los tratamientos con los diferentes compuestos. Los histogramas obtenidos tras el análisis en el citómetro de flujo, utilizando el filtro FL1 serán analizados para evaluar el porcentaje de células con disminución del potencial de membrana mitocondrial, utilizando el software Cyflogic 1.2.1.

Activación de Caspasas

Para evaluar la activación de caspasas como una característica del proceso apoptótico, las células fueron tratadas con el marcador FITC-VAD-FMK (CaspACE™), el cual es un isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con un inhibidor general de las caspasas (VAD-FMK), siendo el FITC-VAD-FMK un marcador in situ que se une a las caspasas activas. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos, con una densidad de 8×10^4 células/pocillo en 500 μ L de medio de cultivo. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron expuestas a los tratamientos a una concentración de 25 Y 50 μ M de cada compuesto durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se realizó el marcaje durante 1 hora a 37°C en oscuridad con el marcador CaspACE. Tras el marcaje se recolectó el medio y las células adheridas fueron tripsinizadas para almacenarlas en tubos Ependorff de 1,5 mL para su posterior centrifugación (10 minutos a 1500 g). El sobrenadante se elimina y las células fueron resuspendidas en 500 μ L de PBS. Como control sin marcaje se utilizó células sin tratamiento, el control positivo fueron células sin tratar y macadas. Además, se utilizó un control tratado con solvente y marcadas con CaspACE, y por último, los tratamientos con los diferentes compuestos. Los histogramas obtenidos tras el análisis en citómetro de flujo utilizando el filtro FL1 se analizaron para evaluar el porcentaje de células con activación de caspasas, utilizando el software Cyflogic 1.2.1.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados del ensayo de Sulforodamina B se realizará mediante el software Mynstat, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular. Se analizarán los estadísticos descriptivos de los datos para determinar si cumplen con el supuesto de la distribución normal para utilizar pruebas paramétricas. De no cumplirse dicho supuesto, se utilizará la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Para el análisis estadístico, se trabajará con todas las concentraciones de los compuestos (5, 10, 25, 50 y 100 μ M) promediadas en las gráficas, debido a que se busca establecer que molécula hace la diferencia, independiente de la concentración utilizada.

RESULTADOS

Efecto citotóxico: Ensayo con Sulforrodamina B

En inicio se estudió el efecto de los diferentes derivados de chalconas sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de sulforrodamina B. Este colorante se une a aminoácidos básicos de las proteínas de la célula, por lo tanto, permite determinar la inhibición del crecimiento mediante análisis colorimétrico, estimando indirectamente el número de células⁷³. El resultado de la prueba nos entrega la absorbancia de cada pocillo en estudio, que posteriormente expresado en porcentajes para estimar el efecto citotóxico luego de cada tratamiento. Este porcentaje es directamente proporcional a la viabilidad celular⁷⁴.

Análisis estadístico

En la tabla 2 se muestra el análisis estadístico descriptivo de los compuestos oxialquilados y dioxialquilados de chalconas, el cual determinó que las absorbancias no cumplen con los supuestos de la estadística paramétrica, particularmente la distribución normal ($p < 0,01$). Lo anterior se ve apoyado por el coeficiente de asimetría en que se observan un 33,3% con sesgo positivo, un 62,5% con sesgo negativo y sólo uno sin sesgo (4,2%). Respecto de la curtosis, tenemos un 33,3% son leptocurtosis, un 25% de platicurtosis y un 24% de mesocurtosis. Debido a que los compuestos no se distribuyen normalmente, se recurrió a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0,05$) entre la viabilidad celular de los diferentes compuestos, utilizando todos los valores de concentración (μM) en las gráficas.

Tabla 2: Estadística descriptiva de las absorbancias (%) de los compuestos oxialquilados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y dioxialquilados (L, N, M, O, P, Q, R, S y T), derivados de chalconas, y control negativo (Cn) y solvente (Cs) en las distintas líneas celulares.

LÍNEA CELULAR	COMPUESTOS	MÍNIMO (%)	MÁXIMO (%)	COEFICIENTE DE ASIMETRÍA	COEFICIENTE DE CURTOSIS	ESTADÍSTICO SHAPIRO-WILK	SHAPIRO-WILK P VALUE	N
HT-29	A B C D E F G H I J K Cs Cn	0,220	492,463	1,772	1,516	0,973	0,000	425
HT-29	A D F G H I Cs Cn	5,405	169,938	-0,319	-0,930	0,930	0,000	228
HT-29	L M N O P Q R S T Cs Cn	2,434	120,430	0,077	-1,546	0,887	0,000	254
HT-29	L N O Cs Cn	2,684	173,138	0,258	-1,284	0,876	0,000	242
HT-29	H P R T Cs Cn	5,008	122,163	0,300	-1,467	0,881	0,000	248
HT-29	25 26 Cs Cn	25,876	140,404	-1,276	2,207	0,857	0,000	120
MCF-7	A B C D E F G H I J K Cs Cn	1,580	135,918	-1,608	4,152	0,883	0,000	488
MCF-7	A D F G H I Cs Cn	2,796	142,093	-0,361	-1,354	0,894	0,000	223
MCF-7	L M N O P Q R S T Cs Cn	3,821	168,907	0,191	-0,757	0,960	0,000	259
MCF-7	L N O Cs Cn	2,449	147,726	0,035	-1,570	0,881	0,000	245
MCF-7	H P R T Cs Cn	5,431	116,441	0,056	-1,569	0,895	0,000	231
MCF-7	25 26 Cs Cn	26,472	124,773	-1,987	3,301	0,724	0,000	116
PC-3	A B C D E F G H I J K Cs Cn	1,274	155,384	-0,928	1,091	0,928	0,000	509
PC-3	A D F G H I Cs Cn	10,008	168,186	-0,117	-0,865	0,929	0,000	227
PC-3	L M N O P Q R S T Cs Cn	3,878	185,644	0,284	-0,977	0,938	0,000	258
PC-3	L N O Cs Cn	3,301	141,053	0,259	-1,477	0,878	0,000	242
PC-3	H P R T Cs Cn	4,277	130,833	0,415	-1,179	0,907	0,000	228
PC-3	25 26 Cs Cn	15,640	203,322	0,058	0,384	0,975	0,000	120
CON	A B C D E F G H I J K Cs Cn	10,975	108,981	-2,053	3,620	0,710	0,000	511
CON	A D F G H I Cs Cn	7,957	178,574	-0,161	-1,153	0,912	0,000	226
CON	L M N O P Q R S T Cs Cn	2,639	206,854	0,521	0,052	0,964	0,000	261
CON	L N O Cs Cn	3,000	132,810	-0,063	-1,697	0,854	0,000	248
CON	H P R T Cs Cn	4,708	117,048	0,189	-1,519	0,888	0,000	239
CON	25 26 Cs Cn	47,458	47,458	-1,297	2,977	0,906	0,000	120

Línea celular HT-29:

Primero, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (KW) sobre la viabilidad de los compuestos oxialquilados derivados de chalconas en la línea celular HT-29 para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos y los controles negativo y solvente. (Tabla 3).

En la Figura 13 se observa que las viabilidades celulares se agrupan en dos conjuntos de compuestos: ABCDE y FGHIJK. Se procedió a analizar los dos grupos por separado, sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa en ellos ($\alpha > 0,05$), es decir ningún compuesto haría la diferencia en cada conjunto.

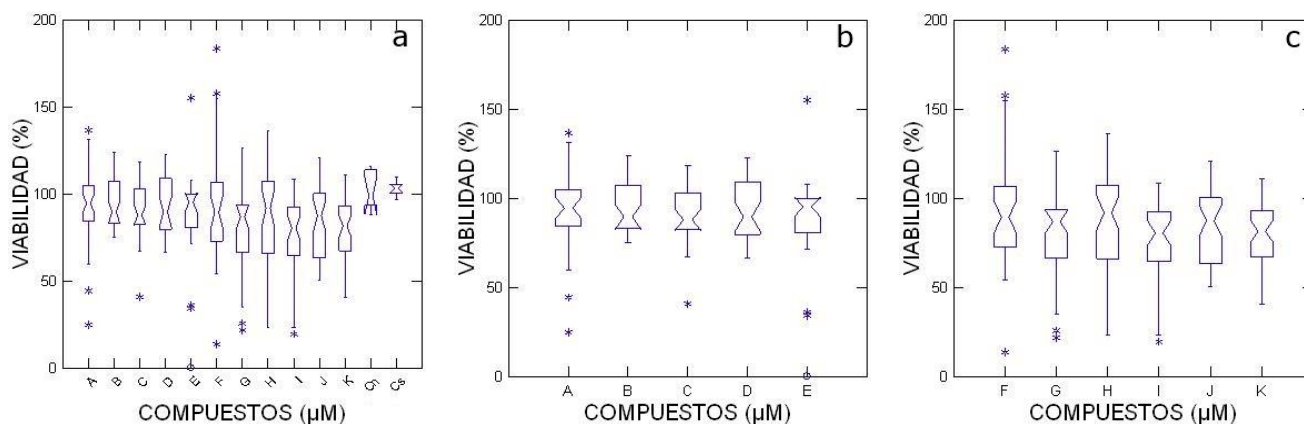


Figura 13: Gráficos de caja y bigotes de la viabilidad celular de los compuestos oxialquilados derivados de chalcona en la línea celular HT-29. (a) compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, Cn y Cs, (b) compuestos A, B, C, D y E, (c) compuestos F, G, H, I, J y K. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

Luego del análisis, se descartaron 5 compuestos por obtener alto porcentaje de viabilidad: B (96%), C (96%), E (100%), J (84%) y K (81%). Los compuestos A, D, F, G, H e I fueron seleccionados para realizar nuevos ensayos de viabilidad. La prueba de KW indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p=0,009$). Al sospechar que el compuesto H es quien haría esta diferencia (Figura 14), se excluyó y se realizó nuevamente la prueba, la cual indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa ($\alpha>0,05$) entre los restantes compuestos, por lo tanto, H sería quién hace la diferencia.

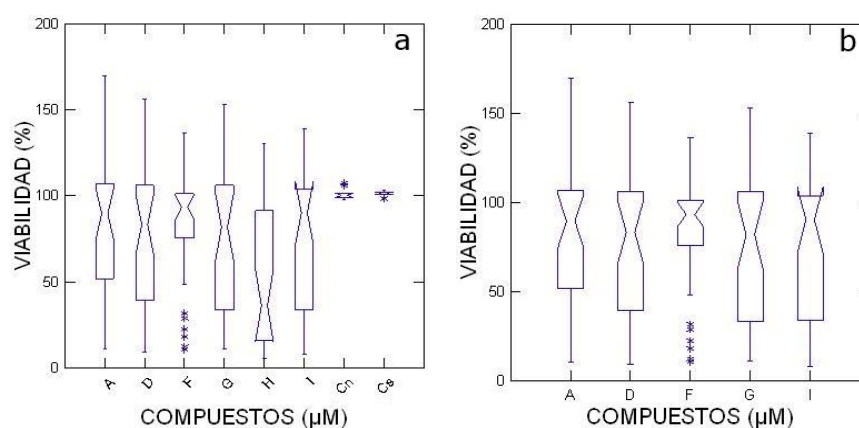


Figura 14: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos oxialquilados derivados de chalcona en la línea celular HT-29. (a) compuestos A, D, F, G, H, I, Cn y Cs, (b) compuestos A, D, F, G e I. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

Al analizar la viabilidad de estos 6 compuestos, obtenemos que en promedio el compuesto A tiene una viabilidad de 80%, D, 77%, F, 82%, G, 78% e I (76%). El compuesto H sería quién mayor efecto tiene sobre la viabilidad, alcanzando en un 52%.

Posteriormente se analizaron los compuestos dioxiálquilados de chalcona L, M, N, O, P, Q, R, S, y T junto con los controles negativo y solvente (tabla 3). El análisis mostró que existe diferencia estadísticamente significativa en ellos ($p=0,000$) y, además, que se pueden agrupar en 3 conjuntos de compuestos con viabilidad celular parecida, LNO, MQS y PRT (Figura 15). El análisis de estos grupos dio como resultado que los grupos LNO y MQS no presentan diferencias ($\alpha>0,05$) entre los compuestos que los componen. Tras lo cual el grupo de compuestos PRT se comparó al compuesto H (oxialquilado) que había presentado diferencias significativas entre los compuestos oxialquilados. El resultado indicó que hay diferencia entre estos cuatro compuestos, y que estos cuatro compuestos forman dos subgrupos, HP y RT, donde H y P fueron quienes presentan menor viabilidad celular, por lo que se pusieron nuevamente a prueba, para identificar si alguno de ellos era diferente, sin embargo, ella indicó que ninguno hace la diferencia ($\alpha>0,05$).

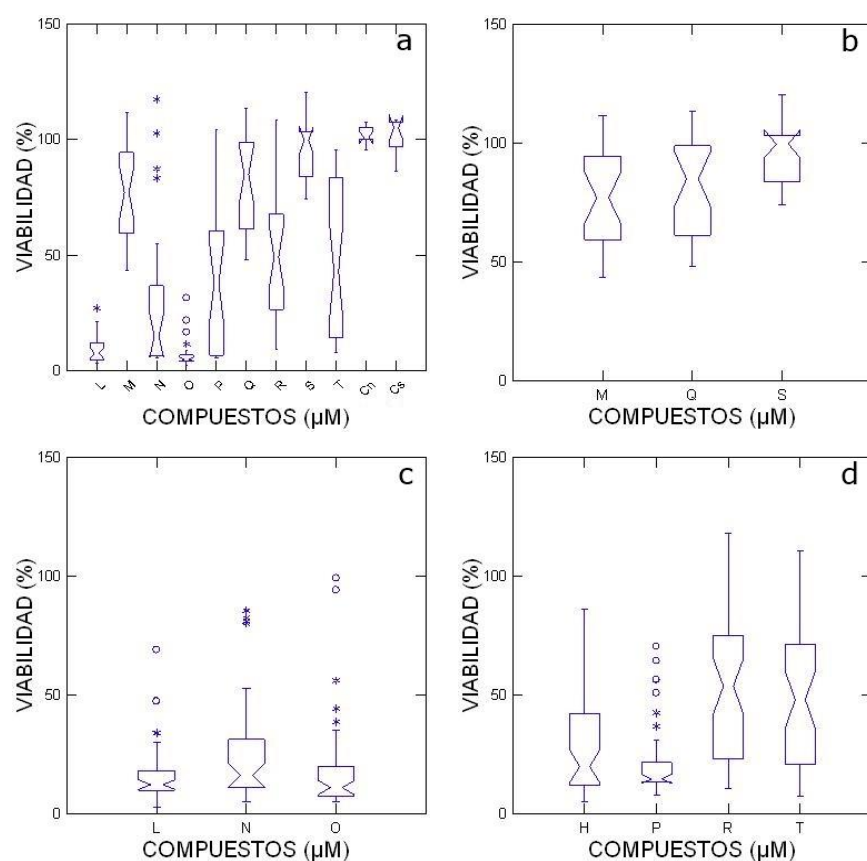


Figura 15: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos dioxiálquilados derivados de chalcona en la línea celular HT-29. (a) compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y Cn, (b) compuestos M, Q y S, (c) compuestos L, N y O, (d) compuestos H, P, R y T. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

Los compuestos M, Q y S fueron descartados debido a su alta viabilidad. En el caso de M esta alcanzó en promedio un 77%, Q un 80% y S un 96%. Luego, se realizaron nuevos ensayos con las moléculas restantes a las concentraciones 25 50 y 100 μM (Fig 14c y 14d)

Los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron en promedio para el compuesto H 33%, para P 21%, para R 54% y para T 49%. Los compuestos L, N y O son quienes presentar la menor viabilidad en promedio, 17% para L, 26% para N y 20% en el caso de O.

Además, se analizaron las moléculas 25 y 26 con la prueba de Kruskal Wallis, indica que si bien hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos y los controles ($p=0,001$) los porcentajes de viabilidad de estas moléculas alcanzan el 80% (25) y 97% (26), en consecuencia, su efecto es bajo.

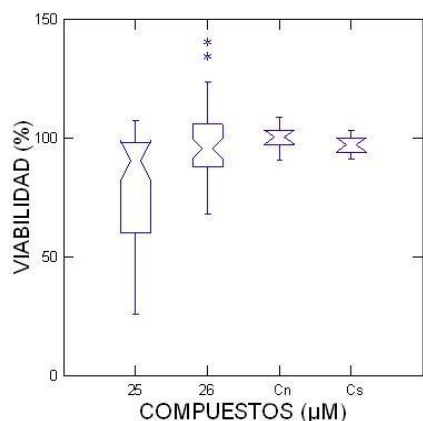


Figura 16: Gráfico de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos 25 y 26, y control negativo (Cn) y solvente (Cs) en la línea celular HT-29.

Tabla 3: Comparación entre compuestos oxialquilados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y dioxialquilados (L, N, M, O, P, Q, R, S y T), derivados de chalconas y su efecto sobre la línea celular HT-29. Cs: Control solvente; Cn: Control negativo; K-W: prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; gl: grados de libertad.

Línea celular	Comparación entre:	Hipótesis estadística	K-W p value	gl	Interpretación estadística	Interpretación biológica	Figura
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y los Cs y Cn?	H ₀ : $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	12	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos: ABCDEF y GHJK.	12a
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D y E?	H ₀ : $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,795	4	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	12b
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos F, G, H, I, J y K?	H ₀ : $\mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,241	5	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	12c
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, F, G, H, I, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_A = \mu_D = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,009	7	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos, ADFGI y H.	13a
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, G, F e I?	H ₀ : $\mu_A = \mu_D = \mu_G = \mu_F = \mu_I = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,201	6	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El compuesto H haría la diferencia.	13b
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_L = \mu_M = \mu_N = \mu_O = \mu_P = \mu_Q = \mu_R = \mu_S = \mu_T = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	10	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían 3 grupos, MQS, LNO y PRT.	14a
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos L, N y O?	H ₀ : $\mu_L = \mu_N = \mu_O = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,312	2	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	14b
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos M, Q y S?	H ₀ : $\mu_M = \mu_Q = \mu_S = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,002	2	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Uno o más compuestos tendrían efectos distintos.	14c
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos M y Q?	H ₀ : $\mu_M = \mu_Q = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : $\mu_M \neq \mu_Q$	0,516	1	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El compuesto S sería diferente.	14c
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos H, P, R y T?	H ₀ : $\mu_H = \mu_P = \mu_R = \mu_T = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	3	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos, HP y RT. H y P tendría mayor efecto que R y T.	14d
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos H y P?	H ₀ : $\mu_H = \mu_P = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : $\mu_H \neq \mu_P$	0,134	1	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	No habría diferencia entre H y P.	14d
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos 25, 26, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_{25} = \mu_{26} = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,001	3	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habría diferencia entre los compuestos.	15
HT-29	¿Existen diferencias entre los compuestos 26 Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_{26} = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,446	2	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	25 sería diferente, sin efecto en la viabilidad celular.	15

Línea celular MCF-7:

Con relación al efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos derivados de chalconas en la línea celular MCF-7 se procedió a determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 4).

En el caso de esta línea, los porcentajes de viabilidad de los compuestos oxialquilados se agrupan en tres conjuntos, por un lado, ABCDE y G, luego F y H, y IJK, con diferencia significativa entre ellos ($p=0,000$). Por lo cual, se procedió a analizar cada grupo por separado (Figura 17) con la misma prueba no-paramétrica, lo que indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa en ellos ($\alpha>0,05$), es decir el efecto sobre la viabilidad de los compuestos en cada conjunto es similar.

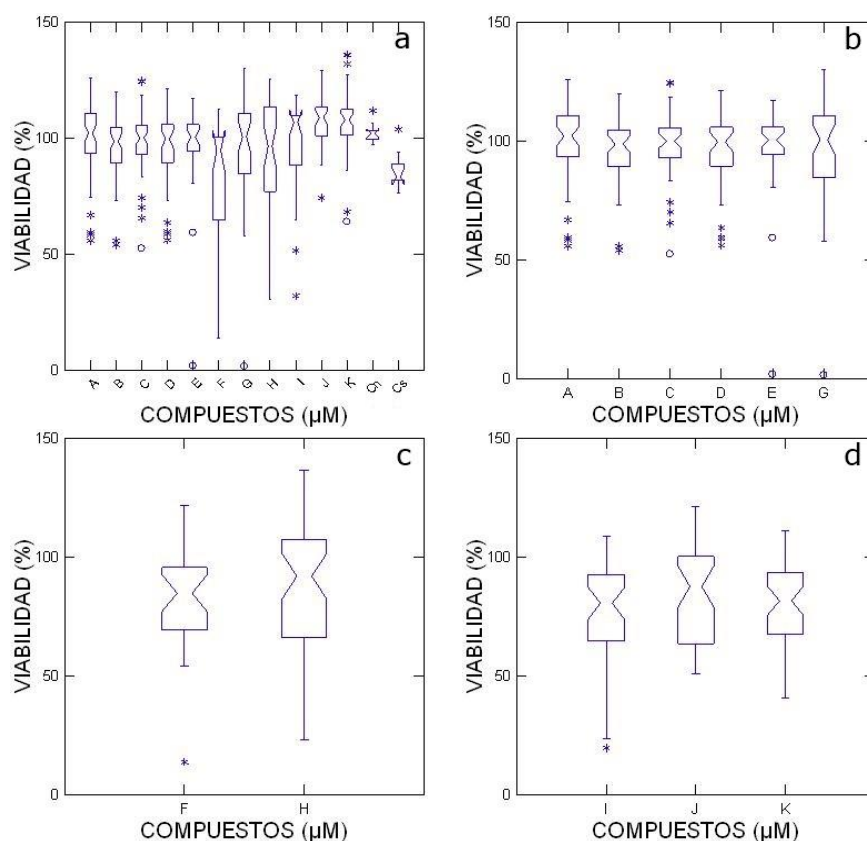


Figura 17: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos oxialquilados derivados de chalcona en la línea celular MCF-7. (a) compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, Cs y Cn, (b) compuestos A, B, C, D, E y G, (c) compuestos F y H, (d) compuestos I, J y K. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

Luego de estos resultados, discriminó entre los porcentajes de viabilidad y se excluyeron los compuestos B (95%), C (98%), E (97%), J (108%) y K (107%). El análisis continuó con los compuestos, A, D, F, G, H e I para realizar nuevos ensayos y se les aplicó la prueba de KW, la cual indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 4). Al sospechar que el compuesto H es quien haría esta diferencia (Figura 18), se excluyó y se realizó nuevamente la prueba, la cual indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa ($\alpha > 0,05$) entre los restantes compuestos, aun cuando parecía que el compuesto F también sería diferente, sin embargo, solo H sería quién hace la diferencia.

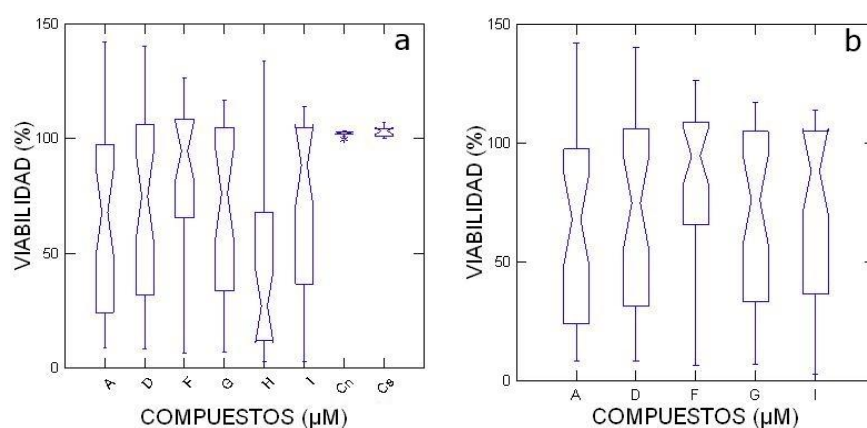


Figura 18: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos oxialquilados derivados de chalcona en la línea celular MCF-7. (a) compuestos A, D, F, G, H, I, Cn y Cs, (b) compuestos A, D, F, G e I. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

Los porcentajes de viabilidad fueron los siguientes: A, 63%; D, 70%; F, 81%, G, 71% e I 74%. El compuesto H presentó el mayor efecto en la viabilidad, alcanzando en promedio un 45%.

A continuación, se analizaron los compuestos dioxicilados de chalcona L, M, N, O, P, Q, R, S, y T, junto con los controles negativo y solvente (tabla 4). El análisis mostró que existe diferencia estadísticamente significativa en ellos ($p=0,000$) y, además, que se forman 3 grupos de compuestos con viabilidad similar, LNO, MQS y PRT (Figura 19). El análisis de estos grupos dio como resultado que los compuestos que los conforman no presentan diferencias entre sí en los grupos LNO y MQS ($\alpha>0,05$). Luego el grupo PRT se le comparó con el compuesto H, quién presentó diferencia estadísticamente significativa entre los compuestos oxialquilados. Como resultado se obtuvo que si hay diferencia entre estos cuatro compuestos, los cuales forman dos subgrupos, HP y RT, donde H y P fueron quienes presentan menor porcentaje de viabilidad, por lo que fueron sometidos nuevamente a prueba para determinar si alguno de ellos era diferente, sin embargo, la prueba indica que ninguno hace la diferencia ($\alpha>0,05$).

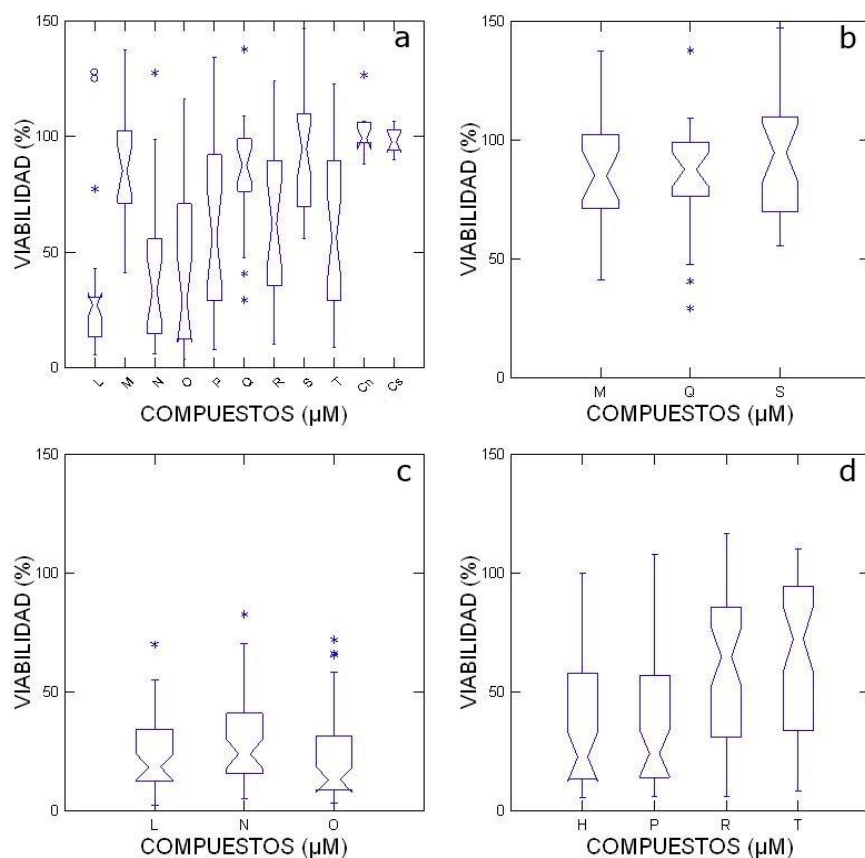


Figura 19: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos dioxicilados derivados de chalcona en la línea celular MCF-7. (a) compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y Cn, (b) compuestos M, Q y S, (c) compuestos L, N y O, (d) compuestos H, P, R y T. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

Los compuestos M, Q y S no siguieron en estudio debido a su alto porcentaje de viabilidad. En el caso de M esta alcanzó en promedio un 85%, Q, 84% y S 90%. Con los compuestos restantes se realizaron nuevos ensayos de viabilidad a las concentraciones 25 50 y 100 μM (Figura 19c y 19d).

Los porcentajes de viabilidad obtenidos para estos compuestos fueron: H 34%, P 37%, R 61% y T 66%. Los compuestos L, N y O son quienes presentar el menor porcentaje de viabilidad, siendo estos L 23%, N 31% y O 22%.

Además, se analizaron las moléculas 25 y 26 con la prueba de Kruskal Wallis (tabla 4), indica que si bien hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos y los controles ($p=0,001$) los porcentajes de viabilidad de estas moléculas alcanzan el 88% (25) y 94% (26), en consecuencia, su efecto es bajo (Figura 20).

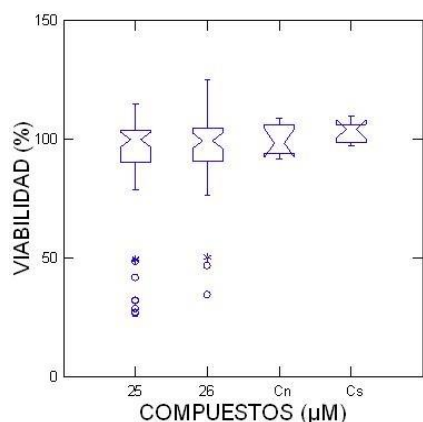


Figura 20: Gráfico de caja y bigotes de la viabilidad celular de los compuestos 25 y 26, y controles negativo (Cn) y solvente (Cs) sobre la línea celular MCF-7.

Tabla 4: Comparación entre compuestos oxialquilados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y dioxialquilados (L, N, M, O, P, Q, R, S y T), derivados de chalconas y su efecto en la línea celular MCF-7. Cs: Control solvente; Cn: Control negativo; K-W: prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; gl: grados de libertad.

Línea celular	Comparación entre:	Hipótesis estadística	K-W p value	gl	Interpretación estadística	Interpretación biológica	Figura
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y los Cs y Cn?	$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,000	12	Se rechaza H_0 . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían tres grupos: ABCDEG, FH e IJK.	16a
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D, E y G?	$H_0: \mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_G$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,574	5	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	16b
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos F y H?	$H_0: \mu_F = \mu_H$ $H_1: \mu_F \neq \mu_H$	0,064	1	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	16c
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos I J y K?	$H_0: \mu_I = \mu_J = \mu_K$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,133	2	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	16d
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, F, G, H, I, Cs y el Cn?	$H_0: \mu_A = \mu_D = \mu_F = \mu_G = \mu_H$ $= \mu_I = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,000	7	Se rechaza H_0 . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos, ADFGI y H.	17a
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, G, F e I?	$H_0: \mu_A = \mu_D = \mu_G = \mu_F = \mu_I$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,306	4	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	El compuesto H haría la diferencia.	17b
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y el Cn?	$H_0: \mu_L = \mu_M = \mu_N = \mu_O = \mu_P = \mu_Q = \mu_R = \mu_S = \mu_T = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,000	10	Se rechaza H_0 . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían 3 grupos, MQS, LNO y PRT.	18a
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos L, N y O?	$H_0: \mu_L = \mu_N = \mu_O$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,096	2	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	18b
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos M, Q y S?	$H_0: \mu_M = \mu_Q = \mu_S$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,652	2	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	18c
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos H, P, R y T?	$H_0: \mu_H = \mu_P = \mu_R = \mu_T$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,000	3	Se rechaza H_0 . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos, HP y RT. H y P tendría mayor efecto que R y T.	18d
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos H y P?	$H_0: \mu_H = \mu_P$ $H_1: \mu_H \neq \mu_P$	0,675	1	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	No habría diferencia entre H y P.	18d
MCF-7	¿Existen diferencias entre los compuestos 25, 26, Cs y el Cn?	$H_0: \mu_{25} = \mu_{26} = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ $H_1: \text{al menos uno es distinto}$	0,236	2	No se rechaza H_0 . Ningún compuesto hace la diferencia.	Efecto similar entre los compuestos y controles.	19

Línea celular PC-3

Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa, se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis a los porcentajes de viabilidad (Tabla 5).

Los resultados indican que hay diferencia estadísticamente significativa en las absorbancias, y se pueden dividir en dos conjuntos, ABCDEF y GHIJK (Tabla 5). Por lo tanto, se realizó la prueba no-paramétrica de Kruskal Wallis para analizar cada conjunto por separado (Figura 20). La prueba indica que no hay diferencia estadísticamente significativa en el conjunto ABCDEF en ellos ($\alpha > 0,05$), es decir ningún compuesto haría la diferencia. En cambio, si la hay en el grupo de GHIJK, por lo que hizo nuevamente la prueba sin el compuesto H, debido a que en el gráfico caja y bigotes se observa levemente diferente a los demás compuestos, y en esa ocasión, la prueba dio como resultado que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($\alpha > 0,05$). Según estos resultados, el compuesto H sería quién produce la diferencia en ese grupo.

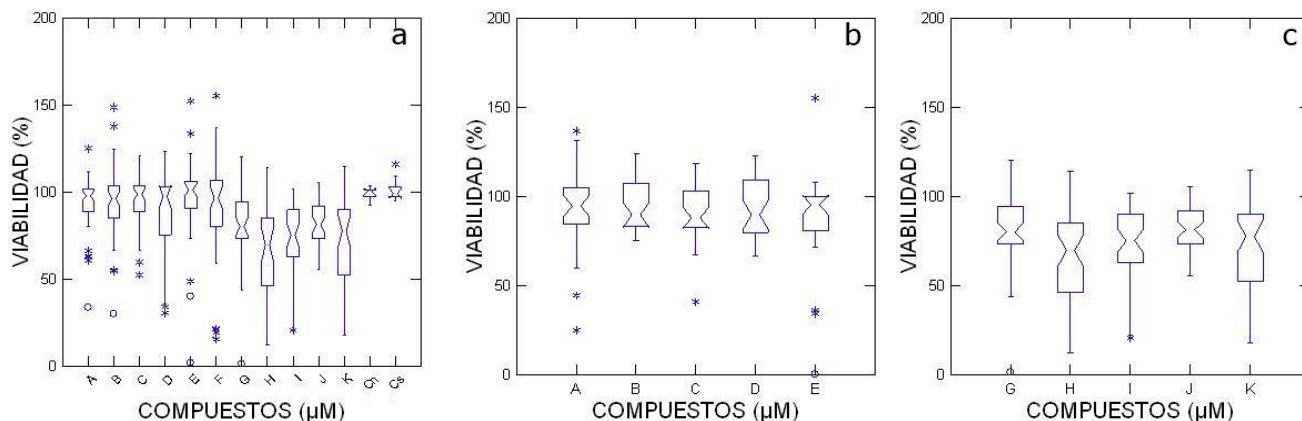


Figura 20: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos oxialquilados derivados de chalcona en la línea celular PC-3. (a) compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, Cs y Cn, (b) compuestos A, B, C, D, E y F, (c) compuestos G, H, I, J y K.

A partir de los porcentajes de viabilidad seleccionaron los compuestos, A, D, F, G, H e I y los restantes fueron descartados por poseer una viabilidad elevada: B (94%), C (95%), E (96%), J (83%) y K (71%). Se realizaron nuevos ensayos de viabilidad y sus resultados fueron analizados con Kruskal Wallis. Esta prueba indicó que hay diferencia estadísticamente significativa entre estos 6 compuestos (Tabla 5). En el gráfico de caja y bigotes se observa que el compuesto H es diferente al resto en cuanto a las absorbancias (Figura 21), entonces se excluyó y se realizó nuevamente la prueba, la cual muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa ($\alpha > 0,05$) entre los restantes compuestos. Este resultado nos dice que sería el compuesto H quién es diferente a los demás.

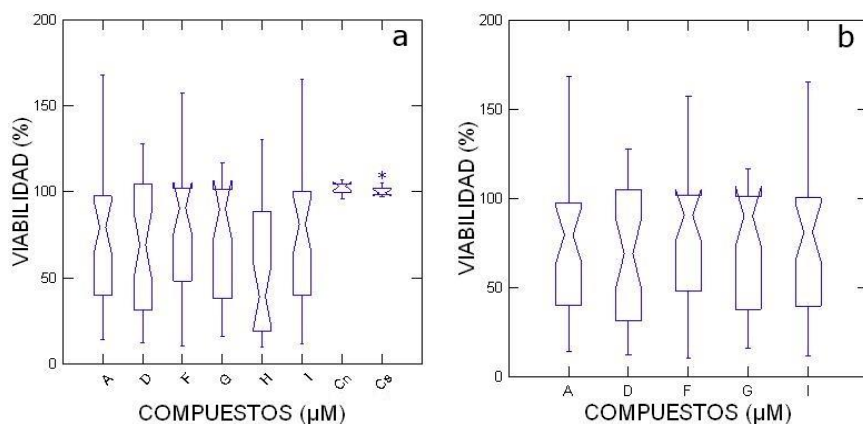


Figura 21: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos oxialquilados derivados de chalcona en la línea celular PC-3. (a) compuestos A, D, F, G, H, I, Cs y Cn, (b) compuestos A, D, F, G e I. Cs: Control solvente y Cn: Control negativo.

Los porcentajes de viabilidad entregados en este ensayo fueron: A 73%, d 69%, f 80% e I 77%. El compuesto H obtuvo un 54%, siendo el que presenta menor viabilidad sobre la línea celular.

Posteriormente, se estudiaron los compuestos dioxiálquilados de chalcona (L, M, N, O, P, Q, R, S, y T), junto a los controles negativo y solvente (tabla 5). El análisis estadístico arrojó como resultado que existe diferencia significativa en ellos ($p=0,000$). En el gráfico, se puede observar que los 9 compuestos se dividen en 3 grupos según su porcentaje de viabilidad celular, LNO, MQS y PRT (Fig 21a). Cada grupo se analizó para determinar si algún compuesto es diferente. El resultado indica que los compuestos que los conforman no presentan diferencias entre sí, en los grupos LNO y MQS ($\alpha>0,05$). A continuación, se estudió el grupo PRT junto al compuesto H (oxialquilado) quien presentó diferencia estadísticamente significativa entre los compuestos oxialquilados. El resultado muestra que si hay diferencia entre estos cuatro compuestos. Se observa que los compuestos se pueden agrupar en HP y RT (Figura 22d), donde H y P presentan menor porcentaje de viabilidad, por lo que fueron sometidos nuevamente a la prueba para identificar si alguno de ellos era diferente, sin embargo, la prueba indica que ninguno hace la diferencia ($\alpha>0,05$).

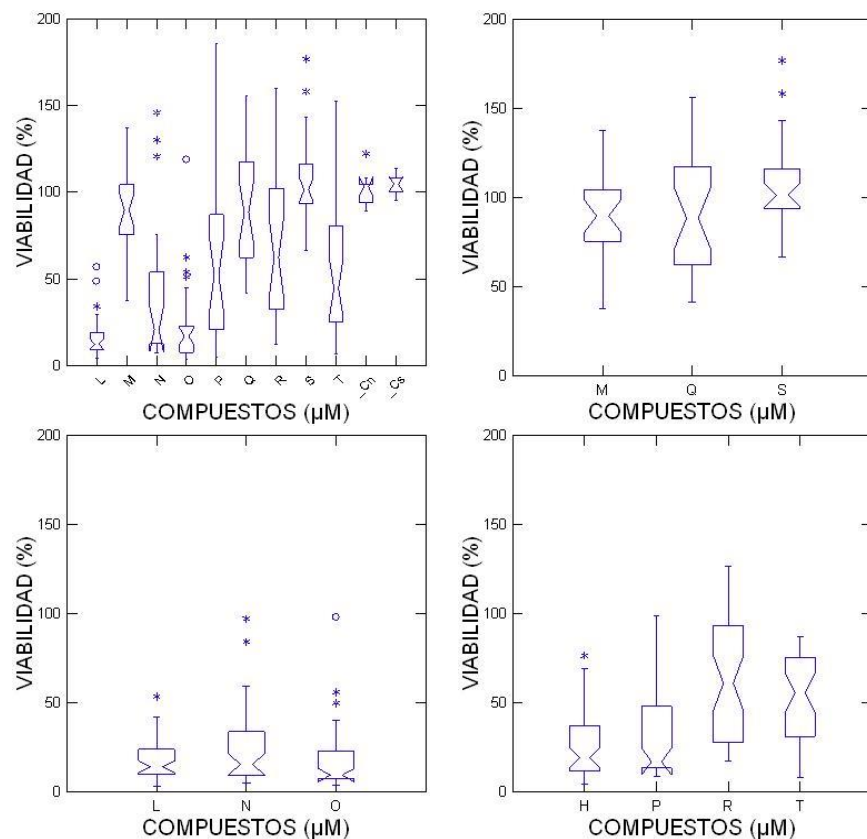


Figura 22: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos dioxiálquilados derivados de chalcona en la línea celular PC-3. (a) compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y Cn, (b) compuestos L, N y O, (c) compuestos M, Q y S, (d) compuestos H, P, R y T. Cs: Control solvente y Cn: Control negativo.

Los porcentajes de viabilidad más altos los obtuvieron los compuestos M (91%), Q (90%) y S (107%) por lo tanto no continuaron en estudio. Los restantes compuestos fueron analizados en nuevos ensayos a las concentraciones 25 50 y 100 μM (Fig 21c y 22d). El resultado sobre la viabilidad de los compuestos fue: H 25%, P 31%, R 61%, T 52%, L 18%, N 24% y O 16%. Estos 3 últimos compuestos son quienes presentan la menor viabilidad celular.

Finalmente se analizaron las moléculas 25 y 26, junto con los controles negativo y solvente, con la misma prueba no-paramétrica, indicando que existe diferencia entre ellos (tabla 5). Al ir descartando compuestos para determinar quién hace la diferencia, se descubre que son el 26 y el control solvente, sin embargo, su porcentaje de viabilidad es elevado: 100% para el compuesto 26 y 120% para 26, por lo tanto, su efecto citotóxico sería nulo. (Figura 23).

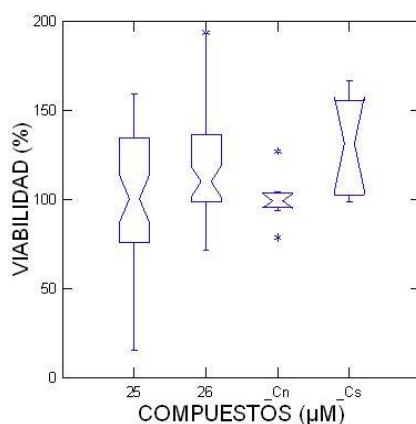


Figura 23: Gráfico de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos 25 y 26, controles negativo (Cn) y solvente (Cs) en la línea celular PC-3.

Tabla 5: Comparación entre compuestos oxialquilados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y dioxialquilados (L, N, M, O, P, Q, R, S y T), derivados de chalconas y su efecto en la línea celular PC-3. Cs: Control solvente; Cn: Control negativo; K-W: prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; gl: grados de libertad.

Línea celular	Comparación entre:	Hipótesis estadística	K-W p value	gl	Interpretación estadística	Interpretación biológica	Figura
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y los Cs y Cn?	H ₀ : $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	12	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos: ABCDEF y GHIJK.	19a
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D, E y F?	H ₀ : $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_F$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,622	5	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	19b
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos G, H, I, J y K?	H ₀ : $\mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,003	4	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Alguno de estos compuestos tendría un efecto diferente.	19c
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos G, I, J y K?	H ₀ : $\mu_G = \mu_I = \mu_J = \mu_K$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,087	3	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El compuesto H haría la diferencia.	19c
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, F, G, H, I, Cs y Cn?	H ₀ : $\mu_A = \mu_D = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,001	7	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos, ADFGI y H.	20a
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, G, F e I?	H ₀ : $\mu_A = \mu_D = \mu_F = \mu_G = \mu_I$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,842	4	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El compuesto H haría la diferencia.	20b
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y Cn?	H ₀ : $\mu_L = \mu_M = \mu_N = \mu_O = \mu_P = \mu_Q = \mu_R = \mu_S = \mu_T = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	10	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían 3 grupos, MQS, LNO y PRT.	21a
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos L, N y O?	H ₀ : $\mu_L = \mu_N = \mu_O$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,193	2	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	21b
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos M, Q y S?	H ₀ : $\mu_M = \mu_Q = \mu_S$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,049	2	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Alguno de estos compuestos tendría un efecto diferente.	21c
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos H, P, R y T?	H ₀ : $\mu_H = \mu_P = \mu_R = \mu_T$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	3	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habrían dos grupos, HP y RT. H y P tendría mayor efecto que R y T.	21d
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos H y P?	H ₀ : $\mu_H = \mu_P$ H ₁ : $\mu_H \neq \mu_P$	0,346	1	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	No habría diferencia entre H y P.	21d
PC-3	¿Existen diferencias entre los compuestos 25, 26, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_{25} = \mu_{26} = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,014	3	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	26 y Cs efecto por sobre el 100% de viabilidad.	22
PC-3	¿Existen diferencias entre el compuesto 25 y el Cn?	H ₀ : $\mu_{25} = \mu_{Cn}$ H ₁ : $\mu_{25} \neq \mu_{Cn}$	0,874	1	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	Efecto similar entre el compuesto y el control	22

Línea celular CoN:

Con el fin de establecer si existe diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad de los compuestos derivados de chalconas aplicados a la línea celular CoN y los controles negativo y solvente, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Tabla 6).

Al igual que en las líneas anteriores, se observa que hay diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000$) y que se pueden dividir en dos conjuntos, en este caso, ABC y DEFGHIJK (Figura 24) que presentan porcentajes similares. Para determinar si existe diferencia se realizó la prueba a cada grupo por separado (Tabla 6). El resultado indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa en ellos ($\alpha>0,05$), es decir ningún compuesto sería distinto en cada grupo.

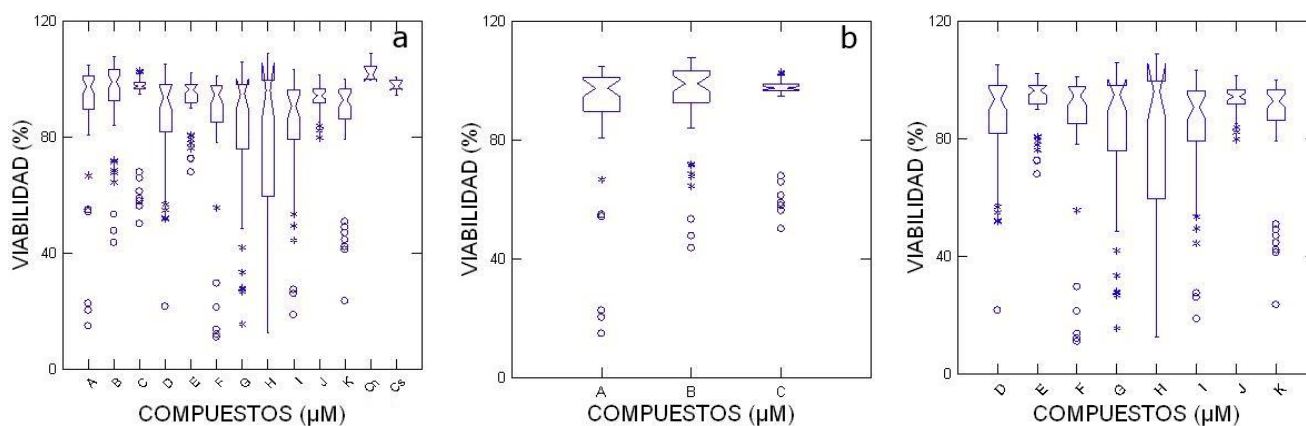


Figura 24: Gráficos de caja y bigotes de los porcentajes de viabilidad celular de los compuestos oxialquilados derivados de chalcona sobre la línea celular CoN. (a) compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, Cs y Cn, (b) compuestos A, B y C (c) compuestos D, E, F, G, H, I, J y K.

Los compuestos con mayor porcentaje de viabilidad no siguieron en estudio, corresponden a B (93%), C (92%), E (93%), J (94%) y K (85%). Se continuó trabajando con los restantes compuestos en ensayos de viabilidad celular

A los resultados se les aplicó la prueba, la cual muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($\alpha > 0,05$) (Tabla 6). En el gráfico de caja y bigotes se observa que H posee menor viabilidad respecto a los demás compuestos (Fig 24). Este hecho es apoyado por los porcentajes de viabilidad obtenidos: A 72%, D 77%, F 82%, G 76%, H 62% e I 81%.

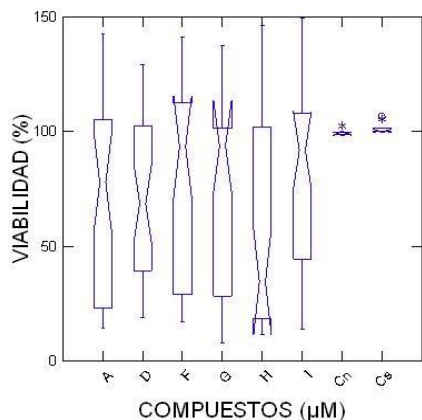


Figura 25: Gráficos de caja y bigotes de viabilidad celular de los compuestos oxialquilados derivados de chalcona A, D, F, G, H, I, Cs y Cn, en la línea celular CoN. Cn: Control negativo. Cs: Control solvente.

A continuación, se analizaron los compuestos dioxialquilados de chalcona L, M, N, O, P, Q, R, S, y T, junto a los controles negativo y solvente (tabla 5). El análisis estadístico arrojó como resultado que existe diferencia significativa en ellos ($p = 0,000$). En el gráfico, se puede ver que los compuestos se dividen en 3 grupos según su porcentaje de viabilidad: LNO, MQS y PRT (Figura 26a). Cada grupo se analizó para determinar si algún compuesto es diferente. El resultado indica que los compuestos que los conforman no presentan diferencias entre sí, en los grupos LNO y MQS ($\alpha > 0,05$). Luego se estudió el grupo PRT junto al compuesto oxialquilado H (viabilidad 62%). El resultado muestra que sí hay diferencia entre estos cuatro compuestos. A su vez, los compuestos se pueden agrupar en HP y RT (Fig 26d), donde H y P presentan menor porcentaje de viabilidad, por lo que fueron sometidos nuevamente a la prueba para identificar si alguno de ellos era diferente, sin embargo, la prueba indica que ninguno hace la diferencia ($\alpha > 0,05$).

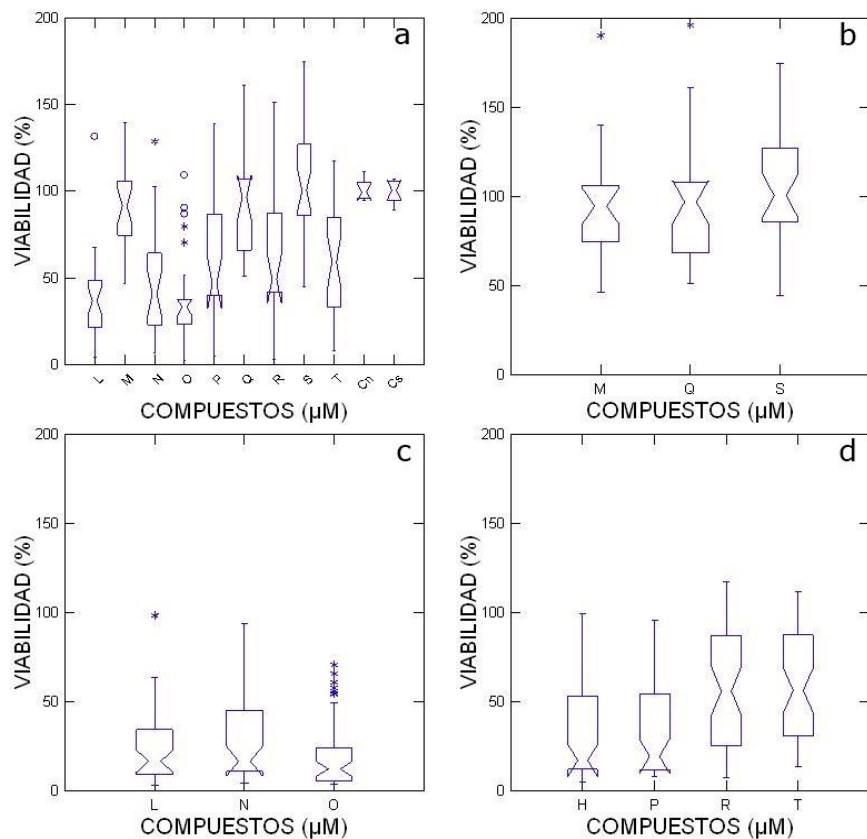


Figura 26: Gráficos de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos dioxiarquilados derivados de chalcona en la línea celular CoN. (a) compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y Cn, (b) compuestos L, N y O, (c) compuestos M, Q y S, (d) compuestos H, P, R y T. Cs: Control solvente y Cn: Control negativo.

Los compuestos con alto porcentaje de viabilidad M (94%), Q (98%) y S (108%) fueron descartados, y se continuó trabajando con los restantes. Los siguientes ensayos se realizaron a las concentraciones 25, 50 y 100 μM, y como resultado los porcentajes de cada compuesto son: H 31%, P 32%, R 58%, T 58%, L 25%, N 27% y O 20%. Nuevamente L, N y O resultan ser quienes menor porcentaje de viabilidad obtienen.

Se realizó el análisis de las moléculas 25 y 26, junto con los controles negativo y solvente, con la misma prueba no-paramétrica, dando como resultado que no que existe diferencia entre ellos ($\alpha > 0,05$) (tabla 6). Los porcentajes de viabilidad de estos compuestos son 99% para 25 y 103% para 26, por lo tanto, no poseen efecto sobre la viabilidad celular. (Figura 27).

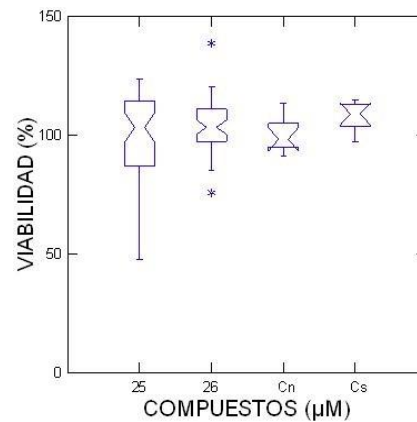


Figura 27: Gráfico de caja y bigotes de las absorbancias con compuestos 25 y 26, y controles negativo (Cn) y solvente (Cs) en la línea celular CoN.

Tabla 6: Comparación entre compuestos oxialquilados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K) y dioxialquilados (L, N, M, O, P, Q, R, S y T), derivados de chalconas y su efecto sobre la línea celular CoN. Cs: Control solvente; Cn: Control negativo; K-W: prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; gl: grados de libertad.

Línea celular	Comparación entre:	Hipótesis estadística	K-W p value	gl	Interpretación estadística	Interpretación biológica	Figura
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y los Cs y Cn?	H ₀ : $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D = \mu_E = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	12	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habría dos grupos: ABC y DEFGHIJK.	23a
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos A, B y C?	H ₀ : $\mu_A = \mu_B = \mu_C$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,208	2	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	23b
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos D, E, F, G, H, I, J y K?	H ₀ : $\mu_D = \mu_E = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_J = \mu_K$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,157	7	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	23c
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos A, D, F, G, H, I, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_A = \mu_D = \mu_F = \mu_G = \mu_H = \mu_I = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,341	7	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	24a
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos L, M, N, O, P, Q, R, S, T, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_L = \mu_M = \mu_N = \mu_O = \mu_P = \mu_Q = \mu_R = \mu_S = \mu_T = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	10	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habría 3 grupos, MQS, LNO y PRT.	24b
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos L, N y O?	H ₀ : $\mu_L = \mu_N = \mu_O$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,233	2	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	25a
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos M, Q y S?	H ₀ : $\mu_M = \mu_Q = \mu_S$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,347	2	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos.	25b
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos H, P, R y T?	H ₀ : $\mu_H = \mu_P = \mu_R = \mu_T$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,000	3	Se rechaza H ₀ . Al menos un compuesto es diferente.	Habría dos grupos, HP y RT. H y P tendría mayor efecto que R y T.	25c
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos H y P?	H ₀ : $\mu_H = \mu_P$ H ₁ : $\mu_H \neq \mu_P$	0,877	1	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	No habría diferencia entre H y P.	25d
CoN	¿Existen diferencias entre los compuestos 25, 26, Cs y el Cn?	H ₀ : $\mu_{25} = \mu_{26} = \mu_{Cs} = \mu_{Cn}$ H ₁ : al menos uno es distinto	0,315	3	No se rechaza H ₀ . Ningún compuesto hace la diferencia.	El efecto es similar entre los compuestos y no tendrían diferencia con los controles.	26

Finalmente, a partir de los análisis estadísticos y los porcentajes de viabilidad entregados por el ensayo con Sulforodamina B, se seleccionaron los compuestos H, L, N, O y P como se observa en la figura 28, para determinar el IC₅₀ y continuar los siguientes ensayos previstos en este trabajo.

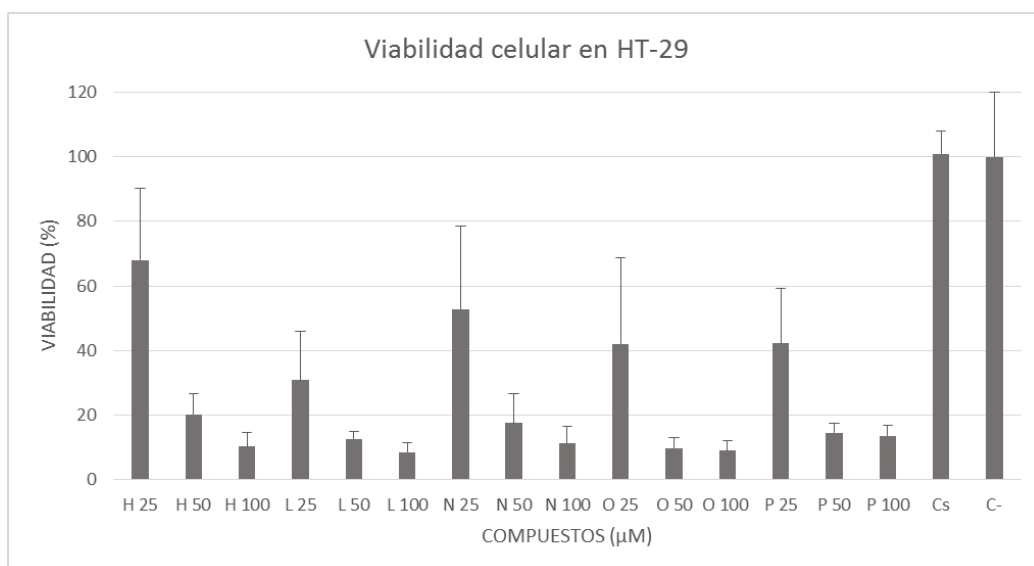


Figura 28: Histograma del efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos H, L, N, O y P sobre la línea celular HT-29, a las concentraciones 25, 50 y 100 µM y los controles solvente (Cs) y negativo (Cn).

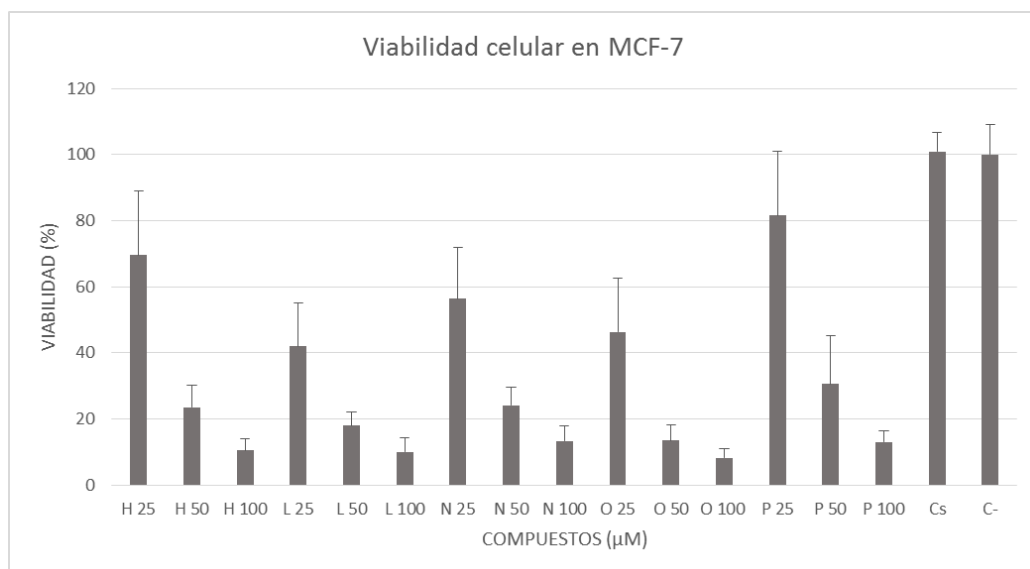


Figura 29: Histograma del efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos H, L, N, O y P sobre la línea celular MCF-7, a las concentraciones 25, 50 y 100 µM y los controles solvente (Cs) y negativo (Cn).

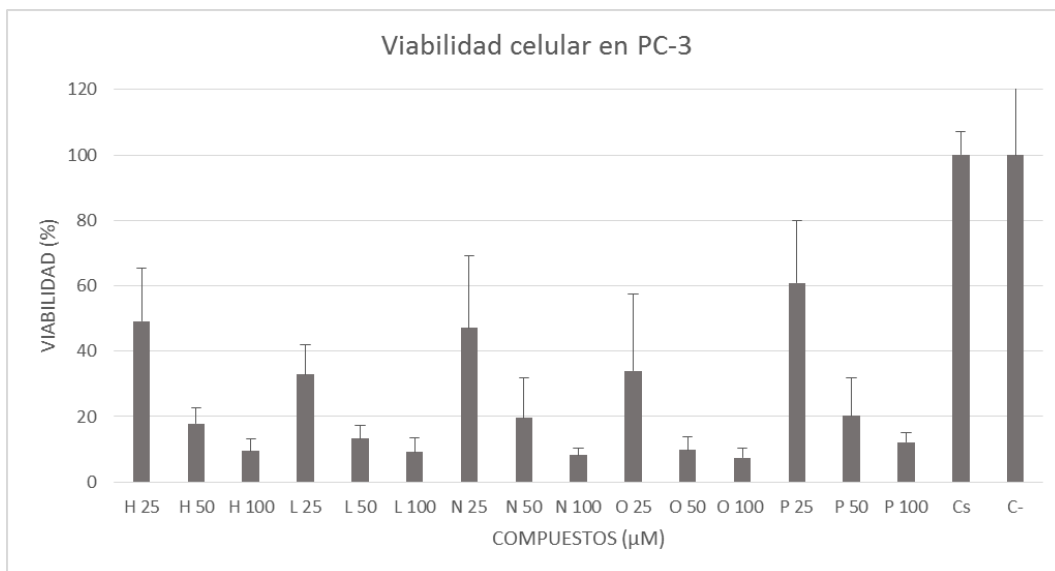


Figura 30: Histograma del efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos H, L, N, O y P sobre la línea celular PC-3, a las concentraciones 25, 50 y 100 μM y los controles solvente (Cs) y negativo (Cn).

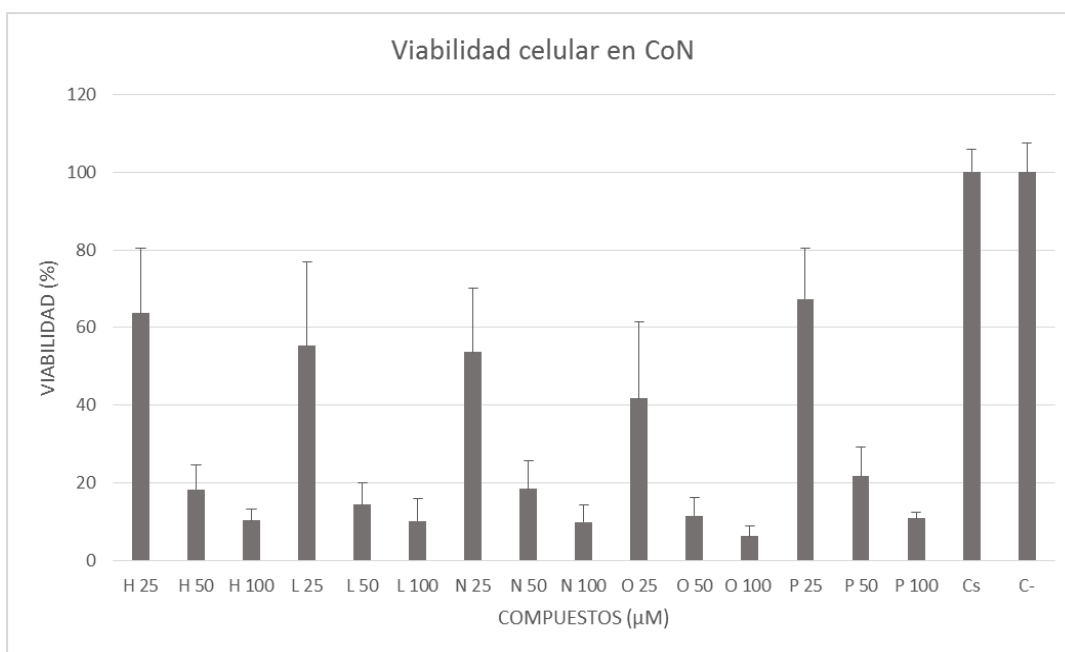


Figura 31: Histograma del efecto sobre la viabilidad celular de los compuestos H, L, N, O y P sobre la línea celular CoN, a las concentraciones 25, 50 y 100 μM y los controles solvente (Cs) y negativo (Cn).

Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)

Los valores de IC₅₀ obtenidos tras los ensayos para los compuestos H, L, N, O y P en todas las líneas celulares se muestran en la tabla 7. En la línea HT-29 el mayor efecto citotóxico fue producido por el compuesto O, en MCF-7 el compuesto L, en PC-3 el compuesto O y en la línea CoN el compuesto L. Los valores de IC₅₀ indican que los compuestos no actuarían selectivamente en células tumorales. Estos valores fueron calculados mediante el software SigmaPlot 11.0

Tabla 7: Concentración inhibitoria (μM) de los compuestos H, L, N, O y P, en las líneas celulares HT-29, MCF-7, PC-3 y CoN.

	HT-29	MCF-7	PC-3	CON
H	36,3+/-3.4	37,3+/-2,9	23,1+/-1.8	38,1+/-3.3
L	18,5+/-2.0	20,3+/-3.1	25+/-3.5	15,9+/-1.2
N	31,1+/-3.3	28,1+/-2.5	22+/-1.9	29,0+/-3.1
O	17,1+/-1.8	27,9+/-4.5	11,0+/-1.7	22,9+/-3.6
P	24,1+/-3.0	32,3+/-2.5	32,4+/-3.8	25,9+/-2.0

Morfología celular y nuclear

Microscopía con contraste de fase:

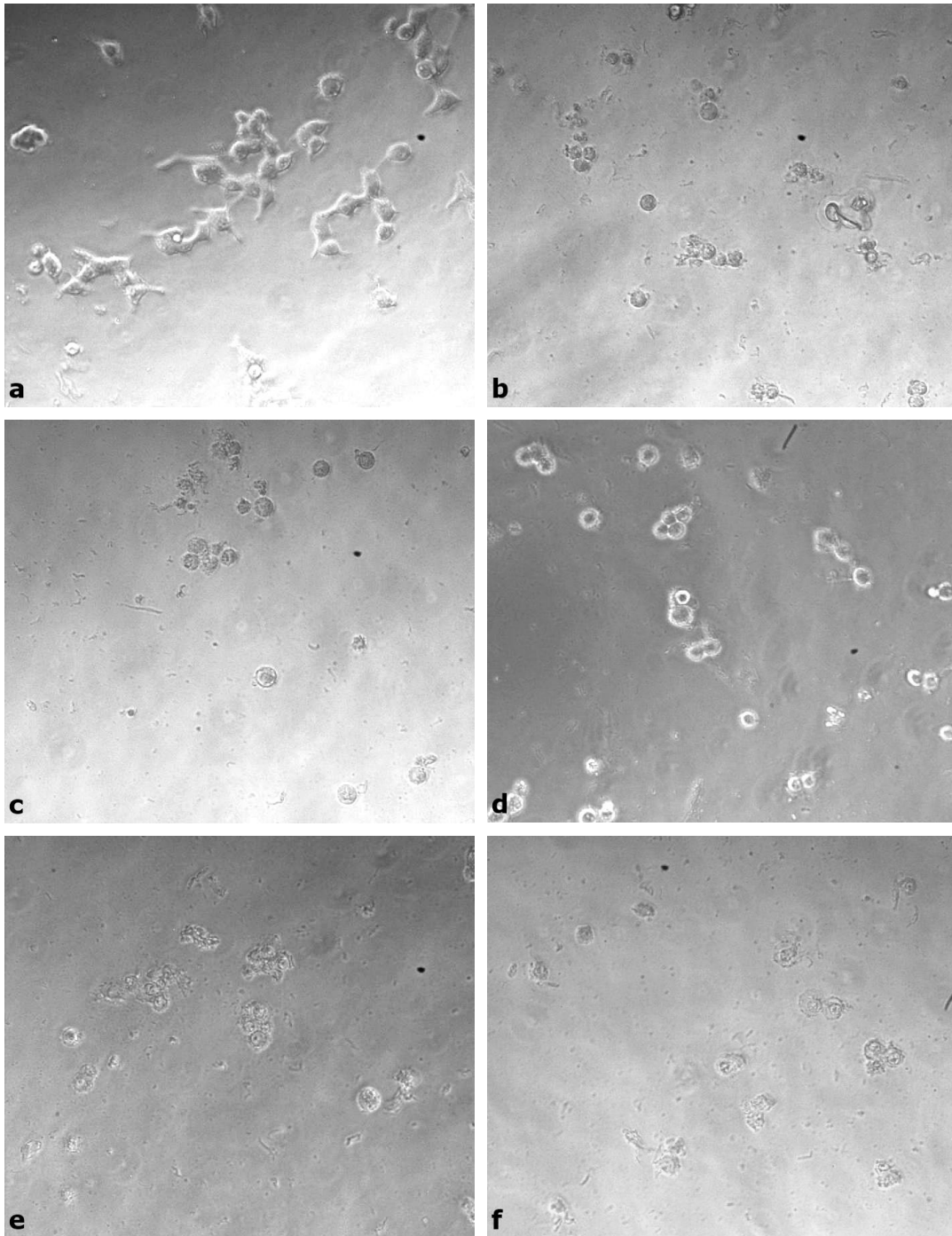


Figura 32: Microscopía de contraste de fase de la línea celular MCF-7 tratada con los distintos compuestos; a: Control negativo; b: Compuesto H; c: Compuesto L; d: Compuesto N; e: Compuesto O; f: Compuesto P, incubadas por 48 horas, concentración 50 μM , aumento 20X.

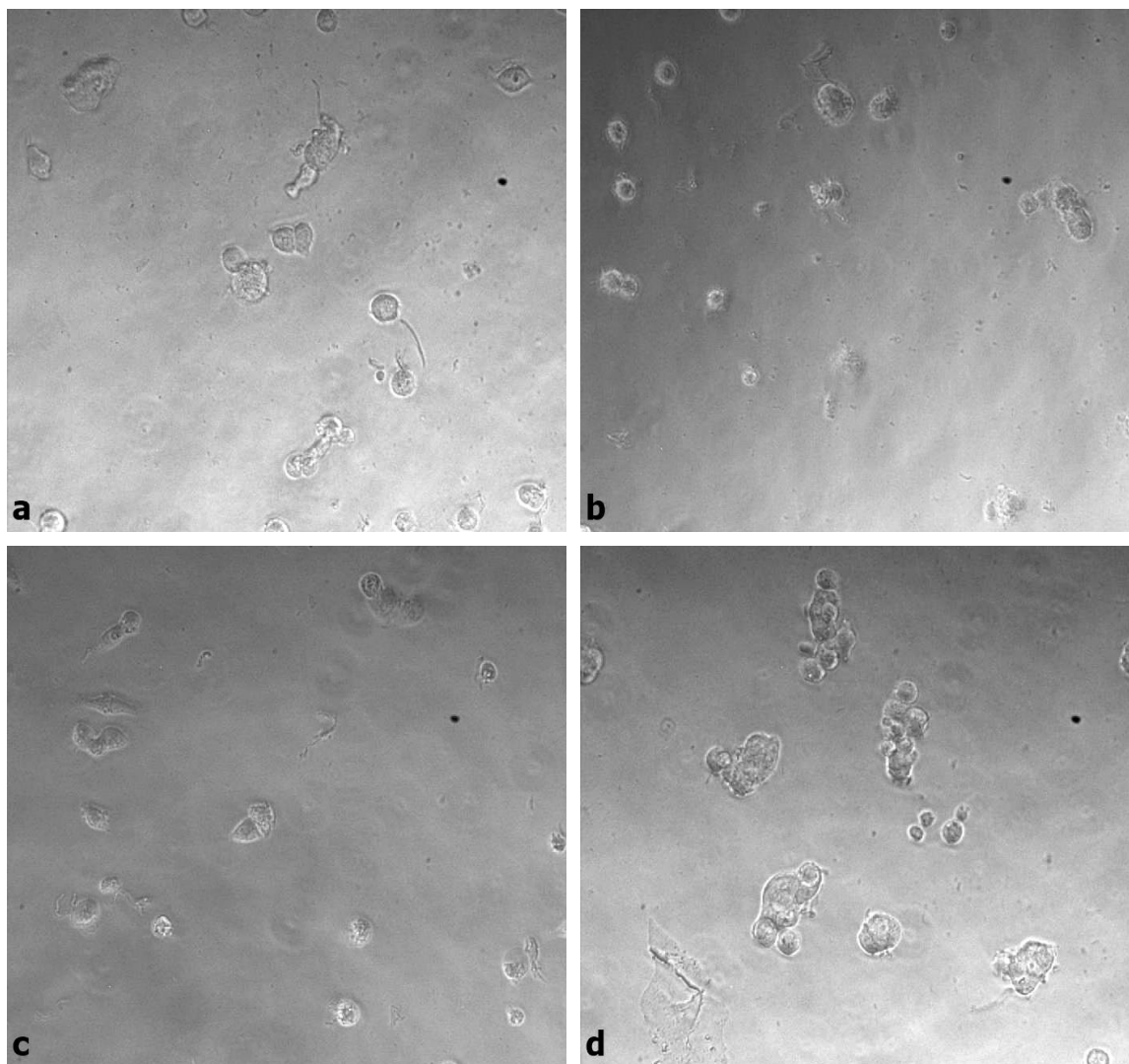


Figura 33: Microscopia de contraste de fase del compuesto H; a: Línea HT-29, b: Línea MCF-7, c: Línea PC-3, d: Línea CoN, incubadas por 48 horas, concentración 50 μ M, aumento 20X.

En las figuras 32 y 33 se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopia de contraste de fase de los compuestos H, L, N, O y P sobre las líneas celulares HT-29, MCF-7, PC-3 y CoN, tratadas con los compuestos a 50 μ m por 48 horas. Las células control corresponden a células sin tratar (Figura 32a). Las células tratadas con los compuestos se observan disminuidas en su tamaño y con pérdida de su forma fusada, adquiriendo una morfología redondeada. Además, hay disminución en la cantidad de células, lo que podría indicar que estas células experimentaron muerte celular. Tanto en las líneas celulares tumorales como en la no tumoral se observan dichos cambios.

Microscopia de fluorescencia:

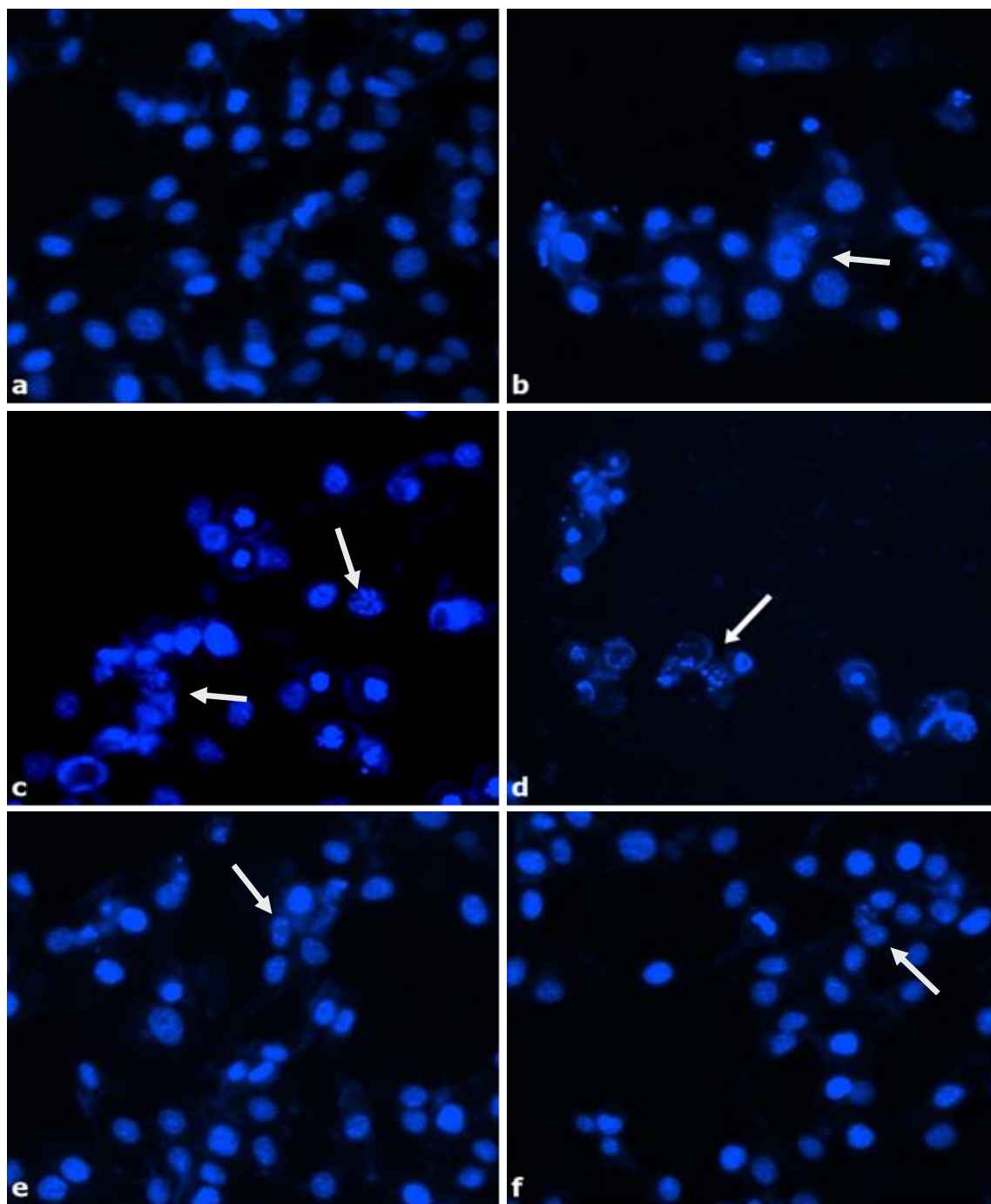


Figura 34: Microscopia de fluorescencia con tinción Hoechst de la línea celular MCF-7 tratada con los distintos compuestos; a: Control negativo; b: Compuesto H; c: Compuesto L; d: Compuesto N; e: Compuesto O; f: Compuesto P, incubadas por 48 horas, concentración 50 μ M, aumento 20X.

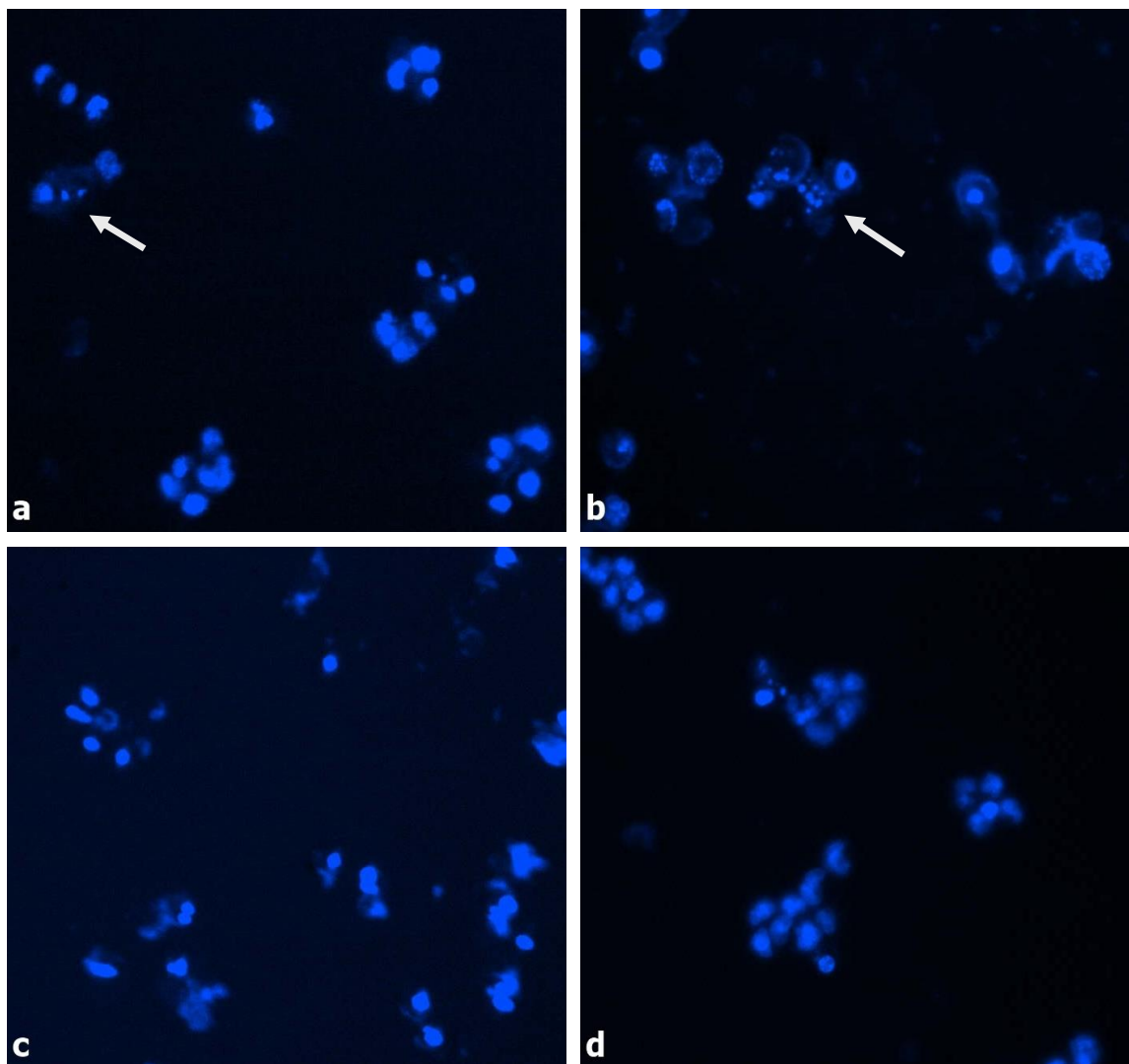


Figura 35: Microscopia de contraste de fase del compuesto N; a: Línea HT-29, b: Línea MCF-7, c: Línea PC-3, d: Línea CoN, incubadas por 48 horas, concentración 50 μ M, aumento 20X.

Para analizar cambios en la morfología nuclear se utilizó microscopia de fluorescencia y tinción con Hoechst (Figuras 34 y 35), un intercalante de DNA. Las células fueron tratadas con los compuestos por 48 horas a 50 μ m. En las células control, se conserva la morfología nuclear en comparación con las células tratadas, en las cuales se muestra condensación y/o fragmentación de la cromatina (flechas) en todas las líneas celulares utilizadas, lo cual podría asociarse a procesos de muerte celular por apoptosis.

Citometría de Flujo: Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio que favorece la producción de ROS sobre su inactivación por los sistemas de defensa antioxidante. La generación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de proteínas de la intermembrana al exterior de la mitocondria, puede conducir a la activación de múltiples modos de muerte celular⁷⁵.

El ensayo se realizó mediante citometría de flujo usando la sonda DCFH-DA aplicada a las células antes de ser tratadas por 3 horas con los compuestos H, L, N, O y P. En la figura 37 se observa el incremento en la intensidad de fluorescencia de los tratamientos (25 y 50 μM) respecto del control marcado sin tratar. Si bien todos generan ROS, los compuestos H y N son los que produjeron menor cantidad, y los compuestos L, O y P los que producirían más especies reactivas de oxígeno. A 25 μM se detectó mayor cantidad de ROS a través de la fluorescencia que ha 50 μM .

El aumento en la producción de ROS podría desencadenar un proceso apoptótico y estar asociado a los resultados anteriores (viabilidad, morfología celular y nuclear) y/o posteriores (pérdida del potencial de membrana mitocondrial y activación de caspasas).

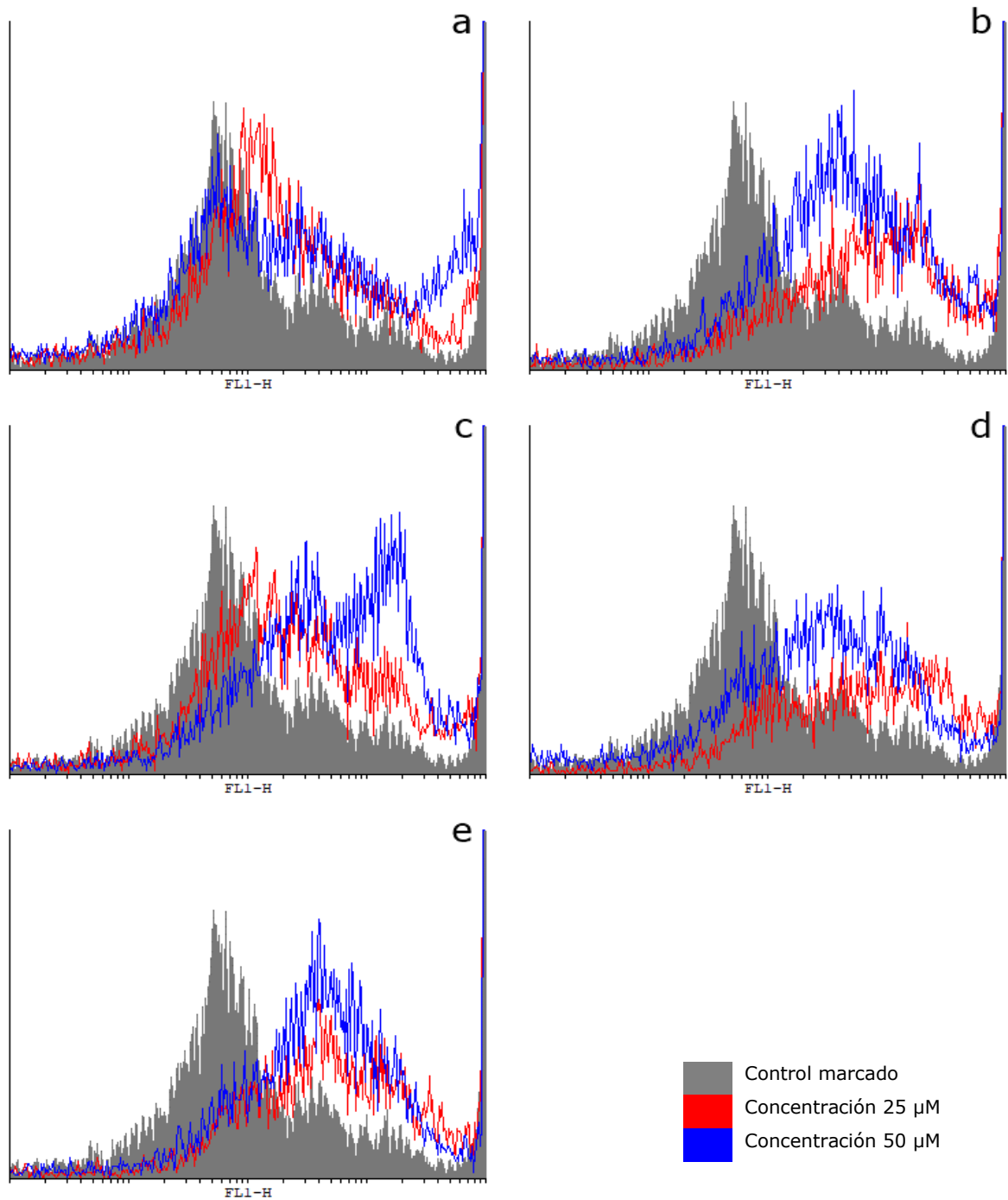


Figura 36: Histograma de citometría de flujo para examinar la generación de especies reactivas de oxígeno utilizando la sonda DCFH-DA en la línea celular HT-29. (a) Compuesto H. (b) Compuesto L. (c) Compuesto N. (d) Compuesto O. (e) Compuesto P.

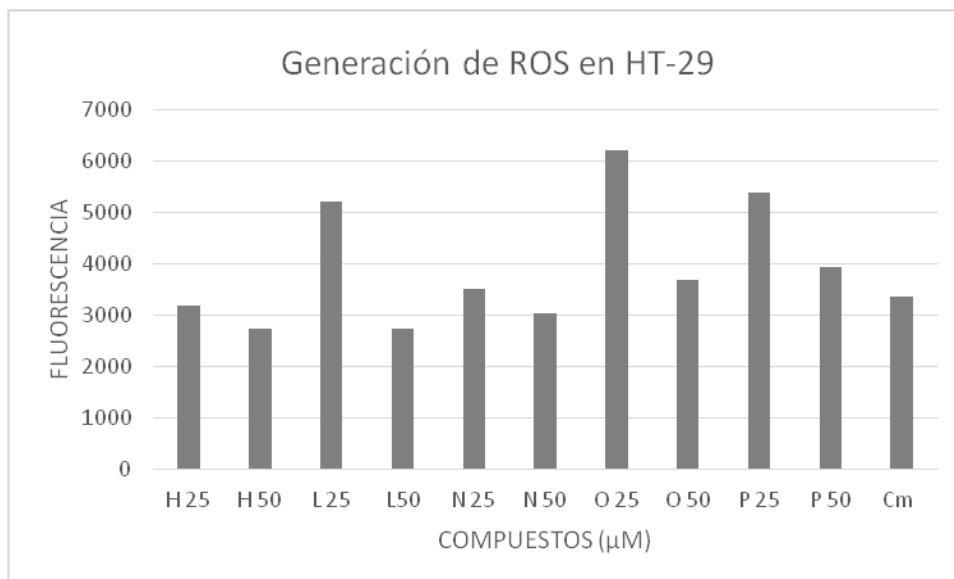


Figura 37: Intensidad de fluorescencia emitida debido a la generación de especies reactivas de oxígenos (ROS) producto de los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular HT-29.

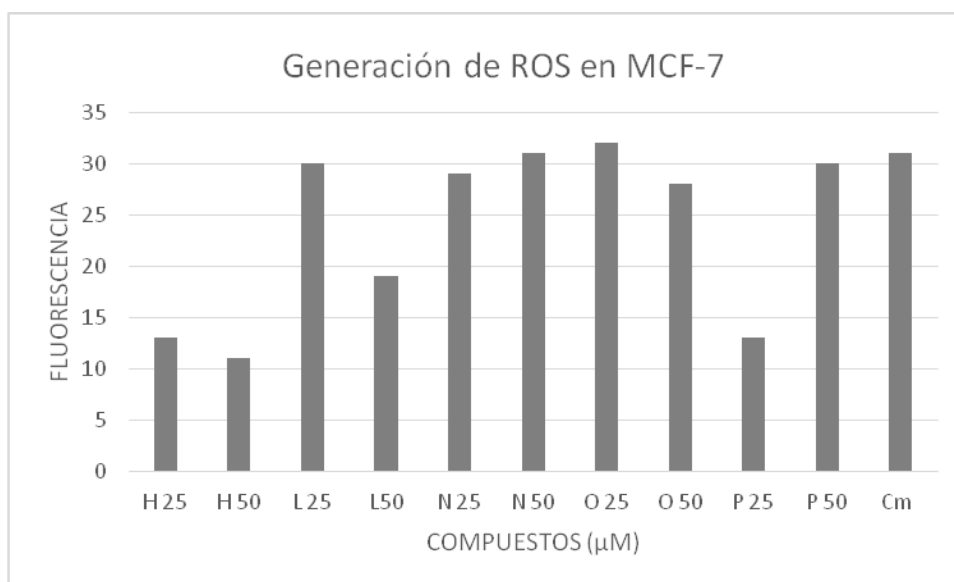


Figura 38: Fluorescencia emitida debido a la generación de especies reactivas de oxígenos (ROS) producto de los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular MCF-7.

Citometría de Flujo: Ensayo con Rodamina 123

El potencial de membrana mitocondrial resulta de la diferencia en el potencial eléctrico generado por el gradiente electroquímico a través de la membrana interna de la mitocondria⁷⁶. Se ha propuesto que cambios en la permeabilidad mitocondrial, podrían inducir la apoptosis. Cuando hay un exceso de calcio y fosfato, la mitocondria se despolariza y desacopla la cadena respiratoria. El poro de permeabilidad transicional mitocondrial favorece la cascada de caspasas y la muerte celular al liberar factores inductores de apoptosis como el citocromo c, factores de fragmentación del núcleo y proteínas como SMAC/ DIABLO que neutralizan los inhibidores endógenos de la apoptosis⁷⁵. La Rodamina 123 es un colorante fluorescente catiónico que se utiliza específicamente para marcar las mitocondrias activas sin efectos citotóxicos. Se utiliza para analizar el potencial de membrana mitocondrial en poblaciones de células apoptóticas. Este se distribuye de acuerdo con el potencial de membrana negativa a través de la membrana interna mitocondrial. La pérdida de potencial dará como resultado la salida del colorante de la mitocondria y, por lo tanto, la disminución de la intensidad de la fluorescencia⁷⁷.

En la figura 39 se muestran los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo utilizando Rodamina 123 en la línea celular HT-29 tratada con los compuestos H, L, N, O y P. Los tratamientos muestran disminución de la intensidad de fluorescencia respecto del control marcado, que difiere según cada compuesto y concentración utilizada. En la figura 40 se muestra el porcentaje de permeabilidad afectada, donde el compuesto L tuvo más efecto sobre el potencial de membrana. En cambio, en la línea MCF-7 (figura 41) el compuesto que tuvo mayor efecto en las células fue N. La pérdida del potencial de membrana se relaciona con los resultados de viabilidad y los cambios morfológicos observados en las células.

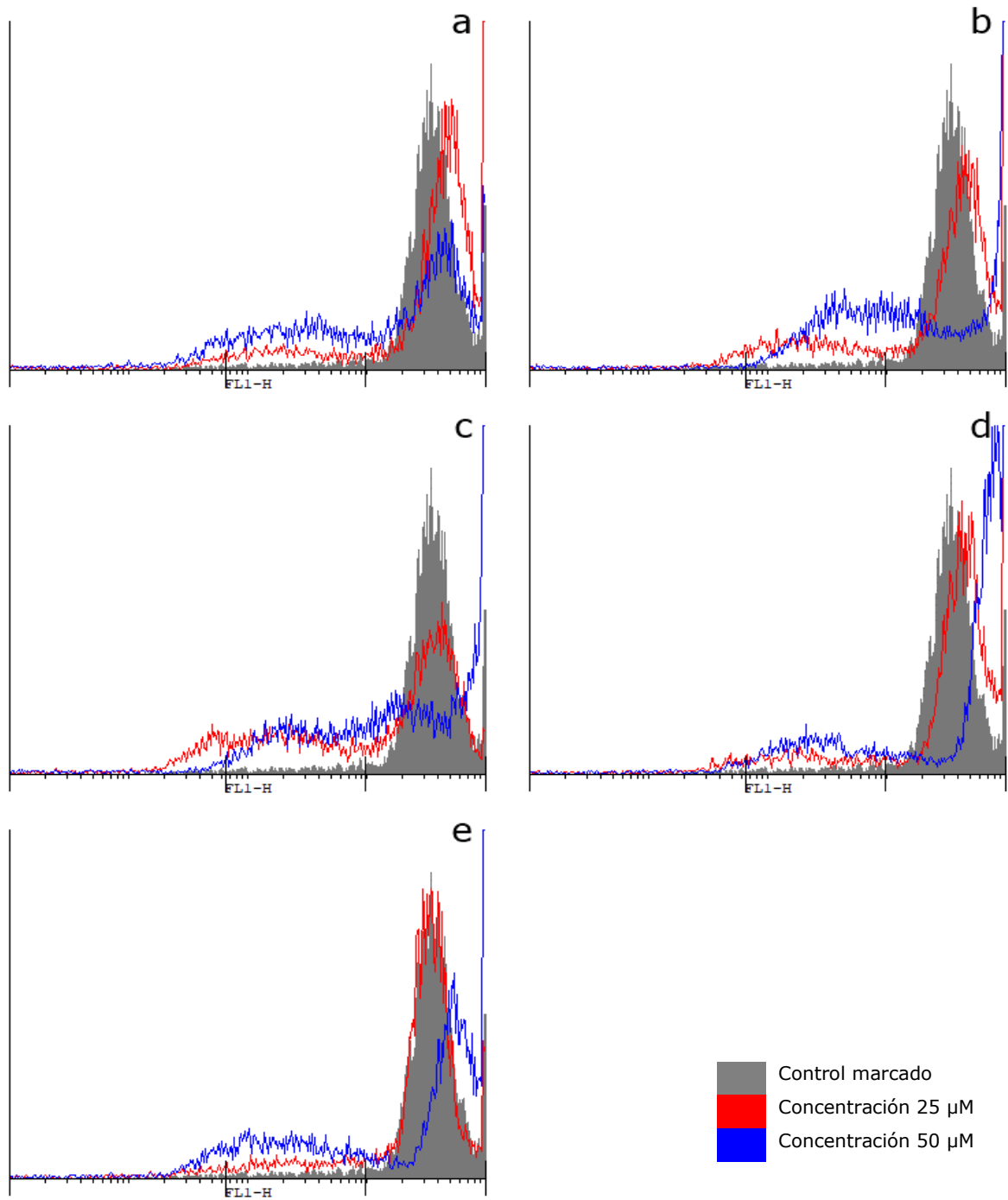


Figura 39: Histograma de citometría de flujo para examinar cambios en el potencial de membrana mitocondrial, utilizando la sonda Rodamina 123 en la línea celular HT-29. (a) Compuesto H. (b) Compuesto L. (c) Compuesto N. (d) Compuesto O. (e) Compuesto P.

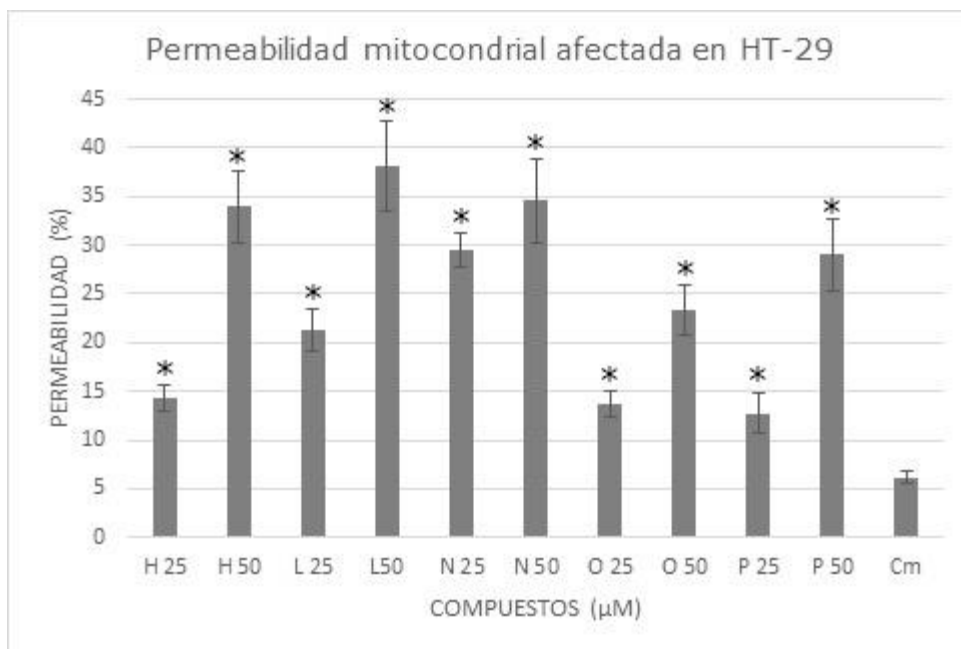


Figura 40: Porcentaje de células con permeabilidad mitocondrial afectada por los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular HT-29. Cm: Control marcado. *: Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

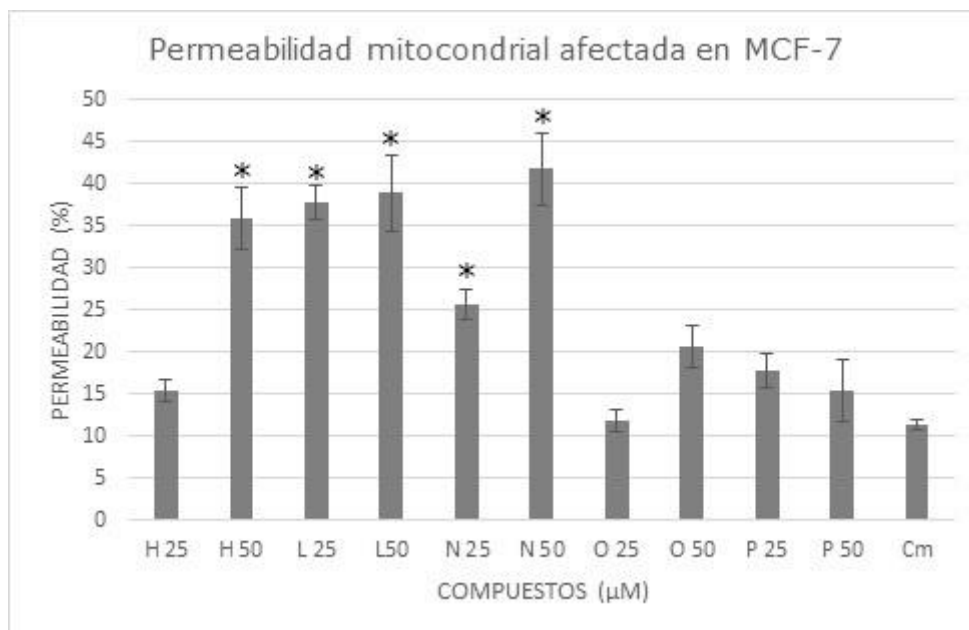


Figura 41: Porcentaje de células con permeabilidad mitocondrial afectada por los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular MCF-7. Cm: Control marcado. *: Estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Citometría de Flujo: Ensayo activación de caspasas

La apoptosis juega un rol fundamental en el desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares⁷⁸. La supresión de la maquinaria apoptótica es una característica distintiva del cancer⁴⁶. En el proceso de muerte celular programada, la activación de caspasas, enzimas del tipo cisteín-proteasa, que presentan un residuo de cisteína el cual media la escisión de otras proteínas, a la altura de un residuo de aspartato-cisteína, desempeña un papel clave en la apoptosis⁷⁹. Se han identificado al menos 14 caspasas distintas, de las cuales, 8 desempeñan papeles importantes durante este proceso⁸⁰. El marcador CaspACE™ se une a las caspasas activas, entonces, la fluorescencia será proporcional a la activación de caspasas tras los diferentes tratamientos.

En los histogramas se observa el desplazamiento de la intensidad de fluorescencia hacia la derecha luego de los tratamientos por 48 horas con los compuestos H, L, N, O y P (25 y 50 μM) en la línea celular MCF-7. La figura 43 muestra que, a mayor concentración, se produce mayor intensidad en la fluorescencia. El compuesto P fue quien presentó menos efecto. En la línea PC-3 se produce el mismo fenómeno visto en ROS, donde en ocasiones a 25 μM hay más efecto que a 50 μM . Los tratamientos podrían inducir la activación de caspasas en esta línea tumoral, correlacionándose con los ensayos realizados anteriormente. En HT-29 no se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia respecto del control marcado, por lo tanto, no se produciría activación de caspasas en esta línea celular.

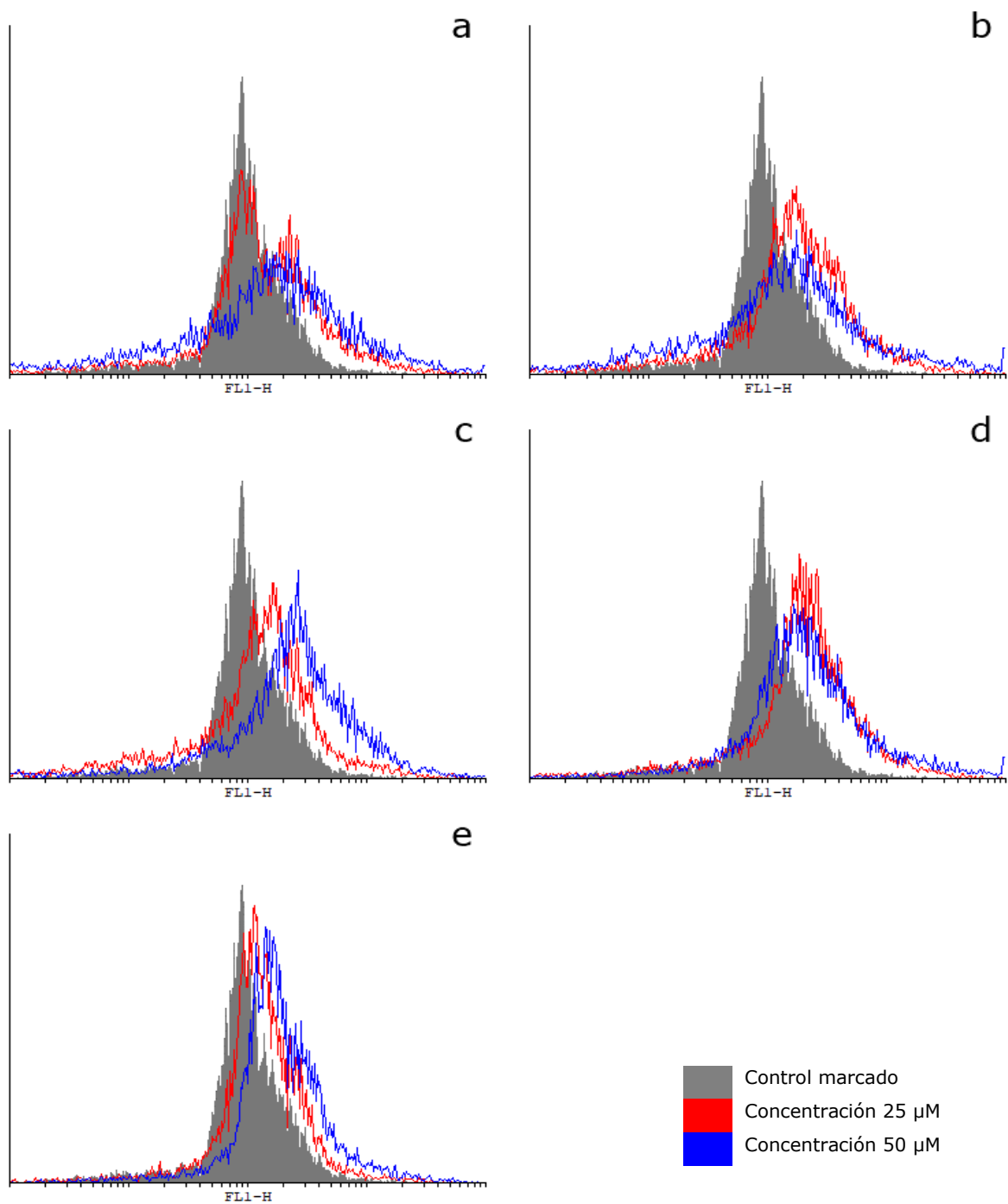


Figura 42: Activación de caspasas analizada mediante citometría de flujo utilizando el marcador CaspACE™ en la línea celular MCF-7 tras los tratamientos con: (a) Compuesto H. (b) Compuesto L. (c) Compuesto N. (d) Compuesto O. (e) Compuesto P.

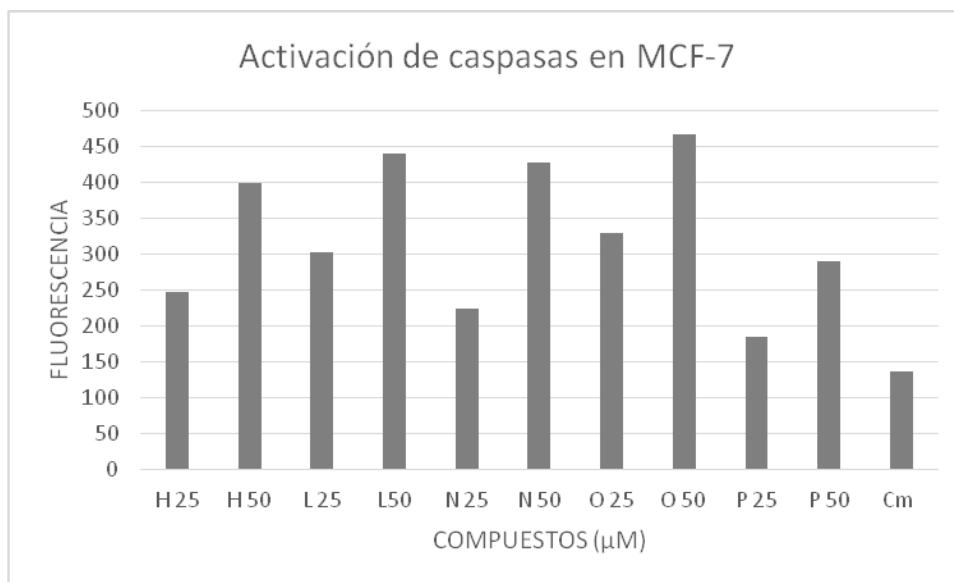


Figura 43: Intensidad de fluorescencia producto de la activación de caspasas producto de los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular MCF-7.

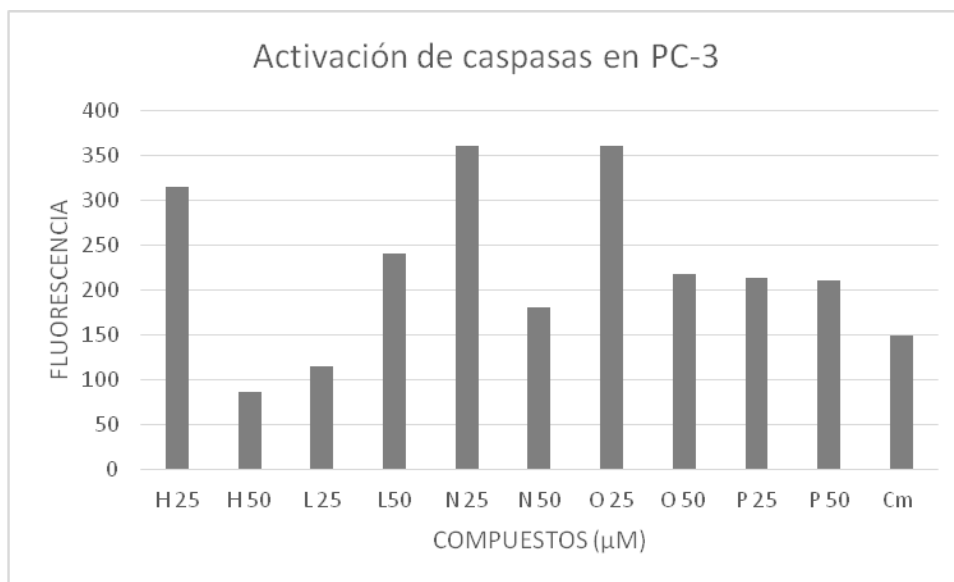


Figura 44: Intensidad de fluorescencia producto de la activación de caspasas producto de los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular PC-3.

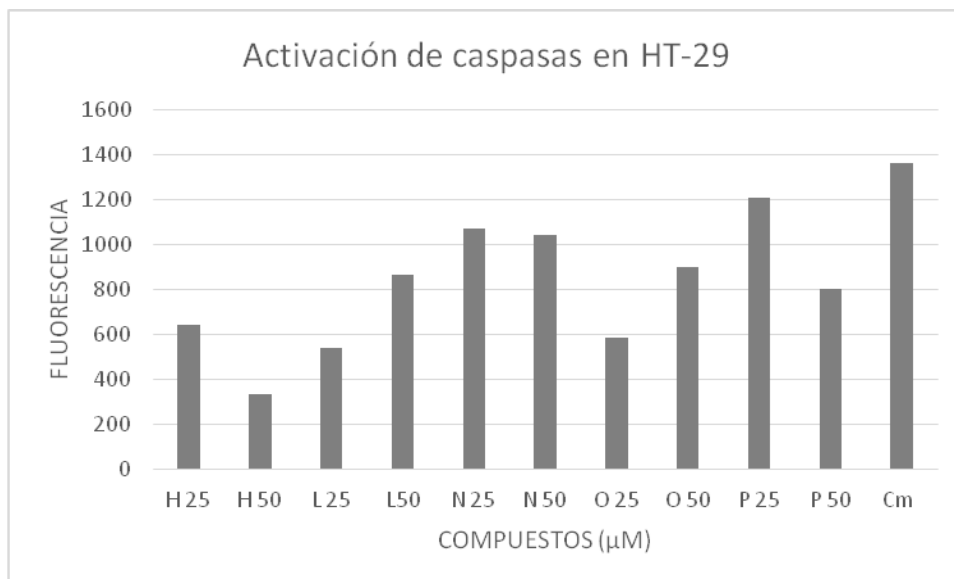


Figura 45: Intensidad de fluorescencia producto de la activación de caspasas producto de los tratamientos con los diferentes compuestos (25 y 50 μM) en la línea celular HT-29.

DISCUSIÓN.

Luego de evaluar la actividad citotóxica y proapoptótica de los compuestos oxialquilados y dioxialquilados de 2',4'-dihidroxichalcona, se pudo determinar que estas moléculas poseen efecto sobre la viabilidad en las líneas tumorales. La comparación de los derivados de la 2',4'-dihidroxichalcona con los compuestos sustituidos en diferente posición compuestos 25 y 26, dio como resultado que los segundos no tienen efecto sobre la viabilidad celular, esto nos indica que, las modificaciones realizadas son relevantes en la actividad biológica. Al analizar los compuestos A, D, F, G, H e I, los resultados mostraron que el compuesto H es el que tiene diferencia estadísticamente significativa al actuar en células tumorales, sin embargo, en la línea CoN no hubo diferencia, y su efecto sobre la viabilidad fue menor en comparación con las líneas tumorales.

A partir de este ensayo se seleccionaron los compuestos con mayor efecto, discriminando a través de su concentración inhibitoria (IC_{50} entre 11 y 37 μM en células tumorales) los cuales fueron H (oxialquilado) y L, N, O y P (dioxialquilados). Este resultado sugiere que la dioxialquilación es más efectiva que la oxialquilación en los efectos estudiados en los derivados de chalconas. Específicamente, el compuesto O tuvo mayor efecto en las líneas MCF-7, PC-3 y CoN. En el caso de HT-29, este puesto es ocupado por el compuesto L.

En otros estudios con chalconas oxialquiladas en el anillo A, se obtuvieron resultados con IC_{50} inferiores a los compuestos utilizados en este estudio, pero también se presentaban moléculas sin efecto citotóxico⁸¹, resultados que también se obtuvieron en este trabajo, donde se fue excluyendo a los compuestos que no presentaban citotoxicidad. Otro artículo comparó chalconas sustituidas en el anillo A y B, hidroxichalconas y flavonoides en las líneas tumorales TK-10, HT-29 y MCF-7, donde las chalconas resultaron tener un mayor efecto citotóxico que las demás moléculas mencionadas⁸². Las chalconas borónicas también demostraron poseer actividad antitumoral en la línea HCT116 (cáncer de colon). Sus IC_{50} alcanzaron valores de 1.5 and 3.9 μM ⁶¹. Ferrocenil chalconas también mostraron poseer actividad citotóxica en células Jurkat, HeLa, MCF-7 y A549⁸³.

Algunos de los mecanismos mediante los cuales las chalconas producen la muerte celular, son: inhibiendo la degradación de p53⁶², suprimiendo la expresión de NF- κ B⁵⁸, activando vías apoptóticas mediadas por mitocondrias⁸⁴, entre otros. De acuerdo con lo observado en el presente estudio, los compuestos H, L, N, O y P producen la generación de ROS, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y activación de caspasas. Si bien la actividad no es por completo específica, ellos inducen la muerte celular, por lo que sería interesante continuar el estudio de estos compuestos.

Los compuestos seleccionados (H, L, N, O y P) mostraron influir en la morfología que presentan las células y sus núcleos, observándose cambios morfológicos asociados a muerte celular (pérdida de la adhesión celular) y apoptosis (condensación y/o fragmentación del núcleo)⁸⁵, en todas las líneas celulares utilizadas. Esto se correlaciona con el efecto citotóxico de los compuestos observado en el ensayo de viabilidad.

Los resultados indican que las células tratadas con los compuestos pueden inducir la generación de ROS en células tumorales. Con todos los tratamientos se observó esta generación, sin embargo, el efecto de los compuestos es variable de una línea a otra. En HT-29 todos los compuestos produjeron generación de ROS, sin embargo, O a una concentración de 25 μ M tuvo mayor efecto. En cambio, en MCF-7, el efecto de los compuestos fue menor al del control marcado, a excepción del compuesto O a la misma concentración mencionada en el caso de HT-29. A la concentración 25 μ M se obtuvo valores más altos de ROS, esto podría deberse a que las células a la concentración mayor (50 μ M) mueren antes de realizar la medición en el citómetro de flujo. La generación de ROS podría propiciar el ambiente adecuado para inducir la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis⁷⁵, algo observado en compuestos similares a las chalconas⁸⁶. Estudios con xantohumol, una chalcona prenilada, mostraron que este compuesto produjo un aumento de la producción intracelular de ROS en células de glioblastoma humano, lo que resultó en muerte celular inducida por MAPK⁶³.

De hecho, los compuestos en estudio produjeron cambios en la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasas. Ambos fenómenos están descritos en la iniciación del proceso apoptótico^{87 88}, por lo tanto, la muerte celular observada en los ensayos de viabilidad y morfología celular y nuclear sería muerte celular por apoptosis.

Dependiendo de la línea celular en estudio se pudo identificar que compuesto resulta mostrar mayor efecto. En el caso del ensayo con Rodamina 123, los compuestos N y L produjeron mayor cambio en el potencial de membrana mitocondrial en las líneas MCF-7 y HT-29 respectivamente. El compuesto O también fue quién tuvo mayor efecto en el ensayo de viabilidad celular de la línea MCF-7, por lo tanto, este compuesto podría inducir la apoptosis mediante este mecanismo.

Respecto al ensayo de caspasas, en MCF-7 y PC-3, los compuestos O y N mostraron producir mayor activación de estas proteínas en estas líneas celulares, sin embargo, el efecto es distinto respecto a la concentración. En MCF-7 obtenemos mayor efecto a la concentración 50 μ M, en cambio en PC-3 esto ocurre a 25 μ M. En la línea HT-29 los compuestos no produjeron activación de caspasas, ya que el control marcado presentó mayor fluorescencia que los tratamientos, por lo tanto, el efecto sobre la viabilidad celular de estos compuestos en la línea HT-29 debe ser mediada por algún otro mecanismo de muerte celular.

El xanthohumol ha sido estudiado sobre la línea celular HepG2 (cáncer de hígado) donde produjo activación de las caspasas 3 y 9, además de aumentar la producción de ROS⁸⁹. Este compuesto también actuó activando las caspasas 3, 8 y 9 en células de cáncer cervical⁶⁴. En un estudio con células de cáncer gástrico (MGC803) tratadas con derivados de chalcona, se observó que estos compuestos provocaron la activación de las caspasas 3 y 9 e indujeron la generación de ROS⁹⁰. Todos estos antecedentes nos indican las posibles vías mediante las cuales las chalconas podrían llevar a cabo su acción biológica y confirman que los datos obtenidos con los compuestos oxialquilados y dioxicuilados derivados de chalconas de este estudio inducirían apoptosis en las líneas tumorales estudiadas.

En la siguiente tabla se resume el efecto, de mayor a menor que obtuvieron los compuestos según línea celular y ensayo, desde donde se puede correlacionar los resultados entre ellos.

Tabla 8: Orden del efecto de los compuestos H, L, N, O y P en cada línea celular según el mecanismo proapoptótico estudiado.

Línea celular	Viabilidad celular	Generación de ROS	Permeabilidad mitocondrial	Activación de caspasas
HT-29	L O P N H	O P L N H	L N H P O	Ausente
MCF-7	O L H N P	O	N L H O P	O L N H P
PC-3	O N L H P	-	-	O N H L P
CoN	O L N H P	-	-	-

Por lo expuesto anteriormente, se concluye que, si bien estos compuestos muestran actividad citotóxica y proapoptótica, esta actividad no es selectiva en células cancerosas, afectando también a la línea celular no tumoral, por lo que sería necesario realizar otro tipo de sustituciones en los compuestos seleccionados, con el objetivo de mejorar la selectividad especificidad tumoral. Además, continuar trabajando con estos compuestos para refinar estos resultados, ya que como se mostró a lo largo de este trabajo, los 5 compuestos seleccionados resultan ser más o menos efectivos según la línea celular y afectan de modo diferente los mecanismos estudiados por los cuales podrían producir apoptosis. También podrían ser estudiados otras vías mediante las cuales estas moléculas producirían apoptosis, más allá de lo expuesto en este trabajo (cambio en el potencial de membrana mitocondrial, activación de caspasas y generación de ROS). Este trabajo abre una línea de investigación sobre los compuestos derivados de chalconas a partir de *Adesmia balsamica*.

CONCLUSIONES

- Los compuestos derivados de chalconas tienen efecto citotóxico y proapoptótico en las líneas celulares estudiadas.
- Luego de realizar el ensayo de Sulforodamina B sobre los compuestos oxialquilados derivados de chalconas, el compuesto H resultó ser el que posee mayor efecto sobre la viabilidad celular.
- En cuanto a los compuestos dioxialquilados, L, O, P y N (isocordoína) fueron los que presentaron mayor efecto sobre la viabilidad celular.
- El compuesto O produjo mayor efecto citotóxico.
- El efecto de los compuestos sobre viabilidad celular no presenta selectividad entre células tumorales y no tumorales.
- Los compuestos H, L, N, O y P producen cambios en la morfología celular y nuclear de las líneas celulares en estudio.
- Los compuestos H, L, N, O y P inducen la producción de ROS, siendo O el que tuvo mayor efecto en la línea HT-29.
- En la línea celular MCF-7, la generación de ROS por parte de los compuestos no fue superior al control marcado no tratado utilizado, a excepción de O.
- En cuanto al cambio en el potencial de membrana mitocondrial, se observó que el compuesto L es quien tuvo mayor efecto en la línea celular HT-29, y N, en la línea celular MCF-7.
- Con respecto a la activación de caspasas, los resultados mostraron que en las líneas MCF-7 y PC-3, los compuestos produjeron activación de estas proteínas. Destaca el compuesto O en las líneas MCF-7 y PC-3.
- En cambio, en HT-29, se observa que los compuestos no superan el nivel de fluorescencia del control marcado sin tratamiento, por lo que no se produjo activación de caspasas.
- El comportamiento de los compuestos seleccionados es variable, por el momento no es posible determinar cuál es más efectivo, sin embargo, la dioxialquilación pareciera tener mayor efecto en general sobre los diferentes ensayos realizados en las células.
- Son necesarios más estudios para ver la posibilidad de desarrollar la especificidad en estos compuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002;2(5):331–41. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc795>
2. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2016 Sep [cited 2017 Oct 19];4(9):e609–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X16301437>
3. Instituto Nacional de Estadísticas INE. Mortalidad en Chile, 2002 y 2012. *INE Chile* [Internet]. 2015;3. Available from: <http://www.ine.cl/>
4. Robinson V. *The Story of Medicine*. 1943. 16-20 p.
5. Garrison FH. *An introduction to the History of Medicine: with medical chronology, suggestions for study and biographic data*. Philadelphia W.B. Saunders; 1921. 1913-899 p.
6. Hipócrates. *Tratados ginecológicos: sobre las enfermedades de las mujeres. Sobre las mujeres estériles. Sobre las enfermedades de las vírgenes. Sobre la superfetación. Sobre la excisión del feto. Sobre la naturaleza de la mujer. Volumen IV*. Gredos; 1988.
7. de Miguel R. *Nuevo Diccionario Latino-Español Etimológico*. Visor Libros, editor. 2001.
8. Adams. Galeno. *Complete works*. Londres; 1856.
9. Harding F. *Breast Cancer: Cause, Prevention, Cure*. Tekline Publishers; 2007.
10. Galeno. Galeno. *La Bilis Negra*. En: Ruiz A. *Obras de Galeno*. Vol XI. Tomo I. Buenos Aires: Editorial Buenos Aires; 1947. 113-137 p.
11. Störck A. *An essay on the medicinal nature of Hemlock*. Nourse, J.; 1760.
12. Cullen G. *Tratado de materia medica del doctor Guillermo Cullen*. Tomo III. Madrid: Imprenta de Benito Cano; 1795.
13. Müller J. *Ueber den feinern Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste*. Max Planck Institute for the History of Science: Reimer; 1838.
14. Muller J. *On the Nature and Structural Characteristics of Cancer: General Observations on the Minute Structure of Morbid Growths*. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 1973 Sep 1 [cited 2017 Oct 20];23(5):307–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.23.5.307>

15. Schultz M. Photo quiz. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1479–81.
16. Parker L. *The Modern Treatment of Cancerous Diseases by Caustics Or Enucleation: An Inquiry Into the Effects of Many New Remedies in Arresting the Progress of Cancer.* London: John Churchill and sons; 1867.
17. Kaplan HS. Historic milestones in radiobiology and radiation therapy. *Semin Oncol* [Internet]. 1979 Dec 1 [cited 2017 Oct 21];6(4):479–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/119321>
18. Pusey, W A. Report of cases treated with Roentgen rays. *J Am Med Assoc.* 1902;38(15):911–919.
19. Senn N. Case of splenomedullary leukemia successfully treated by the use of Rontgen ray. *M Rec.* 1903;64:281.
20. Coley WB. Treatment of inoperable malignant tumors with toxins of erysipelas and the bacillus prodigious. *Am J Med Sci.* 1984;108:50.66.
21. Ewing J. Neoplastic Diseases. *Ann Surg.* 1919;69(3):342.
22. Bainbridge WS. *The Cancer Problem.* New York Macmillan; 1918. 1-36, 108, 129, 237-276, 277-286. p.
23. Kellner, B. and Lustig B. Beitrage zur chemischen Zusammensetzung von Mausempfcarcinomen sowie deren Beeinflussung durch verschiedenartige Ernährung. *Bioch Zschr.* 1932;254:214–20.
24. Torrey, J., Kahn M. The treatment of Flexner-Jobling Rat carcinomas with bacterial proteolytic ferments. *Cancer Res.* 1927;11(4):334–76.
25. Zubrod, C.G., Schepartx, S., Leiter, J., Endicott, K.M., Cares, E.L.M., and Baker CG. The chemotherapy program of the National Cancer Institute: history, analysis and plans. *Cancer Chemother.* 1966;50:349–50.
26. Krumbhaar EB. Role of the blood and the bone marrow in certain forms of gas poisoning. *JAMA J Am Med Assoc.* 1919;72:39–41.
27. Krumbhaar EB, Krumbhaar HD. The Blood and Bone Marrow in Yelloe Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning. *J Med Res.* 1919;40(3):497–508.3.
28. Berenblum I. The modifying influence of dichloro-ethyl sulphide on the induction of tumours in mice by tar. *J Pathol.* 1929;32(3):425–34.
29. Berenblum I. Experimental inhibition of tumour induction by mustard gas and other compounds. *J Pathol.* 1935;40(3):549–58.
30. Adair FE, Bagg HJ. Experimental and Clinical Studies on the Treatment of Cancer By Dichlorethylsulphide (Mustard Gas. *Ann Surg* [Internet]. 1931;93(1):190–9. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1398743&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

31. Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg.* 1963;105:574–8.
32. Whitelock O. Comparative Clinical and Biological Effects of Alkylating Agents. Volumen 68. Monograph of the New York Academy of Science; 1958.
33. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med* [Internet]. 1948 Jun 3 [cited 2017 Oct 23];238(23):787–93. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM194806032382301>
34. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643–53.
35. Czuczman BMS. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti- CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. 2016;17(1):268–76.
36. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S SC. Numb Er 14 Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine. *English J.* 2001;344(14):1031–7.
37. How Chemotherapy Drugs Work [Internet]. [cited 2017 Oct 23]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>
38. Pedersen B, Koktved DP, Nielsen LL. Living with side effects from cancer treatment - A challenge to target information. *Scand J Caring Sci.* 2013;27(3):715–23.
39. Nichols JW, Bae YH. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action. *Nano Today.* 2012;7(6):606–18.
40. Hamilton G, Rath B. A short update on cancer chemoresistance. *Wien Med Wochenschr* [Internet]. 2014;164(21–22):456–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249024>
41. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res.* 2009;59(6):365–78.
42. Kostanecki, S., Tabor J. Ueber die sechs isomeren Monooxybenzalacetophenone (Monooxychalkone). *Berichte Der Dtsch Chem Gesellschaft.* 1899;32(2):1921–6.
43. Wang HM, Zhang L, Liu J, Yang ZL, Zhao HY, Yang Y, et al. Synthesis and anti-

- cancer activity evaluation of novel prenylated and geranylated chalcone natural products and their analogs. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;92:439–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.007>
44. Mahapatra DK, Asati V, Bharti SK. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;92:839–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.051>
 45. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming Growth Factor-Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2008;6(10):1521–33. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
 46. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 47. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2008;8(9):671–82. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2399>
 48. Ghebranious N, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* [Internet]. 1998;17(25):3385–400. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9917000 <http://www.nature.com/onc/journal/v17/n25/pdf/1202573a.pdf>
 49. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* [Internet]. 2007;26(9):1324–37. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
 50. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2005;6(8):611–22. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg1656>
 51. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353–64.
 52. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2010;21(1):21–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.003>
 53. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in

- cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6).
54. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004;4(2):118–32. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1276>
 55. Zhang EH, Wang RF, Guo SZ, Liu B. An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013.
 56. Kello M, Drutovic D, Pilatova MB, Tischlerova V, Perjesi P, Mojzis J. Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in the G2/M phase and induce apoptosis. *Life Sci* [Internet]. 2016;150:32–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320516301230>
 57. Kamal A, Kumar GB, Vishnuvardhan MVPS, Shaik AB, Reddy VS, Mahesh R, et al. Synthesis of phenstatin/isocombretastatin–chalcone conjugates as potent tubulin polymerization inhibitors and mitochondrial apoptotic inducers. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2015;13(13):3963–81. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4OB02606C>
 58. Zhao X, Jiang K, Liang B, Huang X. Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway. *Oncol Rep.* 2016;35(2):669–75.
 59. Kiekow CJ, Figueiró F, Dietrich F, Vechia LD, Pires ENS, Jandrey EHF, et al. Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF- κ B nuclear translocation and caspase-3 activation. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2016;84:116–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.01.019>
 60. Stoll R, Renner C, Hansen S, Palme S, Klein C, Belling A, et al. Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochemistry.* 2001;40(2):336–44.
 61. Achanta G, Modzelewska A, Feng L, Khan SR, Huang P. A boronic-chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome. *Mol Pharmacol.* 2006;70(1):426–33.
 62. Leão M, Soares J, Gomes S, Raimundo L, Ramos H, Bessa C, et al. Enhanced cytotoxicity of prenylated chalcone against tumour cells via disruption of the p53-MDM2 interaction. *Life Sci.* 2015;142:60–5.
 63. Festa M, Capasso A, Acunto CW, Masullo M, Rossi AG, Pizza C, et al. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. *J Nat Prod.* 2011;74(12):2505–13.

64. Yong WK, Abd Malek SN. Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2015;2015:921306. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4408747&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
65. Richon VM, O'Brien JP. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2002;8(March):662–4.
66. Orlikova B, Schnekenburger M, Zloh M, Golais F, Diederich M, Tasdemir D. Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF- κ B. *Oncol Rep*. 2012;28(3):797–805.
67. Wang L, Chen G, Lu X, Wang S, Han S, Li Y, et al. Novel chalcone derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitor: Synthesis, anti-invasive and anti-angiogenic properties. *Eur J Med Chem*. 2015;89:88–97.
68. Ma Q-G, Li T, Wei R-R, Liu W-M, Sang Z-P, Song Z-W. Characterization of Chalcones from *Medicago sativa* L. and Their Hypolipidemic and Antiangiogenic Activities. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2016 Nov 2 [cited 2017 Oct 23];64(43):8138–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27741571>
69. Ngameni B, Touaibia M, Patnam R, Belkaid A, Sonna P, Ngadjui BT, et al. Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*. *Phytochemistry*. 2006;67(23):2573–9.
70. Santos BL, Oliveira MN, Coelho PLC, Pitanga BPS, Da Silva AB, Adelita T, et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chem Biol Interact*. 2015;242:123–38.
71. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Propagación de Especies Amenazadas - Especies Prioritarias - *Adesmia balsamica* [Internet]. [cited 2017 Nov 17]. Available from: <http://www.inia.cl/recursosgeneticos/bancobase/propagacion/sp/balsam.htm>
72. American Type Culture Collection. ATCC: The Global Bioresource Center [Internet]. [cited 2017 Nov 18]. Available from: <https://atcc.org/>
73. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* [Internet]. 2006;1(3):1112–6. Available from:

- <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2006.179>
74. Voigt W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. In: Chemosensitivity [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2005 [cited 2017 Nov 20]. p. 039–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901925>
 75. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2017 Nov 18];47(1):143–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17029566>
 76. Gruber HE, Hoelscher GL, Bethea S, Hanley ENJ. Mitochondrial Membrane Potential and Nuclear and Gene Expression Changes During Human Disc Cell Apoptosis: In Vitro and In Vivo Annulus Findings. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015;40(12):876–82.
 77. Chazotte B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2017 Nov 20];2011(7):892–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724815>
 78. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2017 Nov 18];88(3):347–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039261>
 79. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* [Internet]. 1996 Oct 18 [cited 2017 Nov 18];87(2):171. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861900>
 80. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 1999 Nov 28 [cited 2017 Nov 18];15(1):269–90. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269>
 81. Da Silva GD, Da Silva MG, Souza EMPVE, Barison A, Simões SC, Varotti FP, et al. Design and synthesis of new chalcones substituted with azide/triazole groups and analysis of their cytotoxicity towards HeLa cells. *Molecules*. 2012;17(9):10331–43.
 82. Cabrera M, Simoens M, Falchi G, Lavaggi ML, Piro OE, Castellano EE, et al. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic Med Chem*. 2007;15(10):3356–67.

83. Janka V, Žatko D, Ladislav V, Pál P, Janka P, Gabriela M. Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2015;51(9):964–74.
84. Jandial D, Blair C, Zhang S, Krill L, Zhang Y-B, Zi X. Molecular Targeted Approaches to Cancer Therapy and Prevention Using Chalcones. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2014 Mar 31 [cited 2017 Dec 2];14(2):181–200. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0096&volume=14&issue=2&spage=181>
85. Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, et al. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* [Internet]. 1995 Nov 1 [cited 2017 Nov 24];21(3):275–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582250>
86. Ying BZWCPW, Wei LT. Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2017 Nov 24];89:486–97. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584915006048?via%3Dihub>
87. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2010 Sep 4 [cited 2017 Nov 24];11(9):621–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683470>
88. Fiandalo M V, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Nov 24];34(3):165–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070001>
89. Ramirez-Tagle R, Escobar CA, Romero V, Montorfano I, Armisén R, Borgna V, et al. Chalcone-induced apoptosis through caspase-dependent intrinsic pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2).
90. Zhang S, Li T, Zhang L, Wang X, Dong H, Li L, et al. A novel chalcone derivative S17 induces apoptosis through ROS dependent DR5 up-regulation in gastric cancer cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Aug 29 [cited 2017 Dec 2];7(1):9873. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28852176>