



**Escuela de Medicina  
Centro de Investigaciones Biomédicas**

**Efecto de derivados  
de Indol-3-Carbinol sobre viabilidad, muerte y  
migración celular en líneas celulares de  
cáncer**

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

**VERÓNICA GUTIÉRREZ MASCARÓ**

**Director de Tesis: Dr. Joan Villena García**

**Diciembre 2015**



Escuela de Medicina  
Programa de Magíster en Ciencias Médicas  
Mención Biología Celular y Molecular

**Efecto de derivados  
de Indol-3-Carbinol sobre viabilidad, muerte y  
migración celular en líneas celulares de cáncer**

Verónica Gutiérrez Mascaró

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Joan Villena García en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Joan Villena García  
Director de Tesis

Dr. Iván Montenegro Venegas  
Profesor Patrocinante

Dr. Mauricio Cuellar Fritis  
Profesor Informante

Dr. Enrique Werner Navarrete  
Profesor Informante

**Valparaíso, Chile  
2015**

*A mis padres,  
por el sacrificio para ayudarme  
a cumplir mis sueños,  
por acompañarme en todo momento  
y por enseñarme que  
con amor y perseverancia  
las metas se pueden cumplir.  
Los amo infinitamente.*

*A Rodrigo,  
por su comprensión,  
su apoyo incondicional  
y por no soltar mi mano  
en este proceso que a ratos  
se tornó oscuro.  
Te amo para siempre mi amor.*

*A mi viejita,  
por dejarme en vida  
la fortaleza para seguir adelante.  
Te amo eternamente.*

## **Agradecimientos**

Joan, gracias por demostrar que además de ser un buen investigador eres una gran persona. Gracias por el compromiso en esta tesis y por el apoyo constante, tanto en la parte académica, como en el día a día.

Al equipo docente, por seguir enseñando lo hermoso de la ciencia.

Belén, Claudio y Juan, gracias por disponer de sus tiempos para la realización de experimentos, por sus consejos y compartir sus conocimientos.

A mis compañeros, por cada break conversado y estudiado, por darme a conocer parte de sus vidas y por el apoyo brindado estos años.

A mi familia, por la preocupación, motivación y amor incondicional.

## Índice

Abreviaturas	i
Resumen	ii
I. Introducción	1
II. Objetivos	11
i. Objetivo General	11
ii. Objetivos Específicos	11
III. Materiales y métodos	12
i. Materiales	12
ii. Equipos	12
iii. Reactivos	13
iv. Líneas Celulares	14
Células y condiciones de cultivo celular	14
v. Compuestos	14
Indol-3-Carbinol y derivados	14
vi. Viabilidad celular	15
Ensayo de citotoxicidad	15
vii. Morfología celular y nuclear	17
viii. Muerte celular	17
Potencial de membrana mitocondrial	17
Caspasas	18
ix. Migración Celular	19
Ensayo de la Herida	19
Ensayo Transwell	20
x. Análisis Estadístico	21
IV. Resultados	23
i. Viabilidad Celular	23
Línea celular HT-29	25
Línea celular MCF-7	27
Línea celular MDA-MB-231	29
Línea celular PC-3	31

	Línea celular CoN _____	33
ii.	Morfología celular _____	38
iii.	Muerte Celular _____	46
	Potencial de membrana mitocondrial _____	46
	Activación de caspasas _____	51
iv.	Migración _____	54
	Ensayo de la herida _____	54
	Ensayo de migración con transwell _____	60
V.	Discusión _____	63
VI.	Conclusión _____	68
VII.	Proyecciones _____	68
VIII.	Bibliografía _____	69

## **Abreviaturas**

$\mu\text{M}$ : micromolar

Akt: proteína serina/treonina quinasa

CDK6: quinasa dependiente de ciclina

CTet: derivado cíclico tetramérico de indol-3-carbinol

DIM: diindolilmetano

ERK: quinasa regulada por señal extracelular

I3C: indol-3-carbinol

$\text{IC}_{50}$ : concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular

IS: índice de selectividad

M: molar

OSU-A9: [1-(4-cloro-3-nitrobenzenosulfonil)-1H-indol-3-il]-metanol

PBS: buffer fosfato salino

SBF: suero bovino fetal

SRB: sulforodamina B

TCA: ácido tricloroacético

TRIS: hidrodimetil aminometano

## **Resumen**

El cáncer es una enfermedad causada por cambios en los genes que controlan la forma en cómo funcionan nuestras células, especialmente la forma en que crecen y se dividen. Las células cancerosas pueden ignorar las señales que normalmente dicen a las células que dejen de dividirse o que empiecen un proceso que se conoce como muerte celular programada, o apoptosis.

Estudios epidemiológicos muestran que un incremento en el consumo de vegetales crucíferos está asociado a la disminución de la incidencia de cáncer humano. Entre los compuestos descritos se encuentra indol-3-carbinol. Los efectos anticancerígenos de derivados de indol presentes en la dieta aumentan la atención a estos compuestos como posibles agentes quimiopreventivos.

En el presente estudio se evaluó la actividad biológica de derivados de indol-3-carbinol, primeramente sobre el efecto en la viabilidad celular mediante el ensayo de sulforodamina B, además se analizó el efecto sobre la muerte celular evaluando el potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasas, y finalmente se analizó el efecto sobre la migración celular a través del ensayo de la herida y ensayo en cámara de migración, en líneas celulares cancerígenas.

Los distintos derivados de indol-3-carbinol mostraron efecto citotóxico, reducción del potencial de membrana mitocondrial, inducción de activación de caspasas y disminución de la migración celular.

## **I. Introducción**

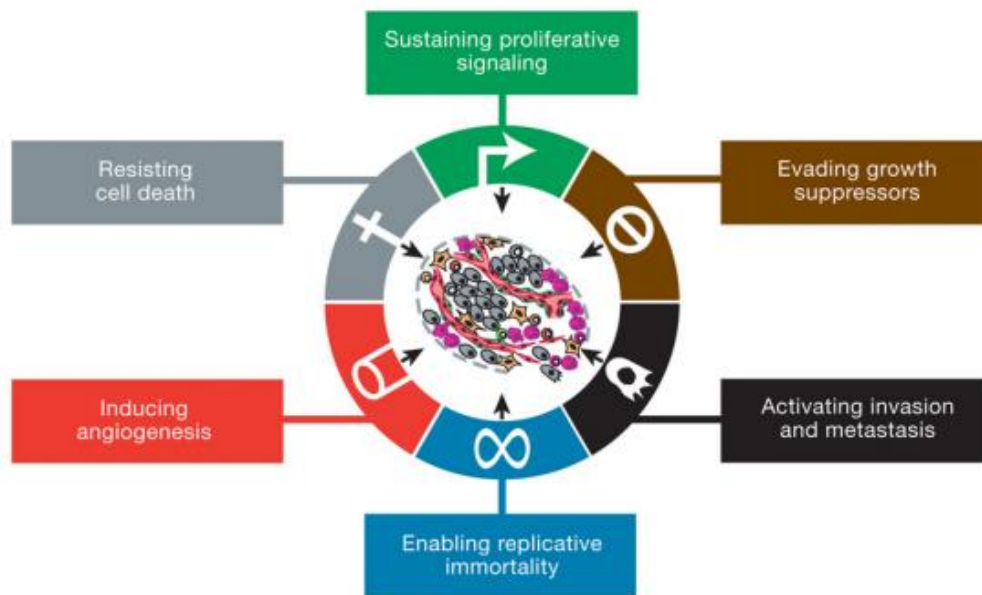
El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer<sup>(1)</sup>. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años.

En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. En la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago<sup>(2)</sup>.

El cáncer es el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Las características del cáncer comprenden capacidades biológicas adquiridas durante el proceso de desarrollo de los tumores humanos. Estas capacidades son: auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis mantenida y capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis<sup>(3)</sup> (figura 1). Las células cancerígenas poseen la capacidad para mantener la proliferación de manera crónica. En las células normales, la proliferación y la supervivencia están bajo el control de factores de crecimiento y hormonas. Los tejidos normales controlan la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento celular, asegurando de esta manera una homeostasis del número de células y con ello, el mantenimiento de la arquitectura y la función del tejido normal. En las células cancerígenas, la desregulación de las vías de señalización, como resultado de mutaciones y/o cambios epigenéticos, provoca que las células se salgan del control y se vuelvan resistentes. Las células cancerosas, mediante la desregulación de estas señales, se convierten en dueñas de sus propios destinos. Las señales que permiten esto, son transmitidas en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular, los cuales contienen un dominio intracelular tirosina quinasa. Esta última procede a emitir señales a través de vías intracelulares que regulan la progresión a través del ciclo celular<sup>(3)</sup>.

Las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad de mantener la señalización proliferativa mediante la producción de sus propios factores de crecimiento, resultando en una estimulación autocrina de la proliferación. También pueden enviar señales estimulantes a células normales que rodean el tumor, las cuales suministrarán factores de crecimiento a la célula cancerígena<sup>(4)</sup>.

Esto provoca que las células crezcan fuera de control, puesto que se dividen demasiado rápido y no mueren de la manera normal. La muerte celular es esencial para la regulación del desarrollo, y más tarde para el mantenimiento de la homeostasis tisular, la cual es consecuencia del equilibrio entre muerte y proliferación celular<sup>(5,6)</sup>. La pérdida de la homeostasis de las células epiteliales conduce a la progresión de un cáncer agresivo, la cual está relacionada con la pérdida de las características epiteliales y la adquisición de un fenotipo migratorio<sup>(7)</sup>.



**Figura 1: "Sellos distintivos del cáncer".** Propiedades que poseen las células cancerígenas<sup>(3)</sup>.

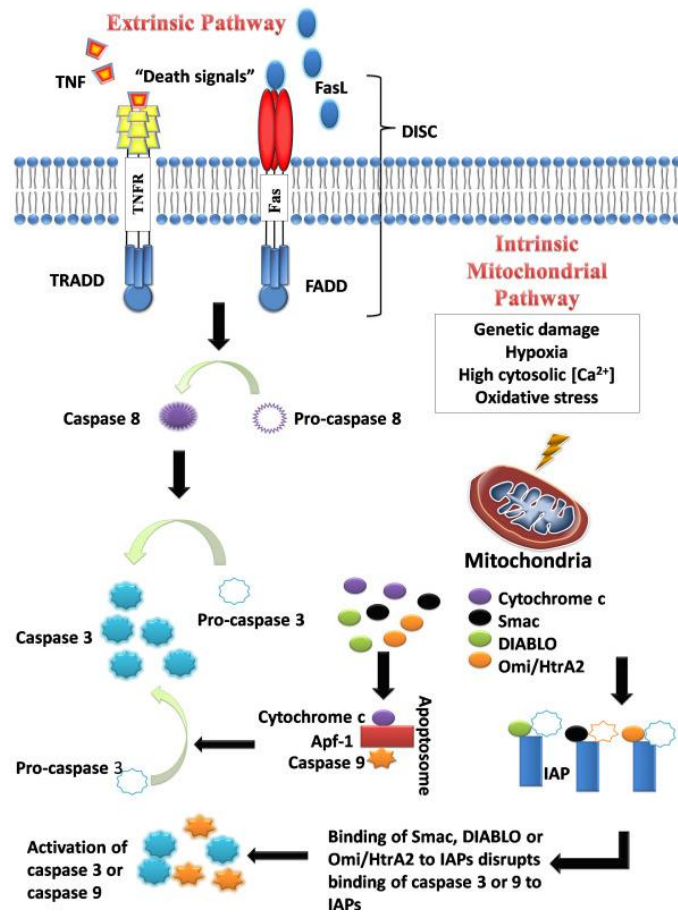
La apoptosis fue descrita inicialmente por sus características morfológicas, incluyendo la contracción celular, formación de ampollas en la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear<sup>(5,8,9)</sup>. Por lo general se requieren varias horas desde el inicio de la muerte celular a la fragmentación celular. Sin embargo, el tiempo necesario depende del tipo de célula, el estímulo y la vía apoptótica<sup>(10)</sup>. El conocimiento de que la apoptosis es un programa celular dirigido por genes ha tenido profundas implicaciones para la comprensión de la biología del desarrollo y la homeostasis tisular, ya que implica que el número de células puede ser regulado por factores que influyen en la supervivencia celular, así como aquellos que controlan la proliferación y la diferenciación celular.

En el cáncer, hay una pérdida del equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Este problema puede surgir en cualquier paso del camino de la apoptosis. Un

ejemplo es la regulación a la baja de p53, un gen supresor de tumores, que se traduce en disminución de la apoptosis, crecimiento y desarrollo tumoral<sup>(11)</sup>. La inactivación de p53, independientemente del mecanismo, se ha relacionado con muchos cánceres humanos<sup>(12,13,14)</sup>, sin embargo, al ser un arma de doble filo, la apoptosis puede ser la causa del problema, así como la solución, ya que muchos ya han incursionado en la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos a diversos aspectos de la apoptosis<sup>(15,16)</sup>. Por lo tanto, la apoptosis desempeña un papel importante tanto en la carcinogénesis, como en el tratamiento del cáncer<sup>(17)</sup>.

La correcta ejecución de la muerte celular por apoptosis requiere la activación y ejecución coordinada de varios elementos. La mayoría de los estímulos que conducen a la apoptosis convergen en la mitocondria y provocan la permeabilización de su membrana externa. Con la permeabilización se liberan una serie de proteínas, dentro de la cuales se encuentra citocromo-c<sup>(18)</sup> y SMAC/Diablo<sup>(19)</sup>, que activan las caspasas<sup>(20,21,22)</sup>. Éstas inducen la mayoría de los acontecimientos proteolíticos de la apoptosis y son consideradas como responsables finales de la muerte celular. En el citoplasma y en el espacio intermembranal de las mitocondrias se localizan en forma de procaspasas, las cuales son activadas por clivaje y actúan como ejecutoras que escinden moléculas de supervivencia celular y ponen en marcha las actividades que inducen la muerte de la célula<sup>(23)</sup>.

Las caspasas son centrales en el mecanismo de la apoptosis, se encuentran las iniciadoras y las ejecutoras. Hay tres vías por las que las caspasas se pueden activar. Las dos vías de iniciación comúnmente descritas son las vías intrínseca (o mitocondriales) y extrínseca (o receptor de muerte) de la apoptosis (figura 2). Ambas vías pueden dar lugar a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis. También se encuentra dentro de las vías de iniciación, la vía intrínseca del retículo endoplasmático<sup>(24)</sup>.



**Figura 2: Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.** La vía extrínseca comienza con señales cuando los ligandos se unen a los receptores de muerte y la vía intrínseca comienza en la mitocondria por daños genéticos, estrés oxidativo, etc. Ambas vías conducen a una vía en común<sup>(17)</sup>.

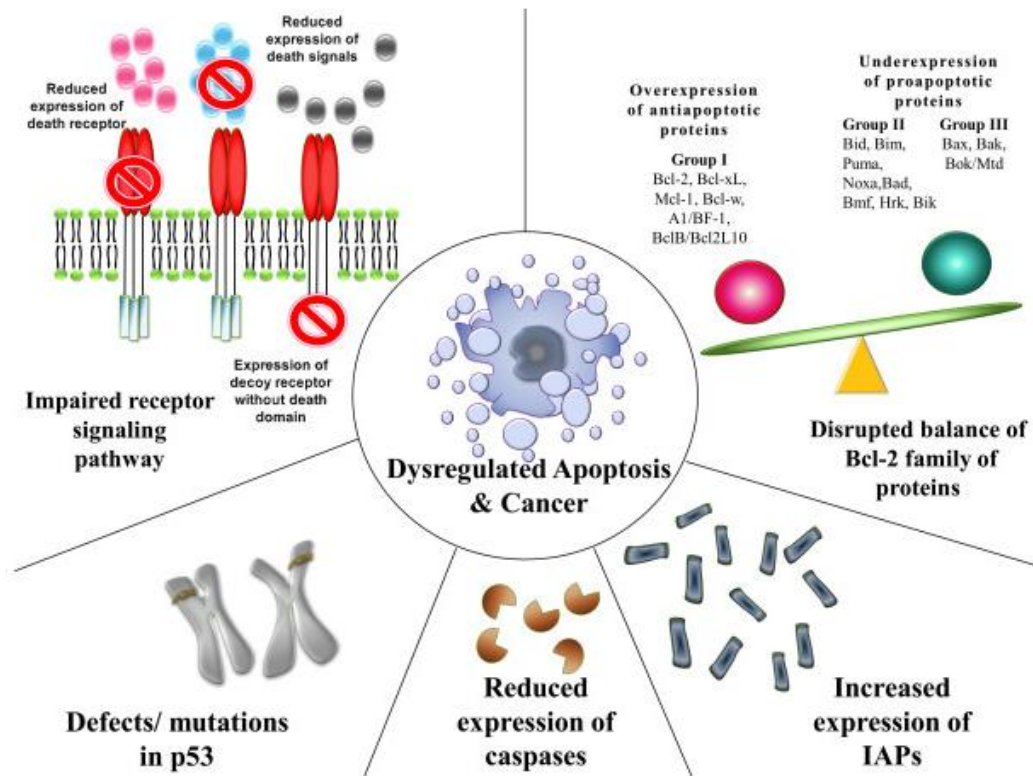
La vía extrínseca del receptor de muerte, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte. Los receptores de muerte más conocidos son el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente<sup>(25)</sup>. Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta proteínas adaptadoras, tales como el dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como a cisteína-proteasas como la caspasa-8<sup>(26)</sup>. La unión de un ligando de muerte a un receptor de muerte, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador se conoce como el complejo de señalización inductor de muerte (DISC)<sup>(24)</sup>. DISC inicia el ensamblaje y la activación de la pro-caspasa-8. La forma activada de la enzima, la caspasa 8, es una caspasa iniciadora, que inicia la apoptosis clivando otras caspasas ejecutoras.

La vía intrínseca se inicia dentro de la célula. Estímulos internos como el daño genético irreparable, la hipoxia, concentraciones extremadamente altas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y el estrés oxidativo severo, son algunos de los factores desencadenantes de la iniciación de la vía mitocondrial intrínseca. Independientemente de los estímulos, esta vía es el resultado del incremento de la permeabilidad mitocondrial y de la liberación de moléculas pro-apoptóticas, tales como citocromo-c en el citoplasma<sup>(27)</sup>.

Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia de Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-xs, Bid, Bik, Bim, Hrk, etc) y las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1 y Mcl-1, etc). Mientras que las proteínas anti-apoptóticas regulan la apoptosis mediante el bloqueo de la liberación mitocondrial de citocromo-c, las proteínas pro-apoptóticas actúan mediante la promoción de dicha liberación. El equilibrio entre las proteínas pro y anti-apoptóticas es lo que determina si se iniciará la apoptosis<sup>(28)</sup>.

Se cree que la vía intrínseca del retículo endoplasmático depende de la caspasa-12 y es independiente de las mitocondrias<sup>(29)</sup>. Cuando el retículo endoplasmático se lesiona por estrés celular como hipoxia, radicales libres o privación de glucosa, se produce un desplegamiento de proteínas y se reduce la síntesis de proteínas en la célula, y una proteína adaptadora, conocida como factor 2 asociado a receptor de TNF (TRAF2), se disocia de la procaspasa-12, lo que resulta en la activación de ésta<sup>(24)</sup>.

Generalmente, los mecanismos por los que se produce la evasión de la apoptosis pueden ser divididos en: 1) perturbación en el equilibrio de las proteínas pro y anti-apoptóticas, 2) reducción de la función de caspasas y 3) deterioro de la señalización de los receptores de muerte<sup>(17)</sup> (figura 3).



**Figura 3: Mecanismos que contribuyen a la evasión de la apoptosis y la carcinogénesis.** En las células cancerígenas se activan las vías para favorecer la supervivencia celular en lugar de la muerte<sup>(17, 30)</sup>.

Por otra parte, la migración y la invasión celular son pasos cruciales en muchos eventos fisiológicos como la implantación del embrión, embriogénesis, morfogénesis, neurogénesis, angiogénesis, cicatrización de heridas e inflamación<sup>(31,32)</sup>. Sin embargo, la migración e invasión celulares también están implicadas en la fisiopatología de muchas enfermedades, dentro de las cuales encontramos el cáncer. Por ejemplo, en el caso de la N-cadherina, se expresa normalmente en la migración de neuronas y células mesenquimales durante la organogénesis, mientras que en las células de un carcinoma invasivo se produce una sobre-regulación. Ciertamente, la capacidad de producir metástasis, es la principal característica de los tumores malignos y es una de las principales causas de muerte por cáncer. Esto es debido al hecho de que la metástasis está constituida por células más resistentes, agresivas y eficientes que los que forman el tumor primario<sup>(33)</sup>.

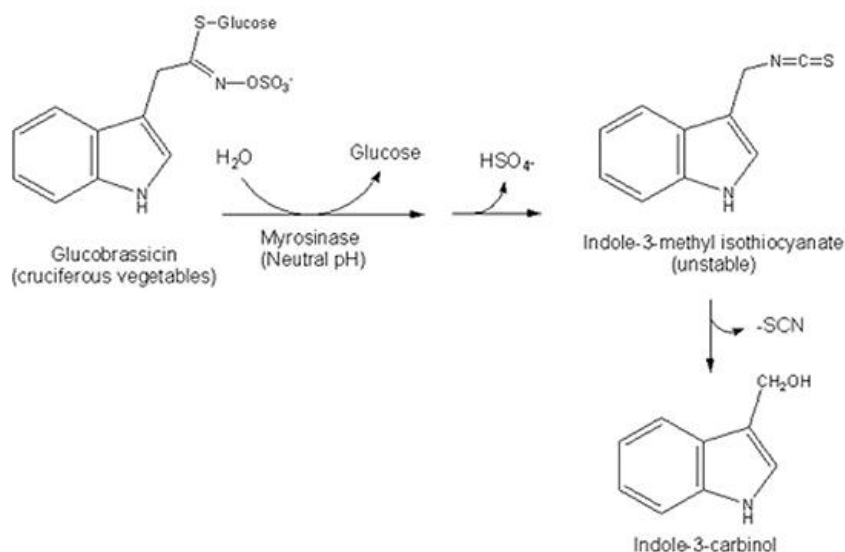
El mecanismo molecular subyacente a los pasos de metástasis son: (1) separación de las células tumorales desde el tumor primario, (2) invasión en el tejido circundante, (3) intravasación en la sangre o en vasos linfáticos, (4) difusión en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático y, por último, (5) extravasación y crecimiento en un sitio secundario. Cada uno de estos pasos requiere un programa molecular distinto en

el que la modulación de la adhesión y la migración, así como las propiedades del citoesqueleto de las células tumorales diseminadas, juegan papeles esenciales<sup>(33)</sup>.

Resumiendo, la célula cancerosa adquiere características que le permiten una proliferación de forma anormal y con esto, la supervivencia más allá de su período de vida normal. La terapia para el cáncer, que implica el uso de fármacos citotóxicos, mata las células que tienen un alto nivel basal de la proliferación y regeneración<sup>(34)</sup>.

En la medicina tradicional se han utilizado muchos productos de origen vegetal para el tratamiento una serie de enfermedades humanas. Los fitoquímicos presentes en ellos, y sus derivados, son los principales moldes para el desarrollo de nuevos fármacos<sup>(35)</sup>.

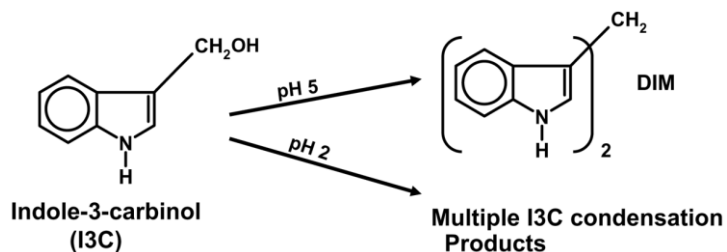
Estudios epidemiológicos y dietéticos han proporcionado un vínculo entre el consumo de verduras crucíferas y el bajo riesgo de cáncer. Las plantas crucíferas, pertenecientes al género *Brassica*, poseen un efecto protector contra el cáncer que puede deberse a su alto contenido de glucosinatos, puesto que la hidrólisis de éstos por la enzima mirosinasa, da como resultado la formación de compuestos biológicamente activos, incluyendo indoles e isotiocyanatos<sup>(36)</sup> (figura 4), de los cuales se ha demostrado que poseen propiedades anticancerígenas<sup>(37,36,38,39)</sup>.



**Figura 4: Formación de Indol-3-carbinol.** La hidrólisis de glucobrasicina por mirosinasa a pH neutro resulta en un indol isotiocianato inestable que se degrada para formar Indol-3-carbinol y el ión tiocianato. (Adaptada desde <sup>(36)</sup>).

Se le atribuye efecto quimiopreventivo a la actividad antitumoral de una molécula común, indol-3-carbinol (I3C) y sus productos metabólicos. Indol-3-carbinol es químicamente inestable en ambientes acuosos y en el ácido gástrico, condiciones que se encuentran en cultivo celular y el ambiente ácido del estómago *in vivo*, respectivamente. En condiciones ácidas, I3C se convierte rápidamente en numerosos productos de condensación (figura 5), de los cuales 3,3'- diindolilmetano (DIM) es el metabolito más activo y eficaz<sup>(40,41)</sup>. El efecto de I3C *in vivo* podría ser atribuible a la formación de DIM.

Diferentes estudios han demostrado que I3C induce la detención del ciclo celular en la fase G1 en las células cancerosas<sup>(42,43)</sup>, promueve la apoptosis<sup>(44)</sup> y evita la invasión tumoral y la metástasis<sup>(45)</sup>. Se ha encontrado que I3C promueve la detención del ciclo celular mediante la regulación negativa de proteínas ciclinas tales como la ciclina D1 y ciclina E. Además, se piensa que I3C induce la apoptosis por mecanismos que dependen de la regulación negativa de los genes anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-xL y survivina, y por potenciación de la expresión de Bax y por la activación de la caspasa-3 y la caspasa-9<sup>(40,42,45,46)</sup>.

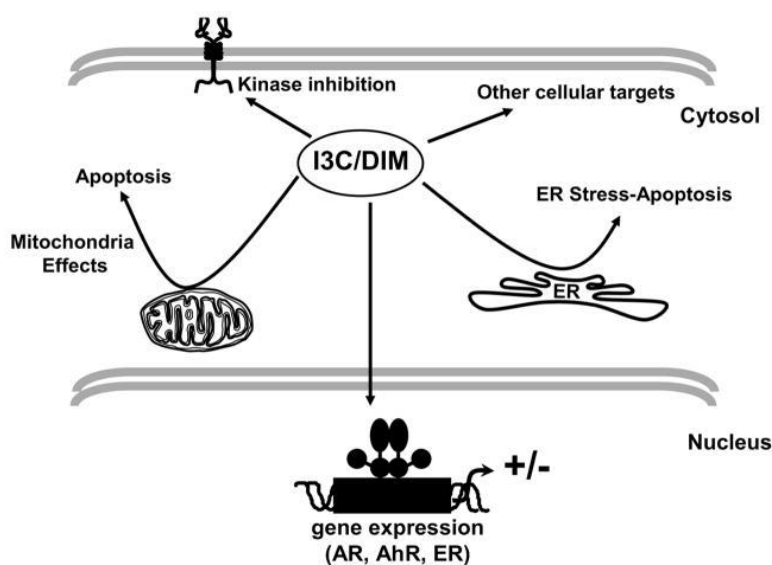


**Figura 5: Conversión de indol-3-carbinol a 3,3'-diindolilmetano (DIM) por la acción de medio ácido.** Indol-3-carbinol sufre un reordenamiento formando DIM y múltiples productos de condensación<sup>(35)</sup>.

Indol-3-carbinol y DIM han demostrado la supresión de la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer, en un intervalo de concentración de 50-100  $\mu\text{M}$ , entre las que se encuentran las líneas celulares cancerígenas de mama<sup>(46,47,48,49)</sup>, colon<sup>(50,51,52)</sup>, próstata<sup>(44,53,54)</sup> y endometrio<sup>(55)</sup>, apuntando a un amplio espectro que incluye las vías de señalización que regulan la homeostasis hormonal, la progresión del ciclo celular, la proliferación y supervivencia celular<sup>(40,56,57,58)</sup>.

Estudios han mostrado que indol-3-carbinol a concentraciones de 60 y 100  $\mu\text{M}$  induce la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en células CA1a<sup>(59)</sup>, mientras que a concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$  incrementa la activación de caspasas en células MDA-MB-231 y MDA-MB-468<sup>(60)</sup>. Otros estudios indican que el tratamiento con I3C a 200  $\mu\text{M}$  induce la detención del ciclo celular en células de cáncer de mama<sup>(61,62,63)</sup>. En células de cáncer de próstata se ha reportado que I3C reduce la migración celular a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ <sup>(64)</sup>.

Indol-3-carbinol y/o DIM activa o inactiva múltiples receptores nucleares, induce estrés en el retículo endoplasmático, disminuye el potencial de membrana mitocondrial y modula múltiples vías de señalización que incluyen quinasas<sup>(35)</sup> (figura 6).



**Figura 6: Vías en las que actúa I3C/DIM.** Indol -3-carbinol y DIM modulan múltiples respuestas y genes en líneas celulares de cáncer a través de varias vías<sup>(35)</sup>.

La diversa actividad biológica asociado a derivados indólicos, tanto de origen natural y sintético, asegura que la síntesis de este importante sistema de anillos, sigue siendo un tema de interés actual<sup>(65,66)</sup>.

Debido a la evidencia presentada y a la importancia biológica que se adjudican los compuestos derivados de indol-3-carbinol, se plantea como **hipótesis**:

**“Derivados hemisintéticos de Indol-3-Carbinol reducen la viabilidad celular, inducen la muerte celular e inhiben la migración celular, en líneas celulares tumorales”**

## **II. Objetivos**

### **i. Objetivo General**

Evaluar el efecto de derivados hemisintéticos de I3C sobre viabilidad, muerte y migración celular en líneas celulares PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HT-29 y CoN.

### **ii. Objetivos Específicos**

- Determinar el efecto de derivados hemisintéticos de I3C sobre la viabilidad celular en las líneas celulares PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HT-29 y CoN.
- Estudiar el mecanismo de derivados hemisintéticos de I3C sobre la muerte celular en las líneas celulares PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HT-29 y CoN.
- Estudiar la función de derivados hemisintéticos de I3C en la migración celular en las líneas celulares PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HT-29 y CoN.

### III. Materiales y métodos

#### i. Materiales

Soporte permeable *Transwell*<sup>®</sup>

Placas de micropocillos para cultivo de tejidos de 6, 12, 24 y 96 pocillos *Orange Scientific*<sup>®</sup>

Placas petri para cultivo de tejidos de 60 mm *Falcon*<sup>®</sup>

Varillas de papel *Babyland*<sup>®</sup>

Portaobjeto *SAIL BRAND*

Cubreobjeto *EUROTUBO*<sup>®</sup>

Tubos para centrífuga de 15 y 50 ml *Biologix*

Botellas de vidrio con tapa *Duran Schott*<sup>®</sup>

Micropipetas *Biopette*<sup>®</sup>, modelos p2, p10, p20, p200 y p1000

Micropipeta multicanal de 200  $\mu$ l *Biopette*<sup>®</sup>

Puntas para micropipetas desechables de 10, 200 y 1000  $\mu$ l

#### ii. Equipos

Cámara de flujo laminar clase II *ESCO*<sup>®</sup>

Incubadora *Kendro Laboratory Products*<sup>®</sup>.

Refrigerador modelo Altus 700 *Mademsa*<sup>®</sup>

Cámara de Neubauer

Microscopio invertido *Ivens-microscope*, modelo XD-202

Centrífuga refrigerada *HETTICH*<sup>®</sup>, modelo MIKRO 22R

Lector de Microplacas *Biotek*<sup>®</sup>.

Citómetro de flujo BD *FACSCalibur*<sup>™</sup>.

Microscopio de fluorescencia invertido motorizado modelo IX 81 *Olympus*<sup>®</sup>.

Cámara Digital modelo DP 71 *Olympus*<sup>®</sup>.

Balanza analítica *Mettler Toledo*<sup>®</sup> ML204.

Vortex *VELP*<sup>®</sup> *Scientifica*.

### iii. Reactivos

Indol-3-carbinol *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Rodamina 123 *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>

Safranina *Merck*<sup>®</sup>

Hoechst 33342 *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>

Medio de montaje Dako

Tris Base Promega

DMEM/HIGH GLUCOSE *HyClone*<sup>®</sup>

HAM' S/F-12 *HyClone*<sup>®</sup>

Suero Bovino Fetal *Gibco*<sup>®</sup>

Penicilina-Estreptomicina *GibcoBRL*<sup>®</sup>

Tripsina-EDTA *Gibco*<sup>®</sup>.

Buffer Fosfato Salino *Gibco*<sup>®</sup>

CaspACE™ FITC-VAD-FMK

Azul de Tripán *Gibco*<sup>®</sup>

Ácido Acético *Winkler LTDA*<sup>®</sup>

Ácido Tricloroacético *EMSURE*<sup>®</sup>

Sulforodamina B (SRB) *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>

Hidroximetil-aminometano (TRIS)  
*Merck*<sup>®</sup>

Metanol *Merck*<sup>®</sup>

Cristal Violeta *Merck*<sup>®</sup>

#### **iv. Líneas Celulares**

##### **Células y condiciones de cultivo celular**

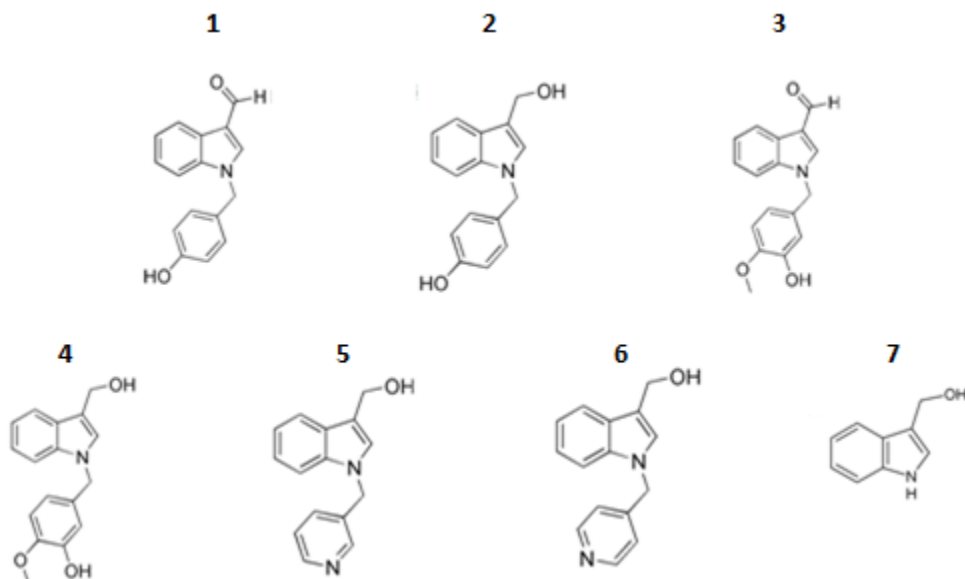
Las líneas celulares utilizadas fueron obtenidas desde la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Las células CoN (línea celular epitelio de colon no tumoral), MCF-7 (línea celular de cáncer de mama derivada de adenocarcinoma), MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama derivada de adenocarcinoma), PC-3 (línea celular de cáncer de próstata derivada de adenocarcinoma) y HT-29 (línea celular de cáncer de colon derivada de adenocarcinoma) fueron cultivadas en DMEM-F12. El medio fue complementado con 10% de FCS, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 1 mM de glutamina. Las células fueron siempre mantenidas en un incubador a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>: 95% de aire mezclado.

Antes de cada tratamiento, las células fueron incubadas en estas condiciones durante 24 horas para obtener una óptima confluencia y adhesión.

#### **v. Compuestos**

##### **Indol-3-Carbinol y derivados**

Los compuestos utilizados fueron: 1-(4'-hidroxibencil)-1H-indol-3-carboxaldehído (**1**), 1-(4'-hidroxibencil)-1H-indol-3-carbinol (**2**), 1-(3'-hidroxi-4'-hidroxibencil)-1H-indol-3-carboxaldehído (**3**), 1-(3'-hidroxi-4'-metoxibencil)-1H-indol-3-carbinol (**4**), 1-(piridin-3'-ilmetil)-1H-indol-3-carbinol (**5**), 1-(piridin-4'-ilmetil)-1H-indol-3-carbinol (**6**) e indol-3-carbinol (**7**) (figura 7). Los derivados hemisintéticos de indol-3-carbinol fueron sintetizados por Luis Monasterio Ocares en el laboratorio del Dr. Erwin Pérez Hernández, Pontificia Universidad Católica de Chile. Cada uno de los compuestos fue preparado con DMSO al 100%, obteniendo una concentración final de 0,1M de cada compuesto. Cada solución stock fue almacenada a -20°C hasta su posterior utilización. Al momento de realizar las diluciones, para tratar las distintas líneas celulares, se utilizó agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de cada compuesto de 1mM. El volumen de cada tratamiento adicionado al cultivo fue dependiente de la concentración a ensayar. La concentración final del solvente en cultivo fue 0,1%.



**Figura 7: Estructura de Indol-3-Carbinol y sus derivados.** Las estructuras corresponden a los compuestos: **(1)**1-(4'-hidroxibencil)-1H-indol-3-carboxaldehído, **(2)** 1-(4'-hidroxibencil)-1H-indol-3-carbinol, **(3)** 1-(3'-hidroxi-4'-hidroxibencil)-1H-indol-3-carboxaldehído, **(4)** 1-(3'-hidroxi-4'-metoxibencil)-1H-indol-3-carbinol, **(5)** 1-(piridin-3'-ilmetil)-1H-indol-3-carbinol, **(6)** 1-(piridin-4'-ilmetil)-1H-indol-3-carbinol e indol-3-carbinol **(7)**.

## vi. Viabilidad celular

### Ensayo de citotoxicidad

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a una densidad de  $3 \times 10^3$  células/pocillo en 100  $\mu$ l e incubadas durante 24 horas, antes de cada ensayo.

Inicialmente, para determinar el efecto sobre la viabilidad celular del solvente 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 CO<sub>2</sub>, en las líneas celulares CON, HT-29, PC-3, MCF-7 y MDA-MB-231.

Para evaluar el efecto de los distintos compuestos, las células fueron tratadas por triplicado con Indol-3-Carbinol y los compuestos derivados 2, 3, 4, 5, 6 y 7 a las concentraciones de 100, 50, 25, 10, 5 y 1  $\mu$ M, utilizando el solvente DMSO como

control negativo a la concentración final en cultivo de 0,1%. Tras el tratamiento, las células fueron incubadas por 72 horas a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>.

Por otro lado, se realizó el mismo ensayo para evaluar el efecto de los compuestos a una concentración de 10, 5, 2.5 y 1µM, durante 24 horas, por triplicado, para decidir las concentraciones a utilizar en los experimentos posteriores de migración celular.

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

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 (TCA final 10%). Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces por inmersión en agua destilada. Tras lo cual se tiñeron con 50 µL/pocillo de sulforodamina B (SRB), al 0,1% p/v en ácido acético al 1% v/v, dejando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la tinción, las células fueron lavadas 3 veces con 150 µL/pocillo de ácido acético y se dejó secar a temperatura ambiente. El colorante fue 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 fueron llevados a porcentajes de células viables respecto del control y promediados para así obtener el valor de IC<sub>50</sub> de cada compuesto en las líneas celulares estudiadas, utilizando el software SigmaPlot 11.0.

Los porcentajes de viabilidad celular se compararon con el control, para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa en el efecto sobre la viabilidad celular tras cada tratamiento. Con el mismo propósito, se realizó una comparación entre los compuestos **1** y **2**, como también entre los compuestos **3** y **4**, con la finalidad de evaluar la posible variación del efecto sobre la viabilidad celular de éstos, considerando que los compuestos con terminación -OH poseen un alcohol, en reemplazo del grupo funcional aldehído del compuesto sin terminación en su nomenclatura.

## **vii. Morfología celular y nuclear**

Con el objetivo de analizar cualitativamente los cambios morfológicos tras los tratamientos con cada compuesto sobre las líneas CoN, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231 y PC-3, cada una de las líneas fue tratada con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  durante 48 horas.

Luego, las células fueron marcadas con Hoechst durante 30 minutos a 37°C, para analizar cambios en la compactación de la cromatina, visualizándolas con filtro DAPI. Para observar los fenómenos de modificación de la morfología celular se utilizó contraste de fase. Las fotografías fueron tomadas a 20x.

## **viii. Muerte celular**

### **Potencial 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 CoN, HT-29, PC-3 y MDA-MB-231. Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos, a una densidad de  $8 \times 10^4$  células/pocillo en 1,5 ml de medio de cultivo. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con Indol-3-Carbinol y los derivados a diferentes concentraciones (Tabla 1) durante 24 horas. Tras el tratamiento, se adicionó 15  $\mu\text{L}$  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 recogió el contenido de cada pocillo en tubos de 15 ml, de manera independiente. Posteriormente se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de PBS 1X a cada pocillo y se volvió a recoger en el mismo tubo de 15ml a modo de obtener las células desprendidas. Luego se agregó 300  $\mu\text{L}$  de tripsina, durante 10 minutos, para así, obtener todo el contenido celular de cada pocillo. Cada tubo fue centrifugado a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue retirado y el pellet fue resuspendido en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Como control sin marcaje se utilizaron células tratadas con el solvente exclusivamente, 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 fueron analizados para evaluar el porcentaje de células con disminución del potencial de membrana mitocondrial, utilizando el software Flowing 2.5.1.

**Tabla 1:** Concentración de cada compuesto utilizado para analizar el efecto de éstos sobre el potencial de membrana mitocondrial en línea celular CoN, HT-29, PC-3 y MDA-MB-231.

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
1	50
2	50, 25, 10
3	50
4	50, 25
5	50
6	50
7	50

## Caspasas

Para evaluar la activación de caspasas como una característica del proceso apoptótico, las células fueron tratadas con el marcador CaspACE™ FITC-VAD-FMK, 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 líneas celulares evaluadas fueron PC-3 y MDA-MB-231. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a con una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron expuestas a tratamientos a una concentración de  $50\mu\text{M}$  de cada compuesto durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se realizó el marcaje durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y oscuridad con el marcador CaspACE. Tras el marcaje se recolectó el medio y las células adheridas fueron tripsinizadas para almacenarlas en tubos de 15 ml para su posterior centrifugación (10 minutos a  $1500g$ ). El sobrenadante fue descartado y las células

resuspendidas en 500µL de PBS. Como control sin marcaje se utilizaron células tratadas con el solvente exclusivamente, el control negativo fueron células tratadas 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 fueron analizados para evaluar el porcentaje de células con activación de caspasas, utilizando el software Flowing 2.5.1.

## **ix. Migración Celular**

### **Ensayo de la Herida**

Las líneas celulares evaluadas fueron CoN, HT-29, PC-3 y MDA-MB-231. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en 1 ml de medio de cultivo.

Se realizó una herida con una punta de micropipeta (20-200µL) en cada monocapa confluyente de las diferentes líneas celulares utilizadas (CoN, HT-29, MDA-MB-231 y PC-3), el medio se retiró y los pocillos se lavaron con PBS para remover las células desprendidas tras la realización de la herida. Luego se adicionó el tratamiento que consistió en una concentración de 10µM de cada compuesto en cada uno de los 24 pocillos de cada placa. Se tomaron las primeras fotografías de la herida a tiempo de 0 horas. Posteriormente, tras 24 horas de realizada la herida, se volvieron a fotografiar de los mismos campos.

Se calculó el área de la herida a tiempo 0 y 24 horas, y se obtuvo el área de migración de cada línea celular, la cual fue comparada con el control.

El análisis se realizó con el programa de procesamiento de imagen ImageJ.

La fórmula para calcular el área de migración es la siguiente:

$$\frac{\text{área}_{t=0 \text{ hrs}} - \text{área}_{t=24 \text{ hrs}}}{\text{área}_{t=0 \text{ hrs}}} \times 100$$

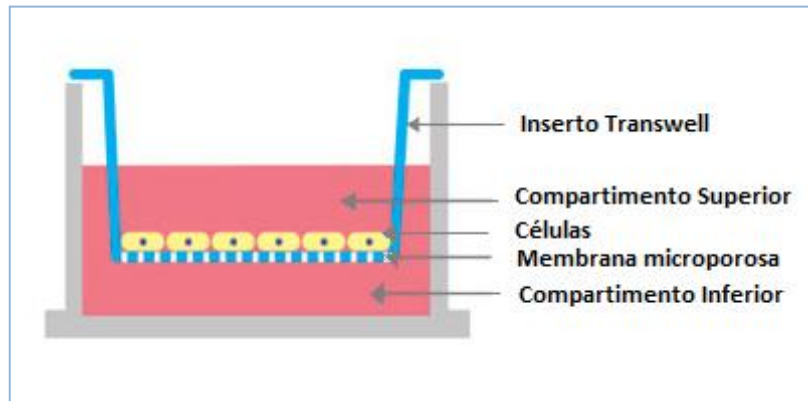
## Ensayo Transwell

Para este ensayo se utilizaron transwell de 8µm de poro, en placas de 24 pocillos. Las líneas celulares estudiadas fueron HT-29 y PC-3.

Las células se sembraron en placas de 60 mm, a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/placa en 3 ml de medio de cultivo. Tras 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con Indol-3-Carbinol y sus derivados a diferentes concentraciones (tabla 2) durante 24 horas. Luego fue retirado el medio de cultivo y se adicionó PBS 1X para lavar las células muertas de cada placa. Se agregó tripsina, durante 5 minutos en cada placa, a 37°C y luego se adicionó medio de cultivo al 1% SBF a cada placa para recoger las células en tubos de 15 mL para su posterior centrifugación. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer, para sembrar 250.000 células en 250µL de medio de cultivo al 1% de SBF en cada transwell. En el pocillo, previo a colocar el transwell, se adicionaron 400µL de medio de cultivo al 10% de SBF, actuando el gradiente de SBF como quimioatrayente inductor de la migración celular (figura 8).

**Tabla 2:** Concentración de cada compuesto utilizado para analizar el efecto de éstos sobre la migración en línea celular HT-29 y PC-3.

Compuesto	Concentración (µM)	
	HT-29	PC-3
1	10	10
2	10	10, 1
3	10, 1	10, 1
4	10	10, 1
5	10	10
6	10	10
7	10	10



**Figura 8: Esquema del ensayo de migración transwell.** Las células son sembradas en medio de cultivo al 1% de SBF en el compartimento superior. En el compartimento inferior se adiciona medio de cultivo al 10% de SBF. (Adquirida desde Transwell® Permeable Supports. Selection and Use Guide. Corning®)

Transcurridas 24 horas, las células de la parte superior que no migraron a través de la membrana fueron eliminadas con la ayuda de cotonos de papel. Luego la membrana fue retirada del transwell y las células adheridas a la parte inferior de ésta fueron fijadas con 400µl de metanol al 50% v/v por un periodo de 10 minutos. Seguidamente fueron teñidas con 400µl de cristal violeta al 1 % p/v durante 1 minuto y posteriormente lavadas con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Luego fueron teñidas con safranina durante 30 segundos y lavadas con agua destilada. Las membranas fueron montadas en portaobjetos para finalmente calcular el área ocupada por células adheridas a la membrana. Se eligieron 10 campos al azar y fueron fotografiados a 10X en un microscopio óptico. El análisis se realizó con el programa de procesamiento de imagen ImageJ.

#### **x. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada estudio fue analizado con el software estadístico Stata 11.

Para determinar la significancia estadística de los resultados, se realizaron diferentes evaluaciones. En primer lugar, se evaluó el supuesto de normalidad de los datos, para lo cual se realizó el test Shapiro-Wilk, en el cual si  $p > 0.05$ , los datos seguían una distribución normal. De ser así, se prosiguió a realizar el test de Levene para saber si los datos presentaban homocedasticidad con un  $p > 0.05$ . Se continuó con T-Test

cuando se encontró homocedasticidad y con T-Test varianzas desiguales cuando se encontró heterocedasticidad, en ambos casos  $p < 0.05$  indicó diferencia significativa. Si los datos no presentaron distribución normal, se realizó la prueba de Mann Whitney, en donde  $p < 0.05$  indicó diferencia significativa entre los tratamientos.

## IV. Resultados

### i. Viabilidad Celular

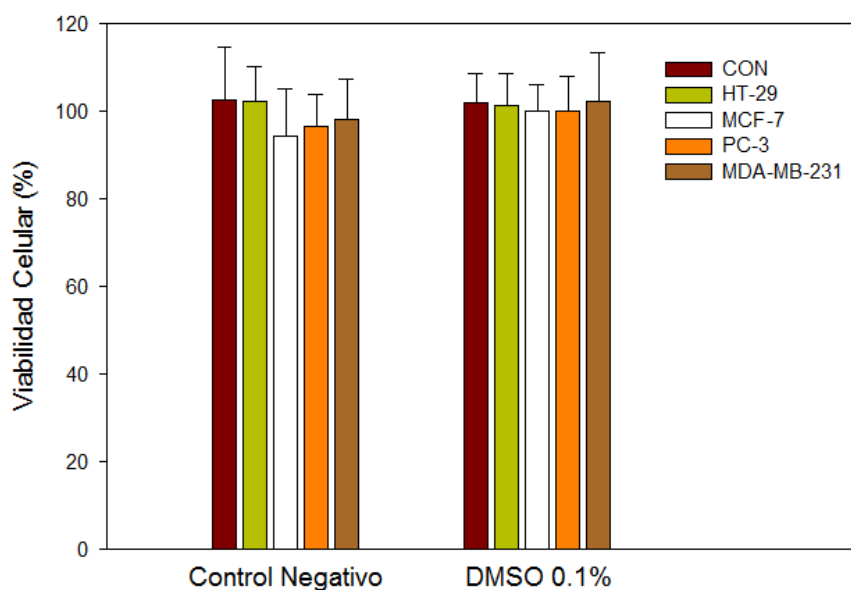
Para determinar el efecto del solvente sobre la viabilidad celular, las líneas celulares fueron tratadas con el solvente y con el medio de cultivo.

Para determinar el efecto citotóxico de los compuestos (figura 7), las líneas celulares fueron tratadas a diferentes concentraciones.

En ambas evaluaciones, las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos durante 72 horas. Se empleó el ensayo de sulforodamina B para medir la cantidad de células viables tras cada tratamiento.

#### Control

Los resultados del efecto sobre la viabilidad celular asociado a la presencia del solvente se observan en la figura 9.



**Figura 9: Efecto del solvente sobre la viabilidad celular en las líneas celulares HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 y CoN.** Las células fueron tratadas durante 72 horas con solvente (DMSO 0.1%) y medio de cultivo (control negativo). Tras cada tratamiento se empleó el ensayo de sulforodamina B para determinar la viabilidad celular. Los valores son expresados como porcentaje de células viables, con su respectiva desviación estándar. (\*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, \*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test y \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

Como se observa en la figura 9, no hay diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con solvente y con medio de cultivo en ninguna de las líneas celulares estudiadas (CoN, HT-29, MDA-MB-231, PC-3 presentaron un  $p > 0.05$  para la prueba T-Test y MCF-7 presentó un  $p > 0.05$  para la prueba Mann-Whitney).

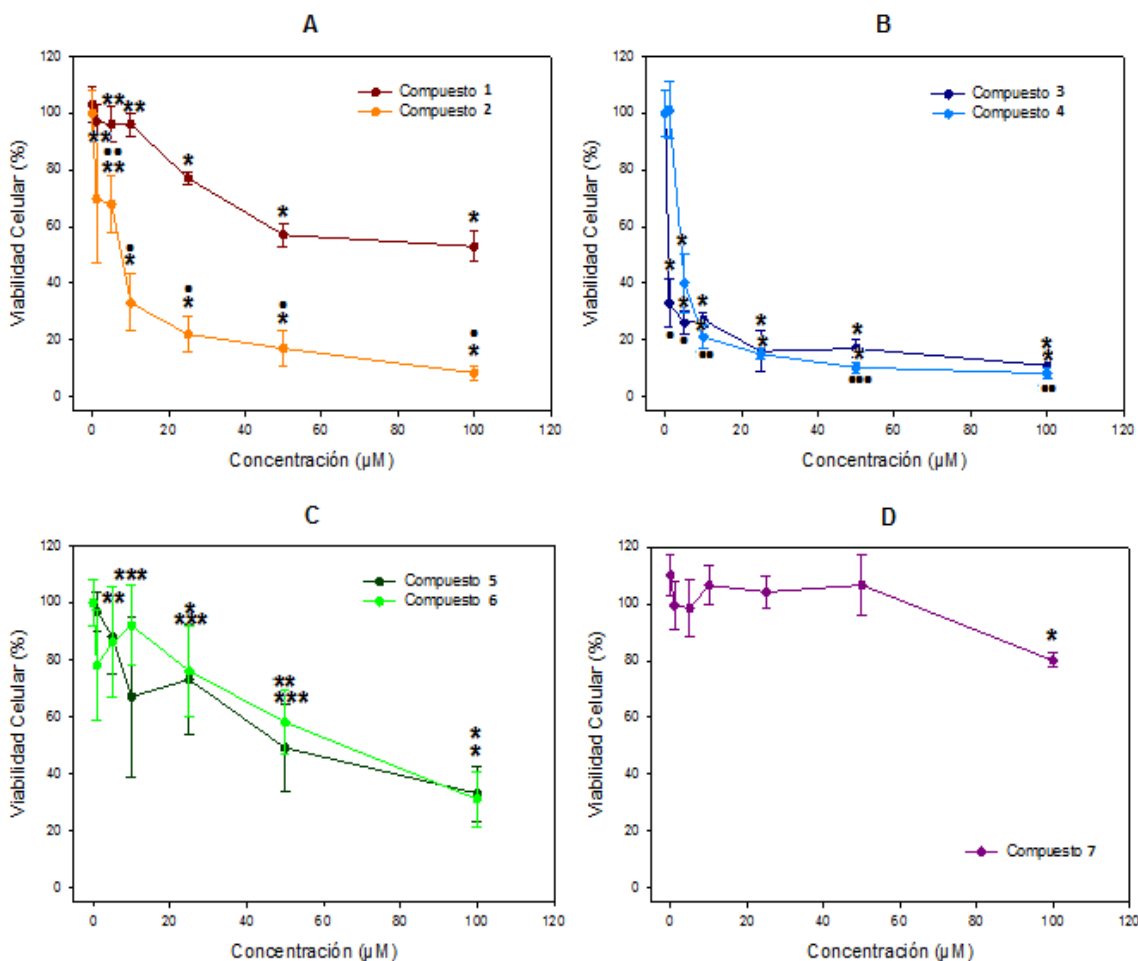
Al no observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos, en adelante, el solvente se consideró como control en las evaluaciones realizadas.

Se prosiguió con la evaluación del efecto citotóxico de cada tratamiento sobre las líneas celulares HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 y CoN.

Los resultados del efecto citotóxico de cada tratamiento, sobre las líneas celulares HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 y CoN, se observan en las figuras 10, 11, 12, 13 y 14, respectivamente.

## Línea celular HT-29

En los gráficos de la figura 10 se muestran los valores de viabilidad celular obtenidos tras cada tratamiento.



**Figura 10: Efecto de los distintos compuestos a diferentes concentraciones en la línea celular HT-29.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos: **1** y **2** (A), **3** y **4** (B), **5** y **6** (C), y **7** (D). Tras 72 horas de tratamiento se empleó el ensayo de sulforodamina B para determinar la viabilidad celular. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar. (Análisis compuesto/control, \*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, \*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test y \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales; análisis compuestos **1/2** y **3/4**, ●:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, ●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test y ●●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

Como se observa en la Figura 10, en general hay un incremento en el efecto citotóxico al aumentar la concentración de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6**, con pequeñas diferencias que se escapan de la tendencia.

Los compuestos **2** y **3** presentaron disminuciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) de la viabilidad celular, tras todos los tratamientos en comparación al control (figura 10-A y B). Tras los tratamientos con los compuestos **1**, **4** y **5** no se observó diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (figura 10-A, B y C), mientras que con el compuesto **6** no se obtuvo disminuciones estadísticamente significativas a 1,5 y 10  $\mu\text{M}$  (figura 10-C).

En cambio el compuesto **7**, solo presentó disminución estadísticamente significativa de viabilidad celular a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , en donde se obtuvo 80% de células viables (figura 10-D).

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **1** y **2**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , presentando un  $p < 0.05$  para la prueba Mann-Whitney (10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) y un  $p < 0.05$  para la prueba T-Test (5  $\mu\text{M}$ ).

El compuesto **2** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

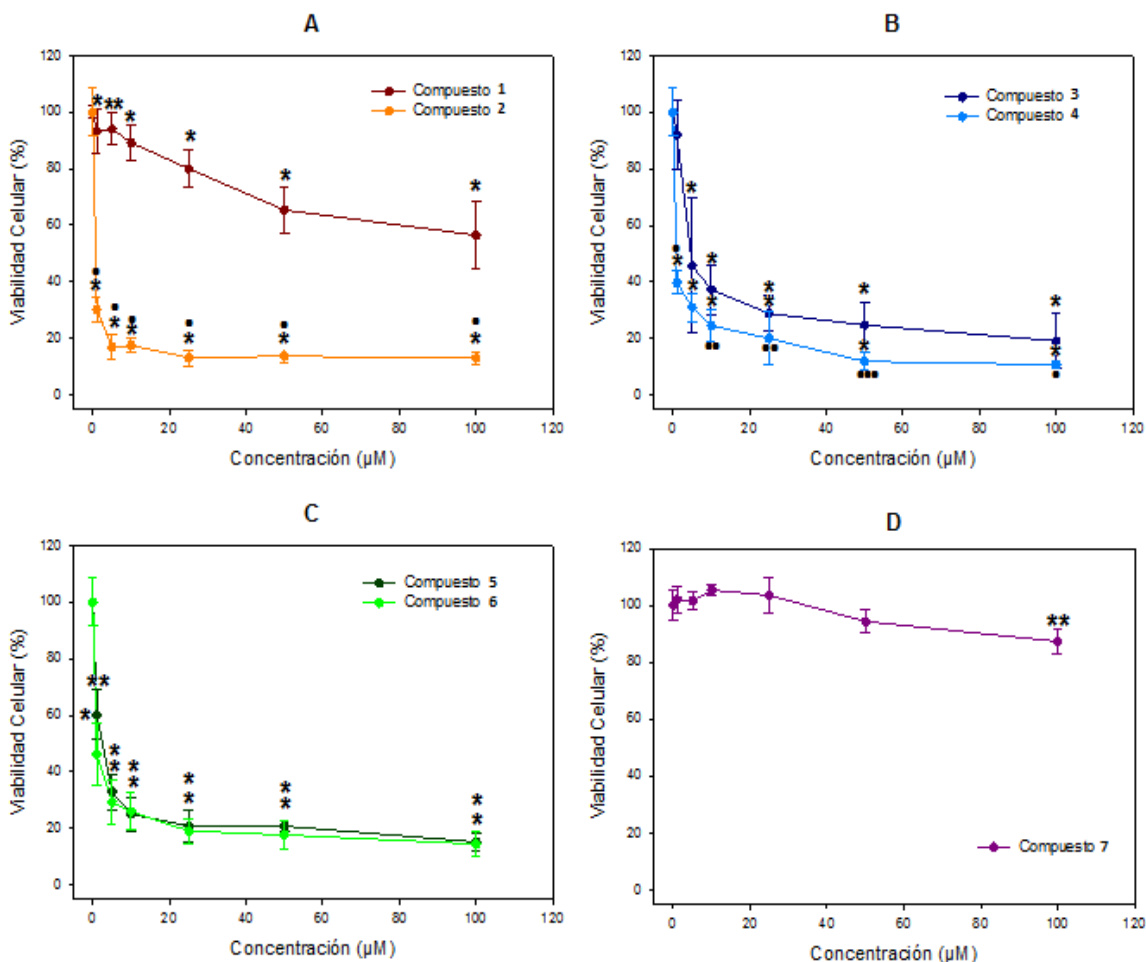
La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **3** y **4**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 1, 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  Mann-Whitney), 10, 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test) y 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test varianzas desiguales).

El compuesto **3** resultó ser más citotóxico a las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$ .

El compuesto **4** resultó ser más citotóxico a las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ .

## Línea celular MCF-7

Los gráficos de la figura 11 muestran los valores de viabilidad celular obtenidos tras cada tratamiento.



**Figura 11: Efecto de los distintos compuestos a diferentes concentraciones en la línea celular MCF-7.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos: **1 y 2 (A)**, **3 y 4 (B)**, **5 y 6 (C)**, y **7 (D)**. Tras 72 horas de tratamiento se empleó el ensayo de sulforodamina B para determinar la viabilidad celular. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar. (Análisis compuesto/control, \*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, \*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test y \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales; análisis compuestos **1/2** y **3/4**, ●:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, ●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test y ●●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

Como se observa en la figura 11, en general hay un incremento en el efecto citotóxico al aumentar la concentración de los tratamientos con los compuestos **1, 2, 3, 4, 5** y **6**.

El efecto sobre la viabilidad celular de todos los tratamientos con los compuestos **1, 2, 4, 5** y **6** (figura 11-A, B y C) presentó disminuciones estadísticamente significativas tras ser comparadas con el control. Con el compuesto **3** no se obtuvo disminución estadísticamente significativa a 1  $\mu\text{M}$  (figura 11-B).

El compuesto **7** presentó disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  (figura 11-D).

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **1** y **2**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 1, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , presentando un  $p < 0.05$  para la prueba Mann-Whitney.

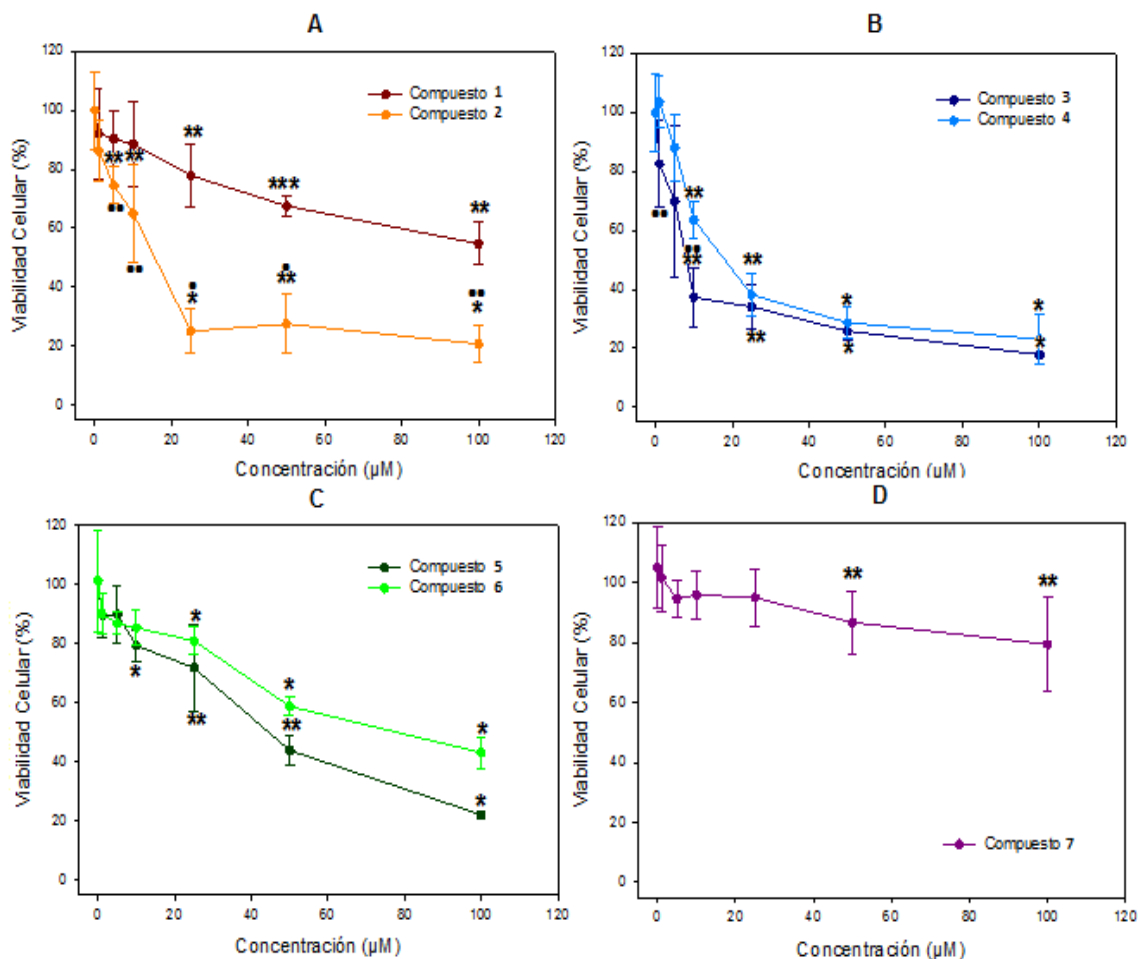
El compuesto **2** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **3** y **4**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 1, 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  Mann-Whitney), 10, 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test) y 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test varianzas desiguales).

El compuesto **4** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

## Línea celular MDA-MB-231

Los gráficos de la figura 12 muestran los valores de viabilidad celular obtenidos tras cada tratamiento.



**Figura 12: Efecto de los distintos compuestos a diferentes concentraciones en la línea celular MDA-MB-231.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos: **1 y 2 (A)**, **3 y 4 (B)**, **5 y 6 (C)**, y **7 (D)**. Tras 72 horas de tratamiento se empleó el ensayo de sulforodamina B para determinar la viabilidad celular. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar. (Análisis compuesto/control, \*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, \*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test y \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales; análisis compuestos **1/2** y **3/4**, ●:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, ●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test y ●●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

Como se observa en la figura 12, en general hay un incremento en el efecto citotóxico al aumentar la concentración de los tratamientos con los compuestos **1, 2, 3, 4, 5, 6** y **7**.

Los tratamientos con los compuestos **1** y **6** presentaron disminuciones estadísticamente significativas de la viabilidad celular en comparación al control, a las concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figura 12-A y C). Los compuestos **3, 4** y **5** presentaron disminuciones estadísticamente significativas de la viabilidad celular a las concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figura 12-B y C), mientras que el compuesto **2** presentó disminución estadísticamente significativa de células viables a las concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figura 12-A).

El compuesto **7** generó una disminución estadísticamente significativa de células viables a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , disminuyendo la viabilidad celular a 79% (figura 12-D).

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **1** y **2**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 5, 10, 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test), 25 y 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  Mann-Whitney).

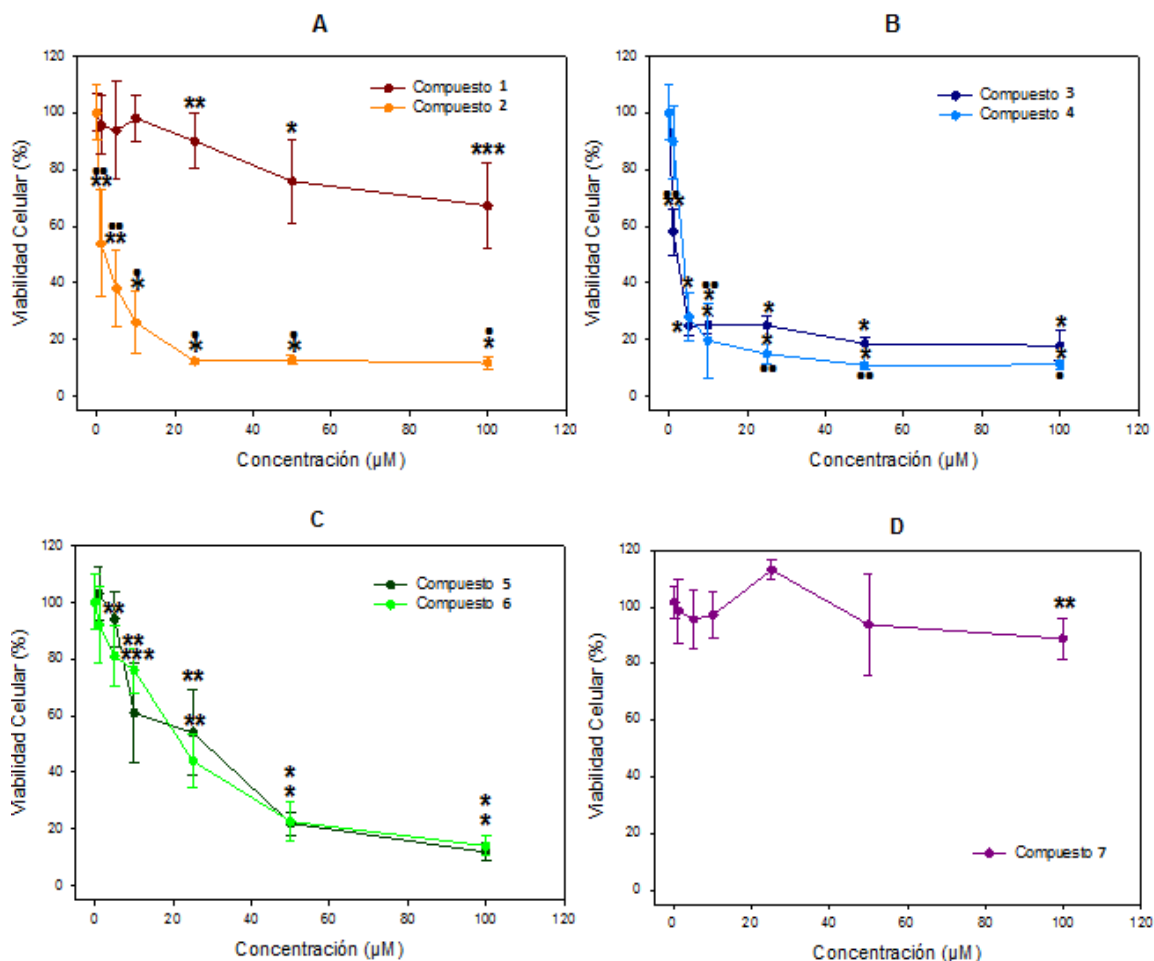
El compuesto **2** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **3** y **4**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test).

El compuesto **3** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

### Línea celular PC-3

En los gráficos de la figura 13 se muestran los resultados de viabilidad celular obtenidos tras cada tratamiento.



**Figura 13: Efecto de los distintos compuestos a diferentes concentraciones en la línea celular PC-3.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos: **1 y 2 (A)**, **3 y 4 (B)**, **5 y 6 (C)**, y **7 (D)**. Tras 72 horas de tratamiento se empleó el ensayo de sulforodamina B para determinar la viabilidad celular. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar. (Análisis compuesto/control, \*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, \*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test y \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales; análisis compuestos **1/2** y **3/4**, ●:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, ●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test y ●●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

Como se observa en la figura 13, en general hay un incremento en el efecto citotóxico al aumentar la concentración de los tratamientos con los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6**.

La viabilidad celular tras todos los tratamientos con los compuestos **2** y **3** (figura 13-A y B) presentó disminuciones estadísticamente significativas tras ser comparadas con el control. Los compuestos **4** y **6** no provocaron disminuciones estadísticamente significativas de células viables a 1  $\mu\text{M}$  (figura 13-B y C). El compuesto **5** presentó disminución estadísticamente significativa de células viables a las concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figura 13-C), mientras que el compuesto **1** presentó disminución estadísticamente significativa de células viables a las concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figura 13-A). El compuesto **7** mostró una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  (figura 13-D).

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **1** y **2**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 1, 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test), 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  Mann-Whitney).

El compuesto **2** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

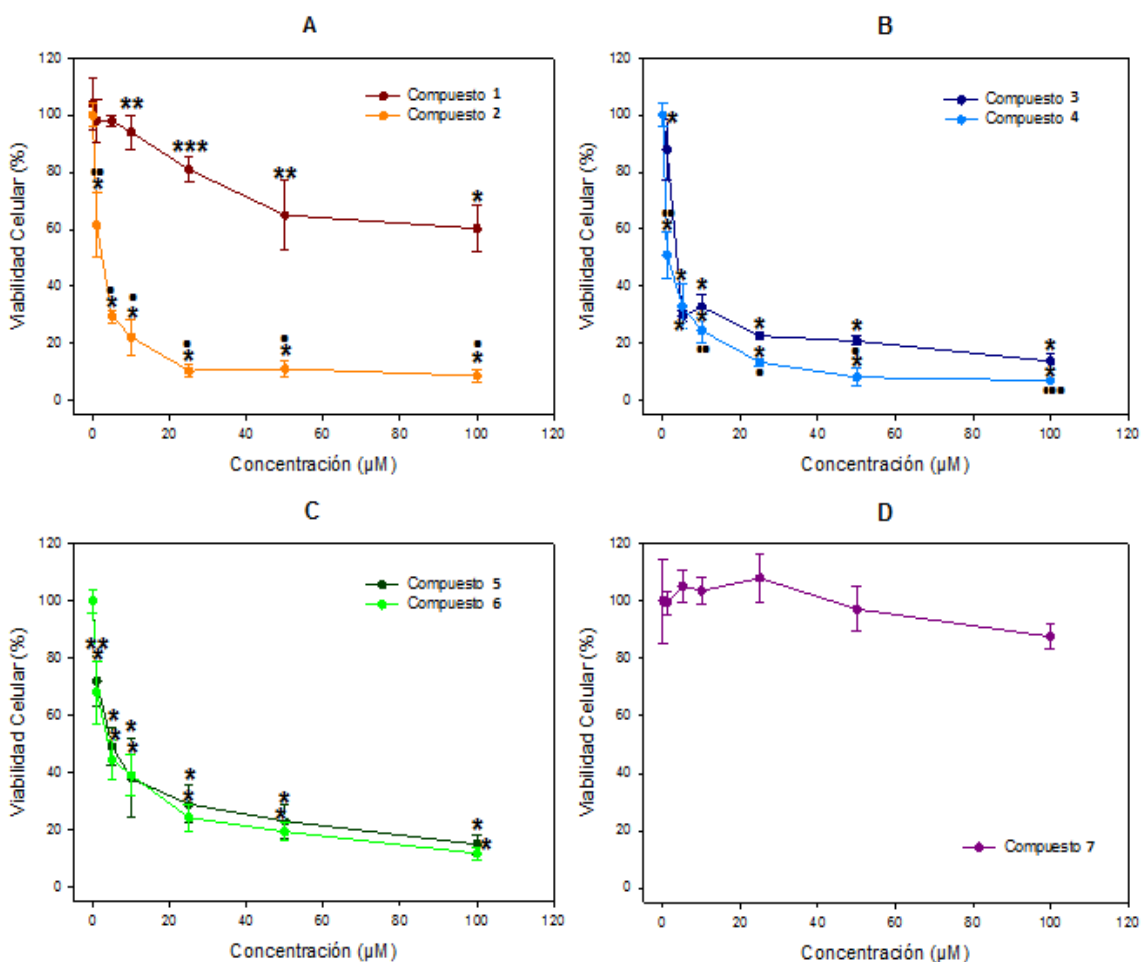
La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **3** y **4**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras los tratamientos a las concentraciones de 1, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test) y 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  Mann-Whitney).

El compuesto **3** resultó ser más citotóxico a las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ .

El compuesto **4** resultó ser más citotóxico a las concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ .

## Línea celular CoN

En los gráficos de la figura 14 se muestran los valores de viabilidad celular obtenidos tras cada tratamiento.



**Figura 14: Efecto de los distintos compuestos a diferentes concentraciones en la línea celular CoN.** Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos: **1 y 2** (A), **3 y 4** (B), **5 y 6** (C), y **7** (D). Tras 72 horas de tratamiento se empleó el ensayo de sulforodamina B para determinar la viabilidad celular. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar. (Análisis compuesto/control, \*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, \*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test y \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales; análisis compuestos **1/2** y **3/4**, ●:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney, ●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test y ●●●:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

El ensayo de viabilidad celular mostró un incremento en la toxicidad celular al aumentar la concentración de los compuestos **1, 2, 3, 4, 5 y 6** (figura 14-B). El efecto sobre la viabilidad celular de 6 de los compuestos presentó disminuciones estadísticamente significativas en la viabilidad celular, tras ser comparado con el control. El tratamiento con el compuesto **1** presentó disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a las concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figura 14-A). Los compuestos **2, 3, 4, 5 y 6**, presentaron disminuciones estadísticamente significativas de la viabilidad celular, tras todas las concentraciones ensayadas (figura 14-A, B y C).

El compuesto **7**, no presentó disminuciones estadísticamente significativas a ninguna de las concentraciones estudiadas.

La comparación del efecto sobre la viabilidad celular entre los compuestos **1 y 2**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras todas las concentraciones ensayadas, en donde el tratamiento con las concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  presentaron un  $p < 0.05$  para la prueba Mann-Whitney y la concentración de 1  $\mu\text{M}$  presentó un  $p < 0.05$  para la prueba T-Test. El compuesto **2** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

La comparación del efecto citotóxico entre los compuestos **3 y 4**, entregó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular obtenidos tras el tratamiento con las concentraciones de 1, 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test), 25, 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  Mann-Whitney) y 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  T-Test varianzas desiguales).

El compuesto **4** resultó ser más citotóxico en todos los casos.

Con los resultados de viabilidad celular obtenidos luego de los distintos tratamientos aplicados en las líneas celulares, se calcularon los valores de IC<sub>50</sub>, utilizando el Software SigmaPlot 11.0, mediante la ecuación:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{-(\text{hillslope})}}$$

Los compuestos con la menor concentración requerida para obtener el 50% de la respuesta deseada (efecto citotóxico) para cada línea celular tumoral se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3:** Valores de IC<sub>50</sub> (µM) obtenidos de cada compuesto evaluado en las distintas líneas celulares. Los valores se expresan con su respectiva desviación estándar.

<b>IC<sub>50</sub> (µM) ± desviación estándar</b>					
Línea celular	CoN	HT-29	MCF-7	PC-3	MDA-MB-231
Compuesto					
<b>1</b>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>2</b>	1.49 ± 0.15	8.65 ± 1.52	0.19 ± 0.08	1.47 ± 0.67	10.77 ± 3.06
<b>3</b>	2.20 ± 0.61	0.089 ± 0.078	3.19 ± 0.56	1.41 ± 0.72	6.35 ± 3.34
<b>4</b>	1.58 ± 0.47	3.74 ± 0.42	0.33 ± 0.14	2.51 ± 0.22	10.68 ± 0.84
<b>5</b>	4.02 ± 0.78	48.73 ± 13.92	1.11 ± 0.12	22.51 ± 15.34	43.99 ± 3.96
<b>6</b>	4.67 ± 1.61	56.99 ± 34.2	0.48 ± 0.05	21.31 ± 5.22	82.27 ± 11.85
<b>7</b>	>100	>100	>100	>100	>100

En la línea celular HT-29 los compuestos **3** y **4** presentaron valores de IC<sub>50</sub> igual a 0.089 ± 0.078 µM y 3.74 ± 0.42 µM, respectivamente. En la línea celular MCF-7 los compuestos **2** y **4** presentaron un valor de IC<sub>50</sub> igual a 0.19 ± 0.08 µM y 0.33 ± 0.14 µM, respectivamente. Mientras que en la línea celular PC-3 los compuestos **3** y **2** con un valor de IC<sub>50</sub> igual a 1.41 ± 0.72 µM y 1.47 ± 0.67 µM. Finalmente, en la línea MDA-MB-231 los compuestos **3** y **4** con un valor de IC<sub>50</sub> igual a 6.35 ± 3.34 µM y 10.68 ± 0.84 µM, respectivamente.

En la línea no tumoral se obtuvo el compuesto **4** y **3**, con un valor de  $IC_{50}$  igual a  $1.58 \pm 0.47 \mu\text{M}$  y  $2.20 \pm 0.61 \mu\text{M}$ , respectivamente.

Los compuestos **1** y **7** presentaron valores de  $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$  en todas las líneas celulares (Tabla 3).

El análisis comparativo entre los compuestos carboxaldehídos y carbinoles (compuestos **1-2**) mostró que el carbinol (compuesto **2**) posee mayor actividad citotóxica en todas las líneas celulares, lo cual puede atribuirse al grupo funcional  $-\text{OH}$  presente en su estructura. Entre los compuestos **3-4** se observaron diferencias entre los valores, donde el carboxaldehído presentó mayor actividad en la línea celular HT-29 y PC-3, mientras que el carbinol mostró mayor efecto en la línea celular MCF-7. La variación entre los compuestos **5** y **6** se encuentra en la posición del heteroátomo (nitrógeno) del ciclo. Se observó que esta diferencia afecta la actividad citotóxica del compuesto **6** en la línea celular MDA-MB-231 donde el valor de  $IC_{50}$  duplicó al obtenido por el compuesto **5**.

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales, se utilizaron los valores de  $IC_{50}$  presentados en la tabla 3.

El índice de selectividad fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\frac{IC_{50} \text{ línea no tumoral}}{IC_{50} \text{ línea tumoral}}$$

El valor de cada índice de selectividad se presenta en la tabla 4.

**Tabla 4:** Valores de índice de selectividad obtenidos para cada compuesto en las líneas celulares tumorales.

**Índice de Selectividad (IC<sub>50</sub> no tumoral/IC<sub>50</sub> tumoral)**

Línea celular	HT-29	MCF-7	PC-3	MDA-MB-231
Compuesto				
<b>1</b>	-	0.97	0.66	0.94
<b>2</b>	0.17	7.84	1.01	0.14
<b>3</b>	24.7	0.69	1.56	0.35
<b>4</b>	0.42	4.79	0.63	0.15
<b>5</b>	0.082	3.62	0.18	0.09
<b>6</b>	0.081	9.73	0.22	0.057
<b>7</b>	1.95	0.73	0.94	-

Se determinó la relación IC<sub>50</sub> línea no tumoral/IC<sub>50</sub> línea tumoral, siendo el valor > 1 cuando la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad en las células no tumorales. En base a lo anterior, los valores de los índices de selectividad (tabla 4) mayores a 1 se presentaron en el compuesto **2** sobre la línea MCF-7 y PC-3, con valores de 7.82 y 1.01, respectivamente; el compuesto **3** en la línea HT-29 y PC-3, con valores de 24.7 y 1.56, respectivamente; el compuesto **4** sobre la línea MCF-7, con un valor de 4.79; el compuesto **5** sobre la línea MCF-7, con un valor de 3.62; el compuesto **6** sobre la línea MCF-7, con un índice de selectividad de 9.73 y el compuesto **7** sobre la línea HT-29, con un índice de selectividad de 1.95.

## ii. Morfología celular

Se analizó cualitativamente el efecto de los distintos compuestos sobre la morfología celular. Para ello, las células fueron tratadas con cada compuesto a 100  $\mu$ M durante 48 horas. Tras los tratamientos las células fueron visualizadas mediante microscopía de contraste de fase.

La morfología celular en todas las líneas celulares estudiadas presentó similitud en los cambios morfológicos tras los tratamientos.

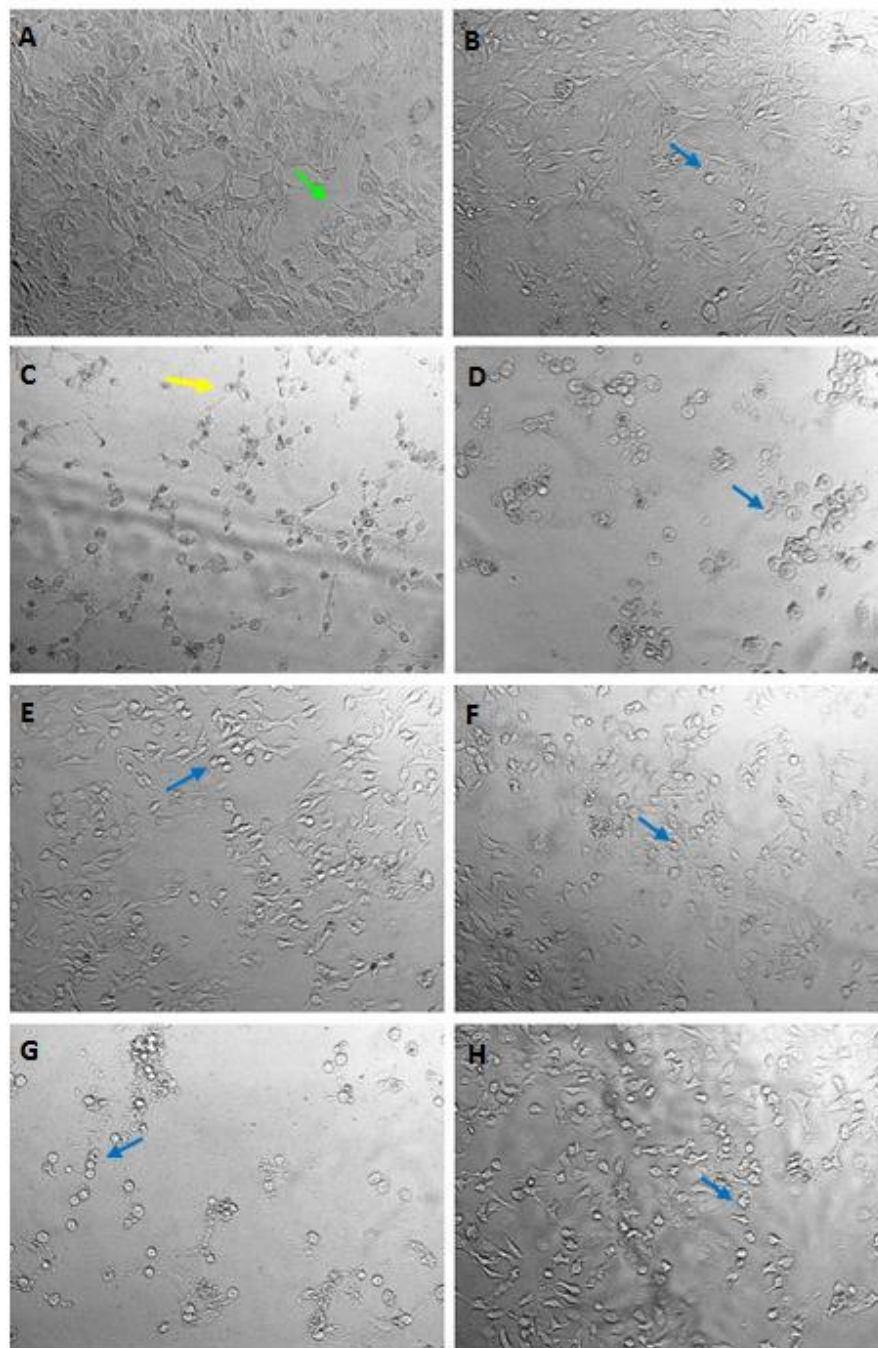
En la figura 15 se presentan las fotografías capturadas tras cada tratamiento.

En el tratamiento control se visualizan células con morfología normal, se presentan células alargadas y confluentes, formando una monocapa celular.

En general se observa claramente un cambio en la morfología tras los tratamientos, en donde las células pierden su forma alargada y muestran una disminución de su tamaño.

Luego de los tratamientos con los compuestos **2**, **3** y **6** se observó mayoritariamente células retraídas y redondeadas en comparación al resto de los tratamientos (figura 15-C, D y G).

Tras los tratamientos con los compuestos **1**, **4**, **5** y **7** las células mostraron una confluencia similar al control (figura 15-A), pero con mayor presencia de células redondeadas (figura 15-B, E, F y H).



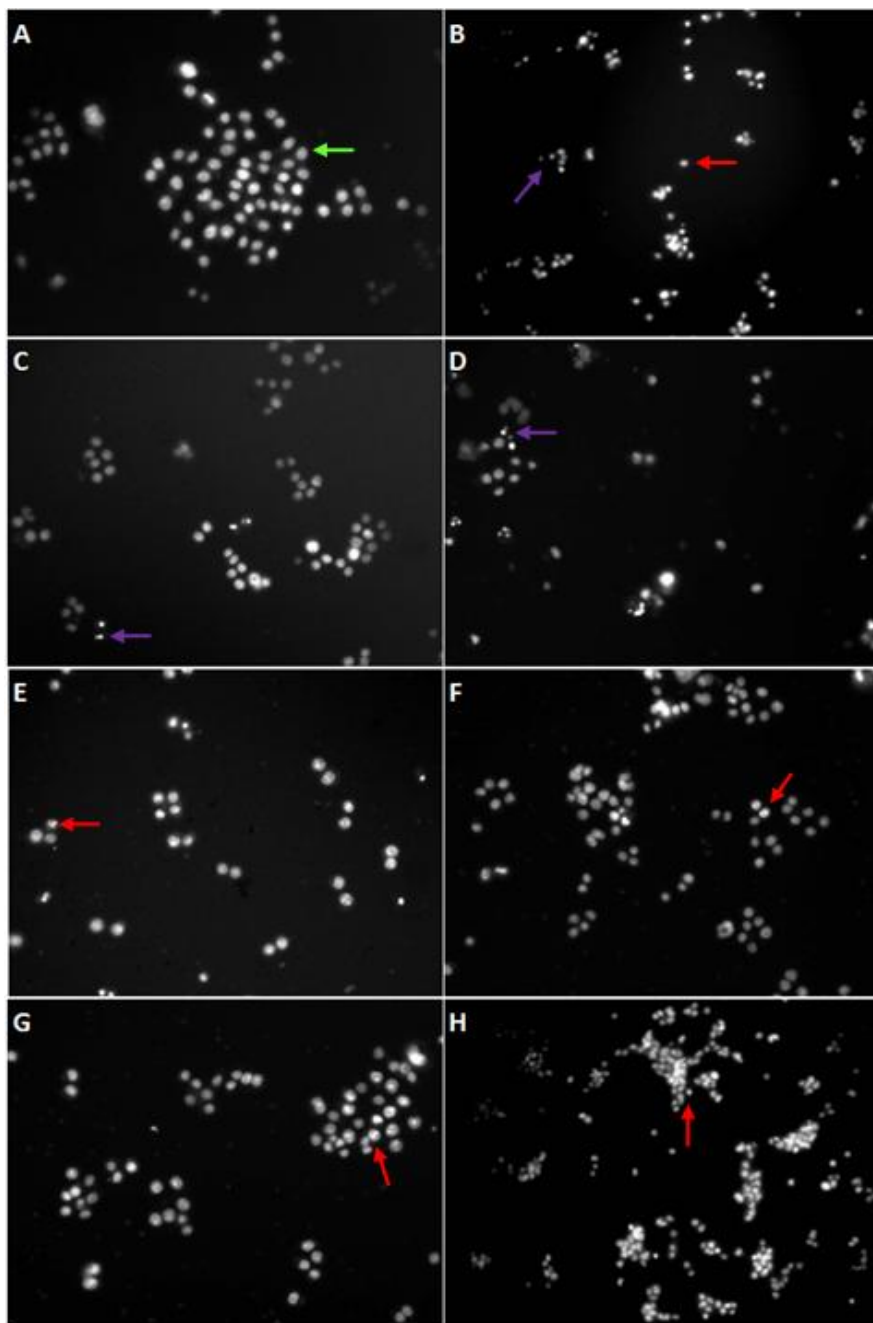
**Figura 15: Efecto de los diferentes compuestos sobre la morfología celular en la línea celular MDA-MB-231.** Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con los diferentes compuestos a una concentración de 100  $\mu$ M. Las células fueron visualizadas y fotografiadas, tras 48 horas de tratamiento, bajo microscopía de contraste de fase a 20X. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (A) control, (B) compuesto **1**, (C) compuesto **2**, (D) compuesto **3**, (E) compuesto **4**, (F) compuesto **5**, (G) compuesto **6** y (H) compuesto **7**. Se visualizan células con morfología normal (flecha verde), células retraídas (flecha amarilla) y células redondeadas (flecha azul).

Se evaluó la morfología nuclear de las líneas celulares tras los tratamientos con los distintos compuestos. Para ello, las células fueron marcadas con Hoechst y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia.

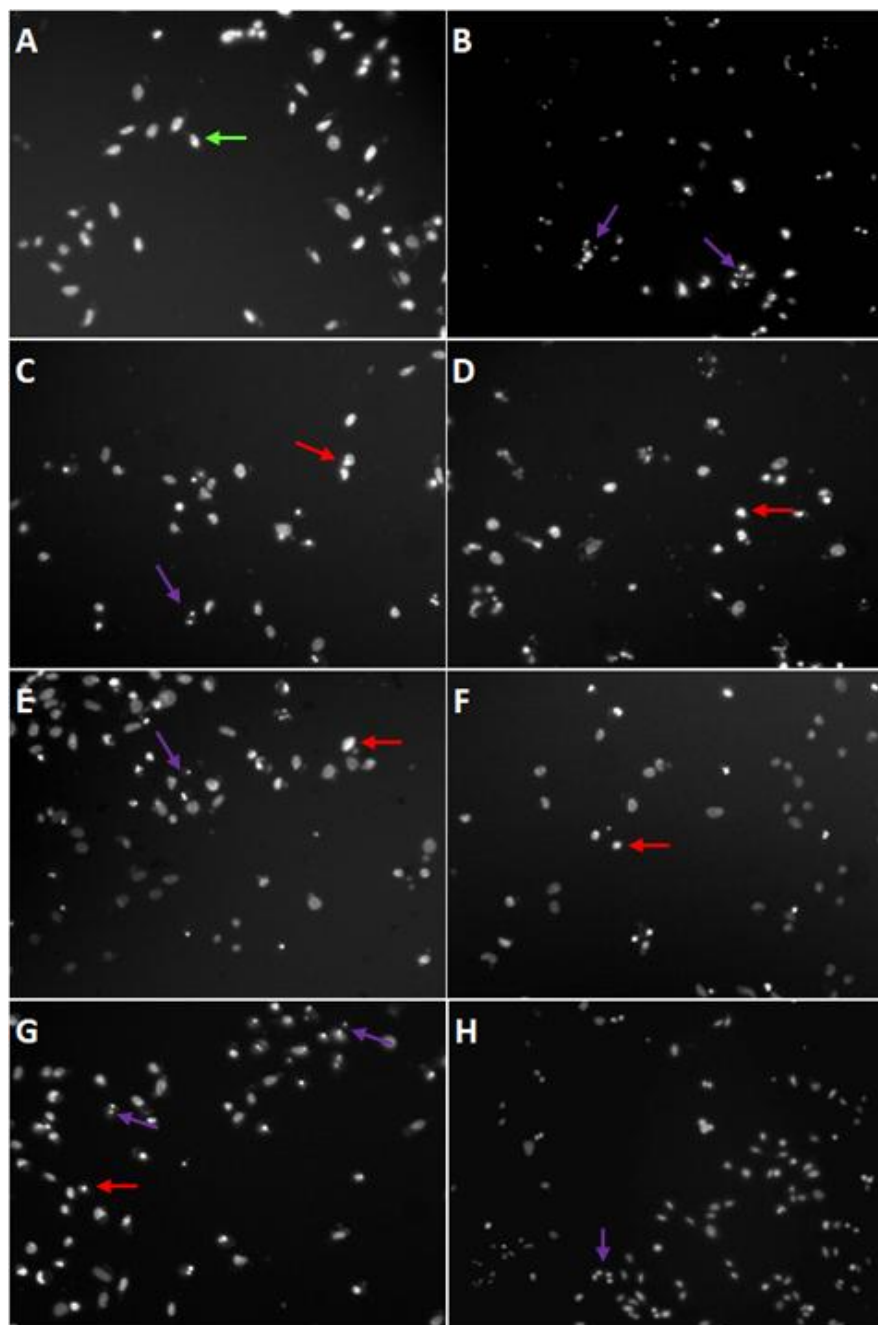
En las figuras 16, 17, 18, 19 y 20 se presentan las fotografías capturadas tras cada tratamiento en la línea celular HT-29, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231 y CoN, respectivamente.

En general, los tratamientos provocaron alteraciones morfológicas en todas las líneas estudiadas. Estas alteraciones incluyen condensación de cromatina y/o fragmentación nuclear.

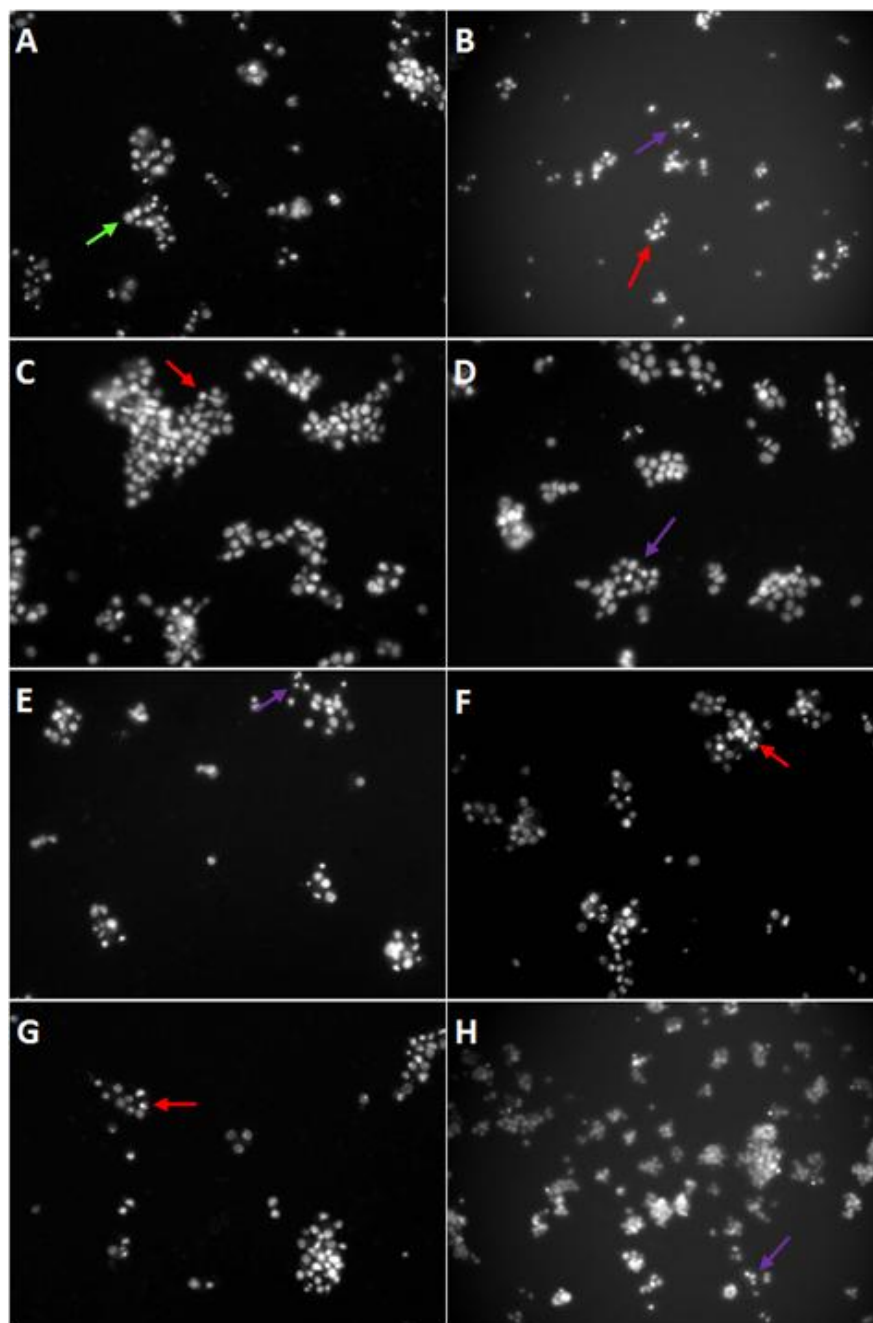
En todos los casos las células presentaron cromatina condensada, con menor presencia en el control.



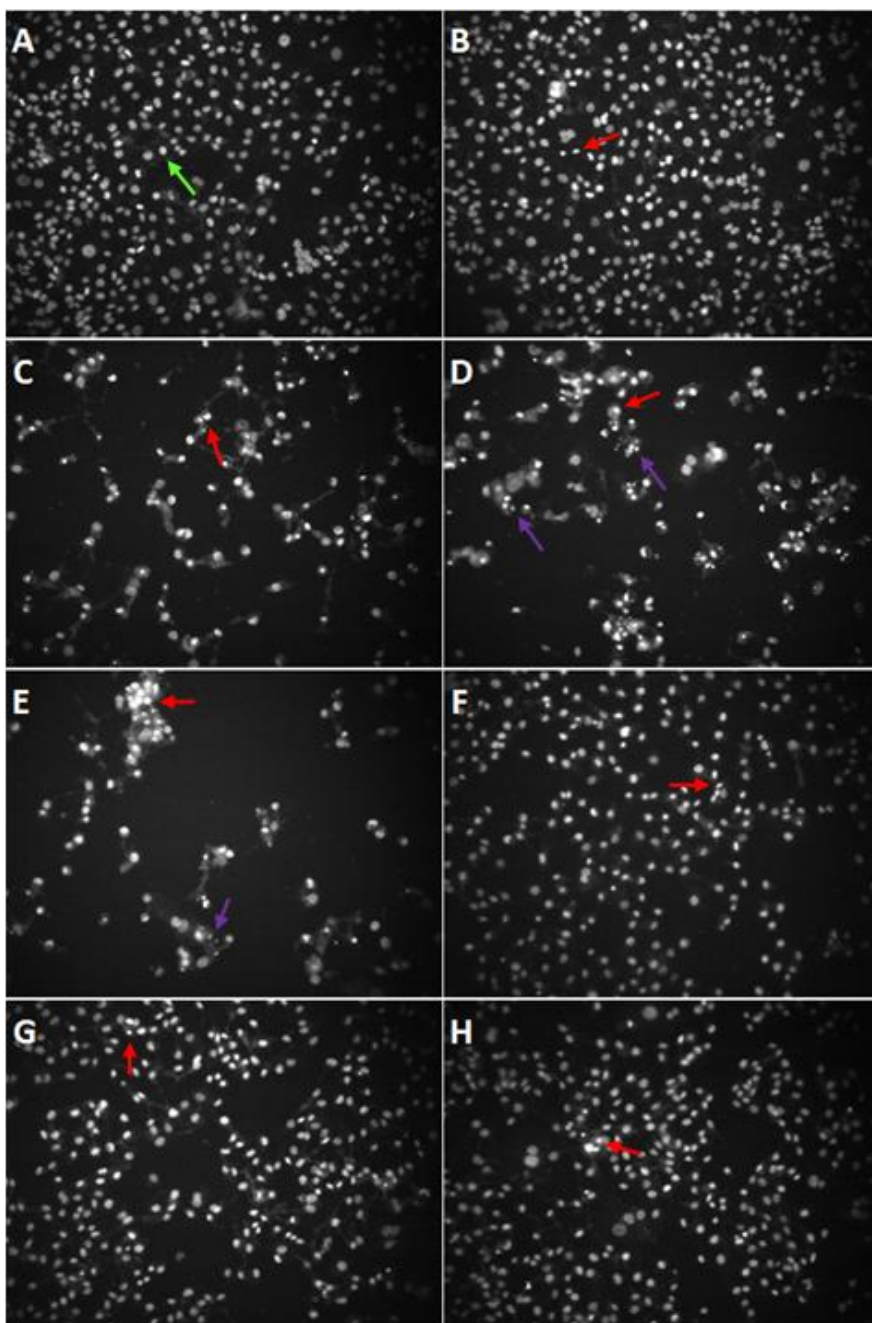
**Figura 16: Efectos de los diferentes compuestos sobre la morfología nuclear en la línea celular HT-29.** Las células HT-29 fueron tratadas con los diferentes compuestos a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Las células fueron marcadas con Hoechst, visualizadas y fotografiadas, tras 48 horas de tratamiento, bajo microscopía de fluorescencia a 20X. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (A) control, (B) compuesto **1**, (C) compuesto **2**, (D) compuesto **3**, (E) compuesto **4**, (F) compuesto **5**, (G) compuesto **6** y (H) compuesto **7**. Se visualiza morfología nuclear normal (flecha verde), condensación de la cromatina (flecha roja) y fragmentación nuclear (flecha morada).



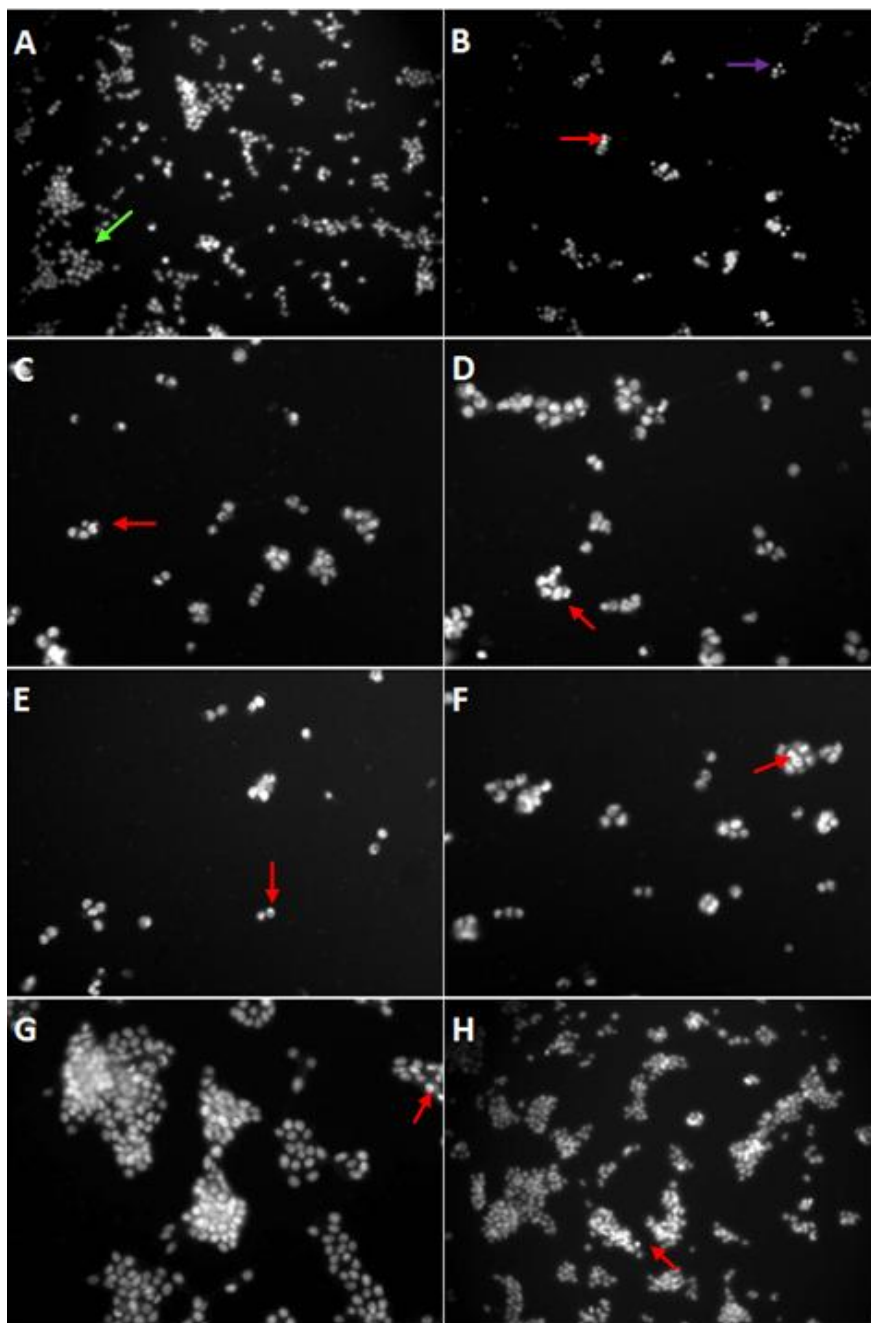
**Figura 17: Efectos de los diferentes compuestos sobre la morfología nuclear en la línea celular PC-3.** Las células PC-3 fueron tratadas con los diferentes compuestos a una concentración de 100  $\mu$ M. Las células fueron marcadas con Hoechst, visualizadas y fotografiadas, tras 48 horas de tratamiento, bajo microscopía de fluorescencia a 20X. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (A) control, (B) compuesto **1**, (C) compuesto **2**, (D) compuesto **3**, (E) compuesto **4**, (F) compuesto **5**, (G) compuesto **6** y (H) compuesto **7**. Se visualiza morfología nuclear normal (flecha verde), condensación de la cromatina (flecha roja) y fragmentación nuclear (flecha morada).



**Figura 18: Efectos de los diferentes compuestos sobre la morfología nuclear en la línea celular MCF-7.** Las células MCF-7 fueron tratadas con los diferentes compuestos a una concentración de 100  $\mu$ M. Las células fueron marcadas con Hoechst, visualizadas y fotografiadas, tras 48 horas de tratamiento, bajo microscopía de fluorescencia a 20X. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (A) control, (B) compuesto **1**, (C) compuesto **2**, (D) compuesto **3**, (E) compuesto **4**, (F) compuesto **5**, (G) compuesto **6** y (H) compuesto **7**. Se visualiza morfología nuclear normal (flecha verde), condensación de la cromatina (flecha roja) y fragmentación nuclear (flecha morada).



**Figura 19: Efectos de los diferentes compuestos sobre la morfología nuclear en la línea celular MDA-MB-231.** Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con los diferentes compuestos a una concentración de 100  $\mu$ M. Las células fueron marcadas con Hoechst, visualizadas y fotografiadas, tras 48 horas de tratamiento, bajo microscopía de fluorescencia a 20X. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (A) control, (B) compuesto **1**, (C) compuesto **2**, (D) compuesto **3**, (E) compuesto **4**, (F) compuesto **5**, (G) compuesto **6** y (H) compuesto **7**. Se visualiza morfología normal (flecha verde), condensación de la cromatina (flecha roja) y fragmentación nuclear (flecha morada).



**Figura 20: Efectos de los diferentes compuestos sobre la morfología nuclear en la línea celular CoN.** Las células CoN fueron tratadas con los diferentes compuestos a una concentración de 100  $\mu$ M. Las células fueron marcadas con Hoechst, visualizadas y fotografiadas, tras 48 horas de tratamiento, bajo microscopía de fluorescencia a 20X. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (A) control, (B) compuesto **1**, (C) compuesto **2**, (D) compuesto **3**, (E) compuesto **4**, (F) compuesto **5**, (G) compuesto **6** y (H) compuesto **7**. Se visualiza morfología normal (flecha verde), condensación de la cromatina (flecha roja) y fragmentación nuclear (flecha morada).

### iii. Muerte Celular

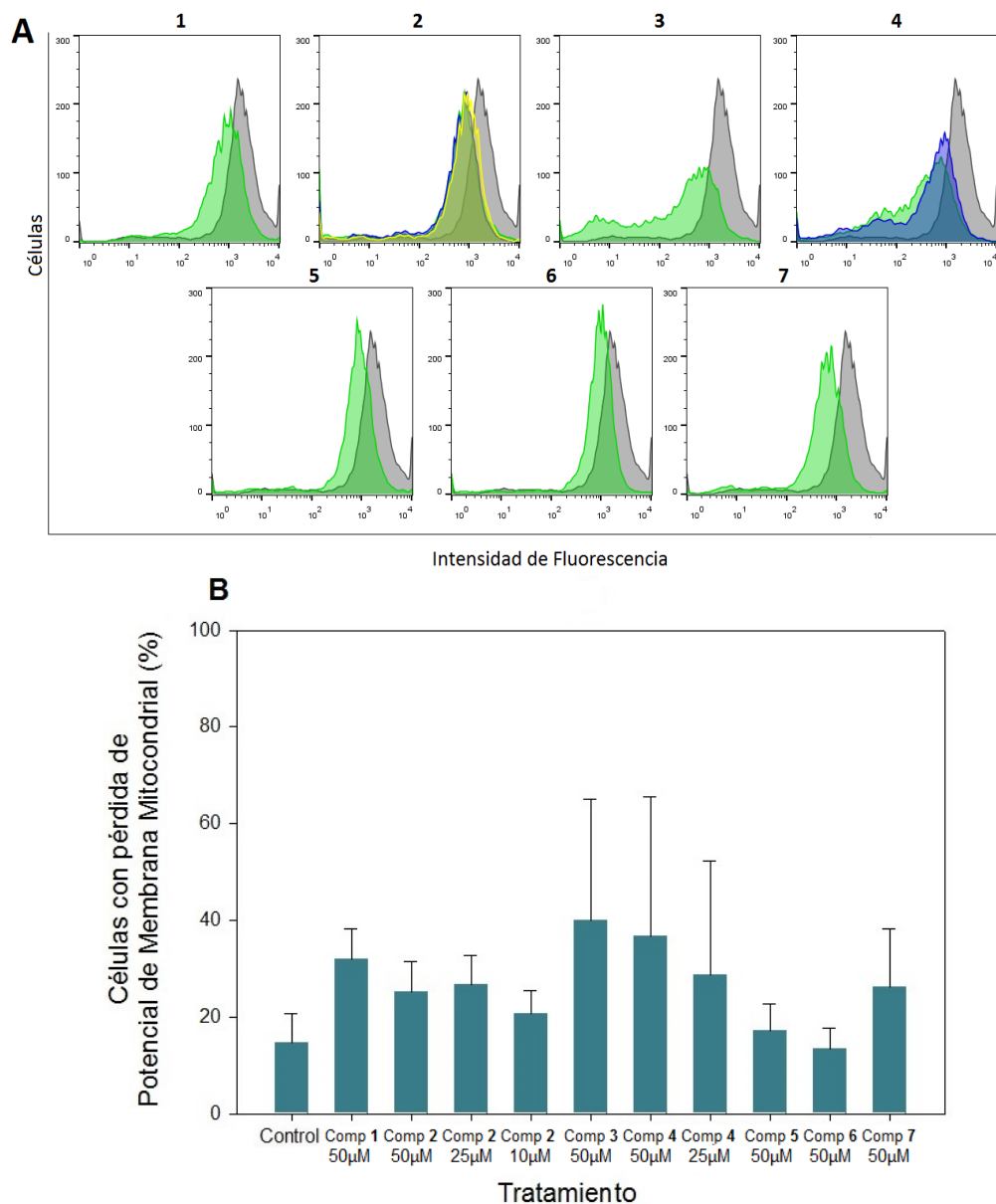
#### Potencial de membrana mitocondrial

Se evaluó si el efecto apoptótico se encontraba relacionado con la pérdida de potencial de membrana mitocondrial. Para ello, las células fueron tratadas con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de cada compuesto. En el caso del compuesto **2** se incorporaron las concentraciones 10 y 25  $\mu\text{M}$ ; en el compuesto **4** se incorporó la concentración 25  $\mu\text{M}$  a evaluar. Tras 24 horas de tratamiento las células fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría de flujo.

En las figuras 21, 22, 23 y 24 se muestran los histogramas representativos tras 24 horas de tratamiento en las líneas celulares HT-29, PC-3, MDA-MB-231 y CoN, respectivamente, junto a los porcentajes de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial.

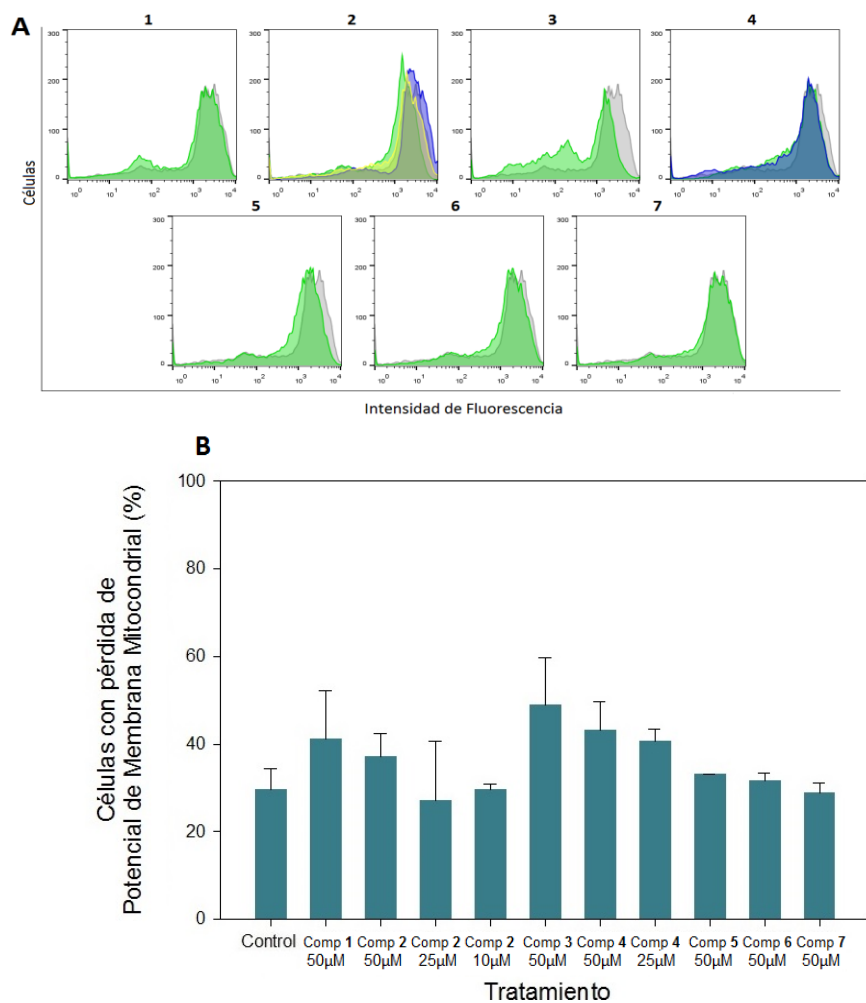
Los tratamientos con los compuestos **3** (50  $\mu\text{M}$ ) y **4** (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) afectaron el potencial de membrana mitocondrial, evidenciado por un efecto disipador del potencial en todas las líneas celulares tumorales estudiadas.

En la línea celular HT-29 se produjo un descenso de la intensidad de fluorescencia tras los tratamientos con los compuestos **1** (50  $\mu\text{M}$ ), **3** (50  $\mu\text{M}$ ) y **4** (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) (Figura 21-B), lo que reflejaría una disminución del potencial de membrana mitocondrial. El porcentaje de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial en el control es de 15%. Los compuestos **1**, **3** y **4** aumentaron el porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial reducido a 32%, 40%, 29% y 37%, respectivamente.



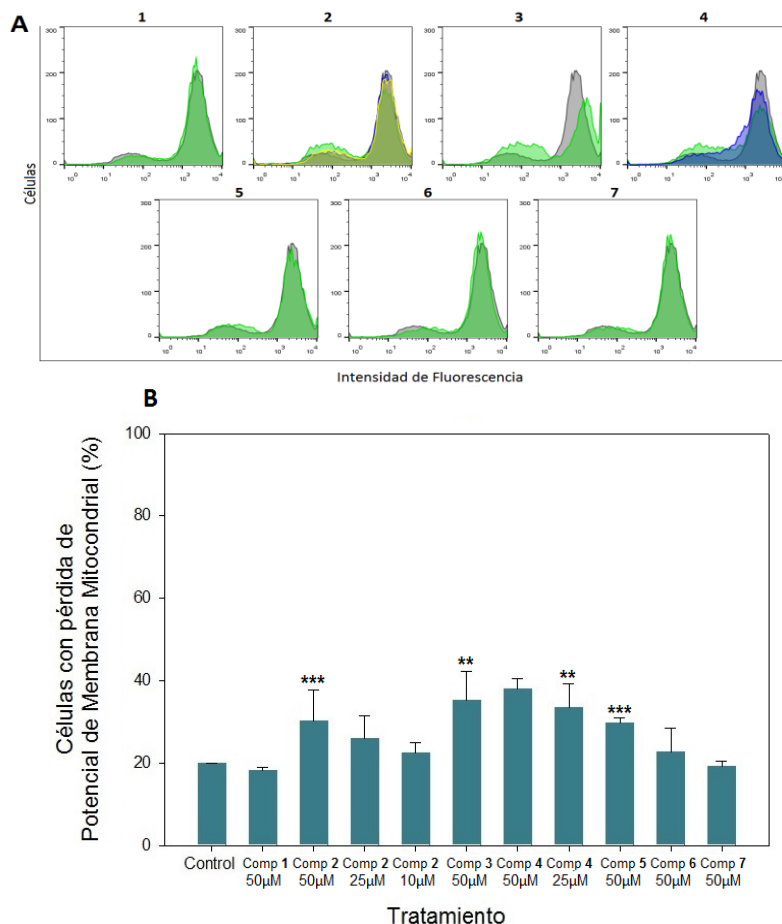
**Figura 21: Efecto de los distintos compuestos sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular HT-29.** Las células HT-29 fueron tratadas con los distintos compuestos a diferentes concentraciones. Tras 24 horas de tratamiento fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría de flujo (filtro FL1). **(A)** Histogramas representativos del efecto de los diferentes compuestos a distintas concentraciones sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) compuesto **1**, (2) compuesto **2**, (3) compuesto **3**, (4) compuesto **4**, (5) compuesto **5**, (6) compuesto **6** y (7) compuesto **7**. El tratamiento control (gris), el tratamiento a 50 μM (verde), el tratamiento a 25 μM (azul) y el tratamiento a 10 μM (amarillo). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial reducido. Se grafica el porcentaje de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial con su respectiva desviación estándar.

En la línea celular PC-3 se observó un aumento de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial en comparación al control entre los tratamientos con los compuestos **1** (50 $\mu$ M), **3** (50 $\mu$ M) y **4** (25 y 50 $\mu$ M) (figura 22-B). Las células desplazadas a zonas de menor intensidad de fluorescencia (figura 22-A) presentaron el 41%, 49%, 41% y 43%, respectivamente.



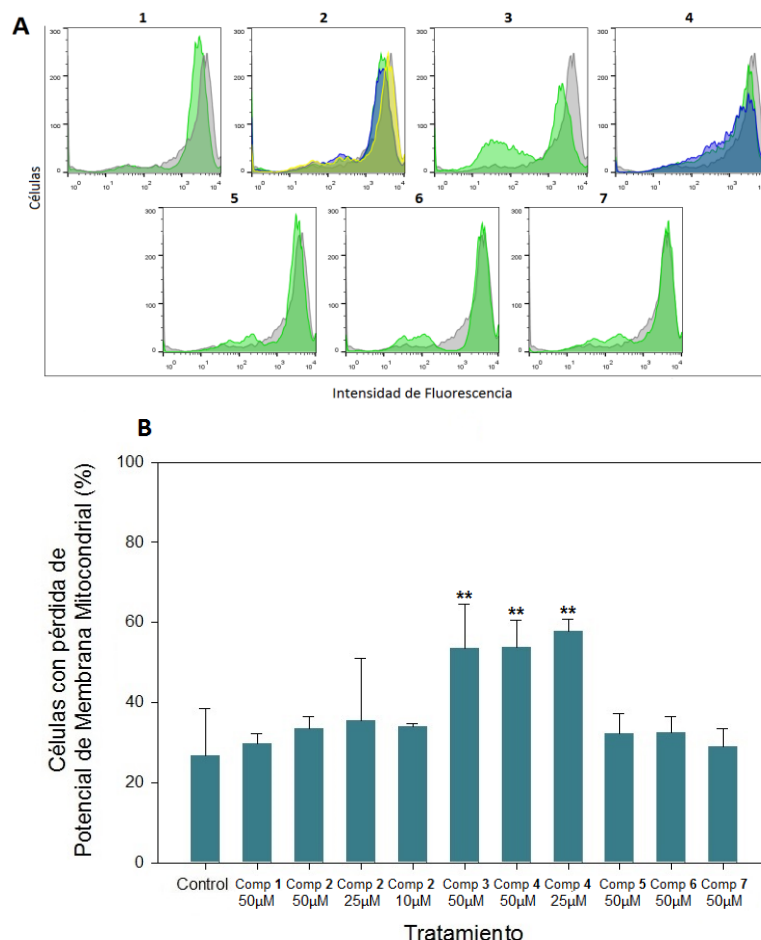
**Figura 22: Efecto de los distintos compuestos sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular PC-3.** Las células PC-3 fueron tratadas con los distintos compuestos a diferentes concentraciones. Tras 24 horas de tratamiento fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría de flujo (filtro FL1). **(A)** Histogramas representativos del efecto de los diferentes compuestos a distintas concentraciones sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) compuesto **1**, (2) compuesto **2**, (3) compuesto **3**, (4) compuesto **4**, (5) compuesto **5**, (6) compuesto **6** y (7) compuesto **7**. El tratamiento control (gris), el tratamiento a 50  $\mu$ M (verde), el tratamiento a 25  $\mu$ M (azul) y el tratamiento a 10  $\mu$ M (amarillo). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial reducido. Se grafica el porcentaje de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial con su respectiva desviación estándar.

En la línea celular MDA-MB-231, los tratamientos con los compuestos **2** (50  $\mu$ M), **3** (50  $\mu$ M) y **4** (50  $\mu$ M), provocaron una disminución de la intensidad de fluorescencia (figura 23-A) de una población de células correspondientes a 30%, 35% y 38% de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial (figura 23-B), en comparación al tratamiento control. De los tratamientos que provocaron el mayor incremento de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial, los compuestos **2** y **3** presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación al control.



**Figura 23: Efecto de los distintos compuestos sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231.** Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con los distintos compuestos a diferentes concentraciones. Tras 24 horas de tratamiento fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría de flujo (filtro FL1). **(A)** Histogramas representativos del efecto de los diferentes compuestos a distintas concentraciones sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) compuesto **1**, (2) compuesto **2**, (3) compuesto **3**, (4) compuesto **4**, (5) compuesto **5**, (6) compuesto **6** y (7) compuesto **7**. El tratamiento control (gris), el tratamiento a 50  $\mu$ M (verde), el tratamiento a 25  $\mu$ M (azul) y el tratamiento a 10  $\mu$ M (amarillo). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial reducido. Se grafica el porcentaje de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial con su respectiva desviación estándar. (\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test \*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

En la línea celular CoN se observó un incremento de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial, tras los tratamientos con los compuestos **3** (50  $\mu$ M) y **4** (25 y 50  $\mu$ M) (figura 24-B). Los tratamientos antes mencionados presentaron 54%, 54% y 58% de células con potencial de membrana reducido, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación al control.



**Figura 24: Efecto de los distintos compuestos sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular CoN.** Las células CoN fueron tratadas con los distintos compuestos a diferentes concentraciones. Tras 24 horas de tratamiento fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría de flujo (filtro FL1). **(A)** Histogramas representativos del efecto de los diferentes compuestos a distintas concentraciones sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) compuesto **1**, (2) compuesto **2**, (3) compuesto **3**, (4) compuesto **4**, (5) compuesto **5**, (6) compuesto **6** y (7) compuesto **7**. El tratamiento control (gris), el tratamiento a 50  $\mu$ M (verde), el tratamiento a 25  $\mu$ M (azul) y el tratamiento a 10  $\mu$ M (amarillo). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial reducido. Se grafica el porcentaje de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial con su respectiva desviación estándar. (\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test).

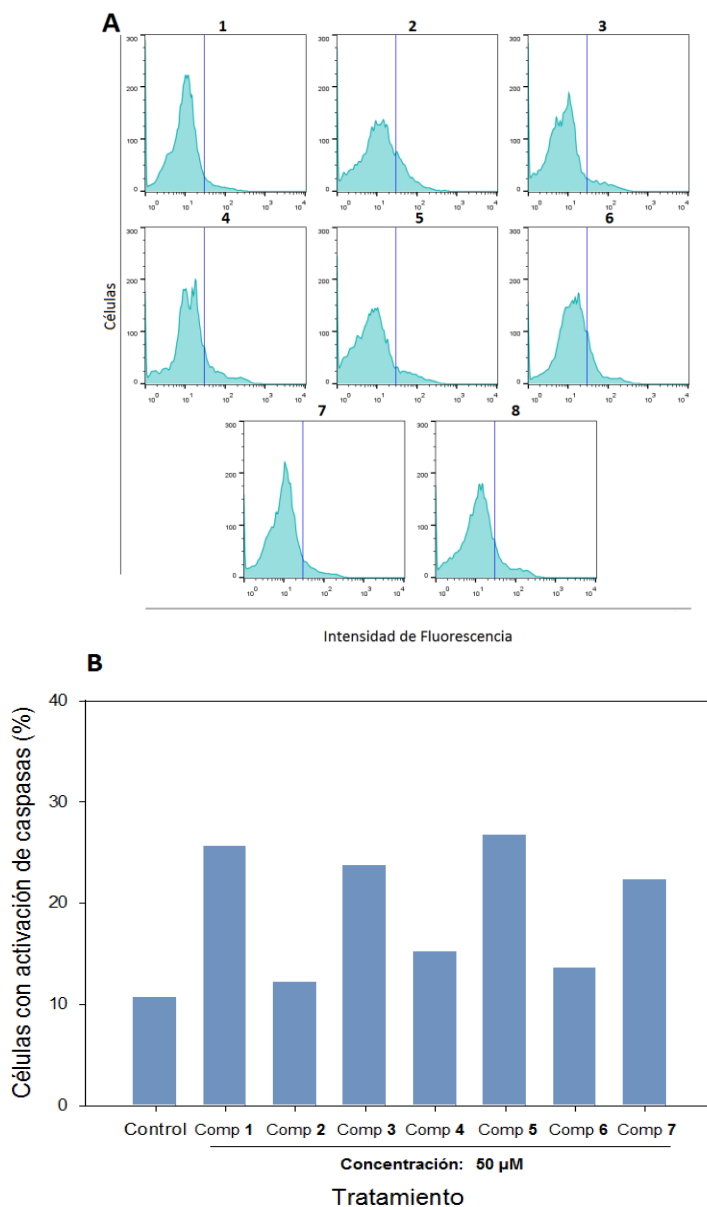
### **Activación de caspasas**

Este ensayo se presenta como resultado preliminar, debido a que el  $n$  no es suficiente para realizar análisis estadísticos y no se analizaron todas las líneas celulares.

Para establecer el efecto de los distintos compuestos sobre la activación de caspasas, como un proceso relevante en la definición de la muerte celular por apoptosis, se evaluaron los compuestos a la máxima concentración ensayada en el experimento anterior de muerte celular. Tras 48 horas de tratamiento las células fueron marcadas con CaspACE y analizadas mediante citometría de flujo.

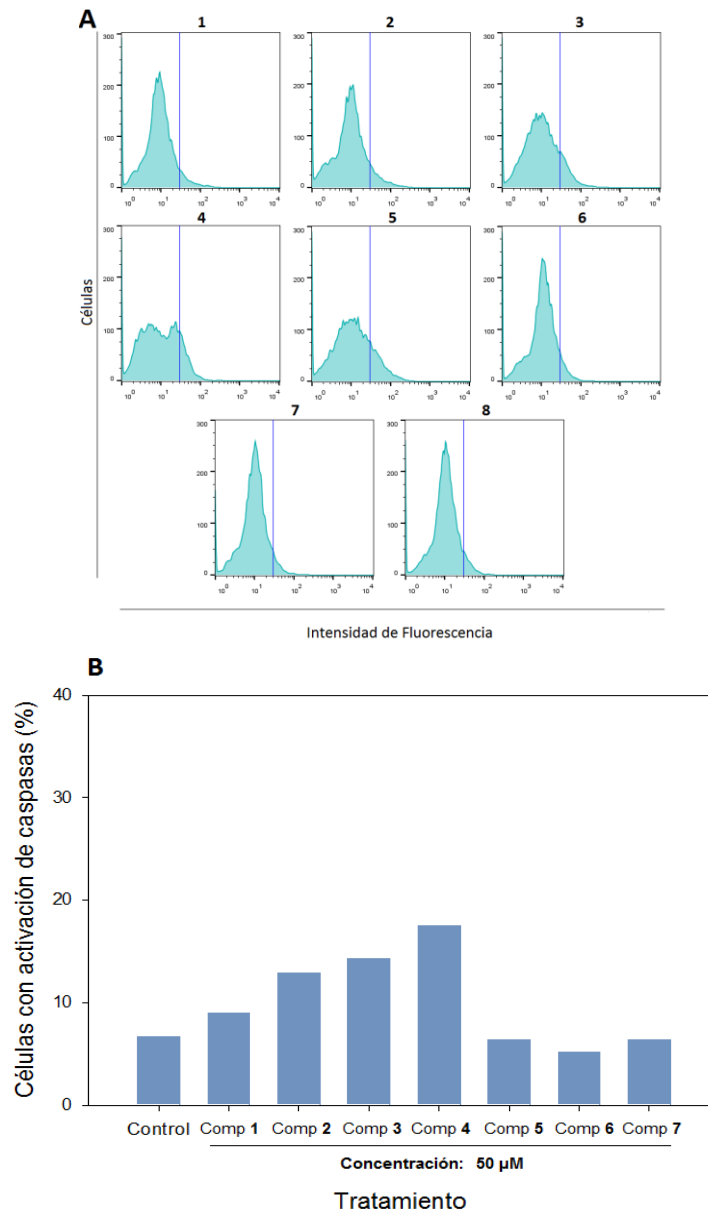
En las figuras 25 y 26 se muestran los histogramas del efecto de los distintos compuestos sobre la activación de caspasas en las líneas celulares PC-3 y MDA-MB-231, respectivamente, junto a los porcentajes de células con caspasas activas.

En la línea celular PC-3 se observa que todos los compuestos ensayados presentaron un aumento de la actividad de caspasas (figura 25-B). Los tratamientos con los compuestos **1**, **3**, **5** y **7**, presentaron un mayor incremento de la actividad de caspasas de más del doble en comparación al control.



**Figura 25: Efecto de los distintos compuestos sobre la activación de caspasas en la línea celular PC-3.** Las células PC-3 fueron tratadas con los distintos compuestos a una concentración de 50 μM. Tras 48 horas de tratamiento, las células fueron marcadas con CaspACE y analizadas por citometría de flujo (filtro FL-1). **(A)** Histogramas del efecto de los distintos compuestos a una concentración de 50 μM sobre la activación de caspasas. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) control, (2) compuesto **1**, (3) compuesto **2**, (4) compuesto **3**, (5) compuesto **4**, (6) compuesto **5**, (7) compuesto **6** y (8) compuesto **7**. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con caspasas activas.

En la línea celular MDA-MB-231 se observa un aumento de la actividad de caspasas tras los tratamientos con los compuestos **2**, **3** y **4** (figura 26-B) de más del doble respecto el control.

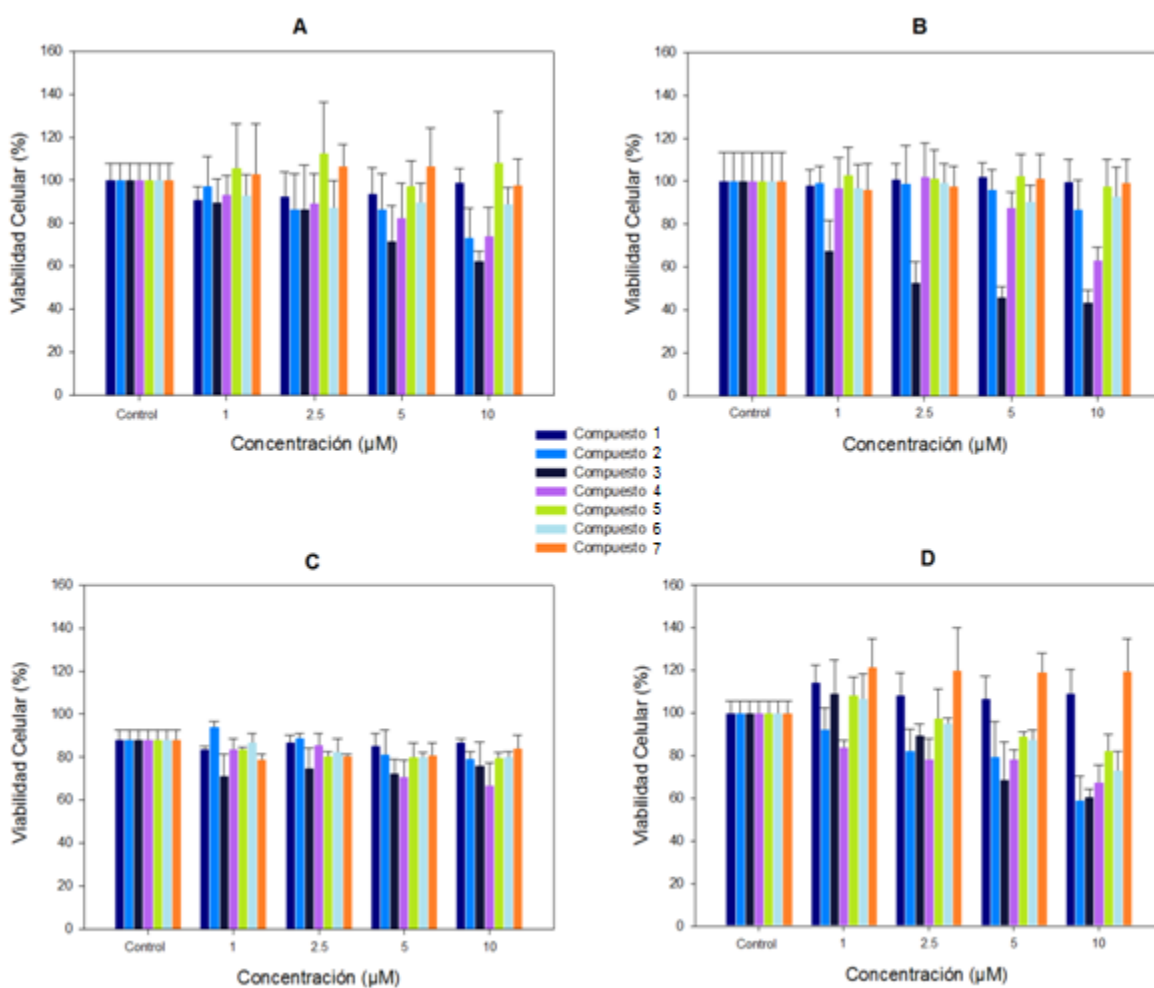


**Figura 26: Efecto de los distintos compuestos sobre la activación de caspasas en la línea celular MDA-MB-231.** Las células MDA-MB-231 fueron tratadas con los distintos compuestos a una concentración de 50  $\mu$ M. Tras 48 horas de tratamiento, las células fueron marcadas con CaspACE y analizadas por citometría de flujo (filtro FL-1). **(A)** Histogramas del efecto de los distintos compuestos a una concentración de 50  $\mu$ M sobre la activación de caspasas. Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) control, (2) compuesto **1**, (3) compuesto **2**, (4) compuesto **3**, (5) compuesto **4**, (6) compuesto **5**, (7) compuesto **6** y (8) compuesto **7**. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células con caspasas activas.

#### iv. Migración

##### Ensayo de la herida

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la migración celular, las líneas celulares fueron tratadas con cada compuesto a concentraciones bajas durante 24 horas para observar el efecto citotóxico sobre ellas (figura 27). En base a estos datos de citotoxicidad se seleccionaron las concentraciones con las que se tratarían las células.



**Figura 27: Efecto de los diferentes compuestos sobre la viabilidad celular.** Porcentajes de viabilidad celular según el método de sulforodamina B obtenidos tras 24 horas de tratamiento con distintas concentraciones de los compuestos: **1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7** en las líneas celulares: (A) HT-29, (B) PC-3, (C) MDA-MB-231 y (D) CoN (D). Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar.

En la evaluación del efecto de los 7 compuestos sobre la migración celular con los tratamientos de 10  $\mu$ M, se trabajó con concentraciones bajas para evitar una elevada citotoxicidad, para evitar la muerte celular, lo cual podría condicionar los resultados en el ensayo de migración.

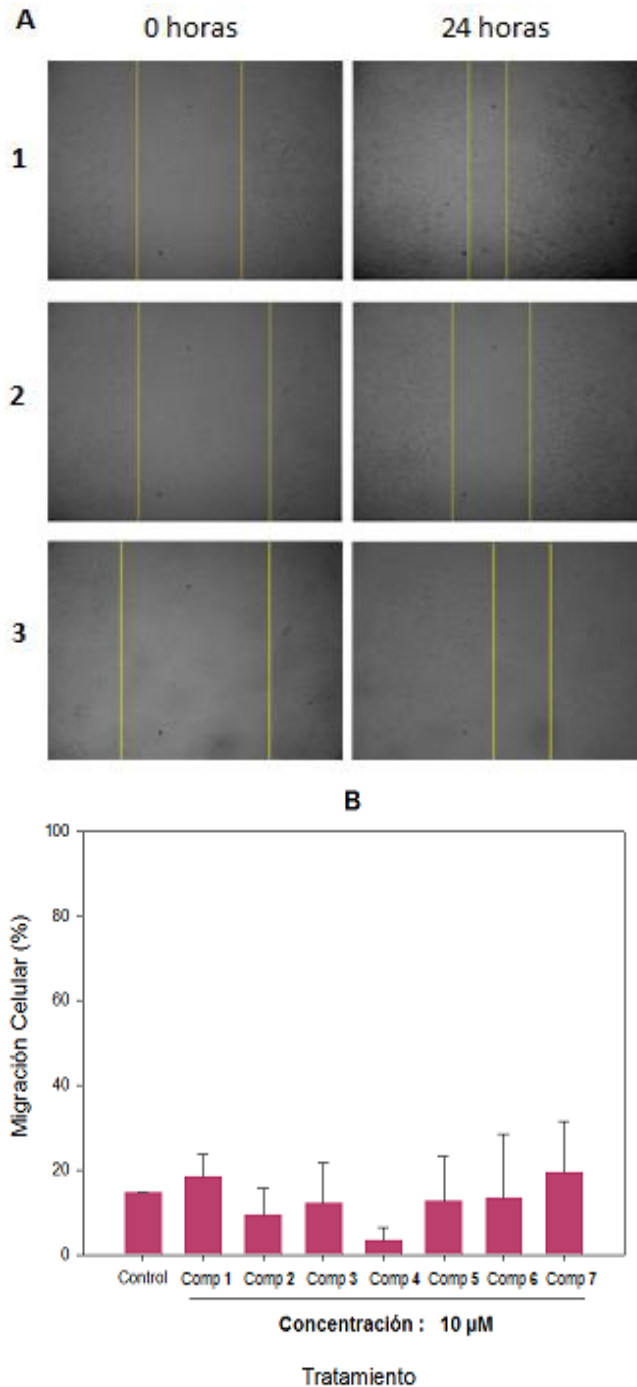
A continuación se presentan imágenes representativas correspondientes a los campos fotografiados para analizar el efecto de los tratamientos sobre la migración celular mediante el ensayo de la herida, junto a la cuantificación del área de la herida tras cada tratamiento.

Los efectos sobre las líneas celulares HT-29, PC-3, MDA-MB-231 y CoN se observan en las figuras 28, 29, 30 y 31, respectivamente.

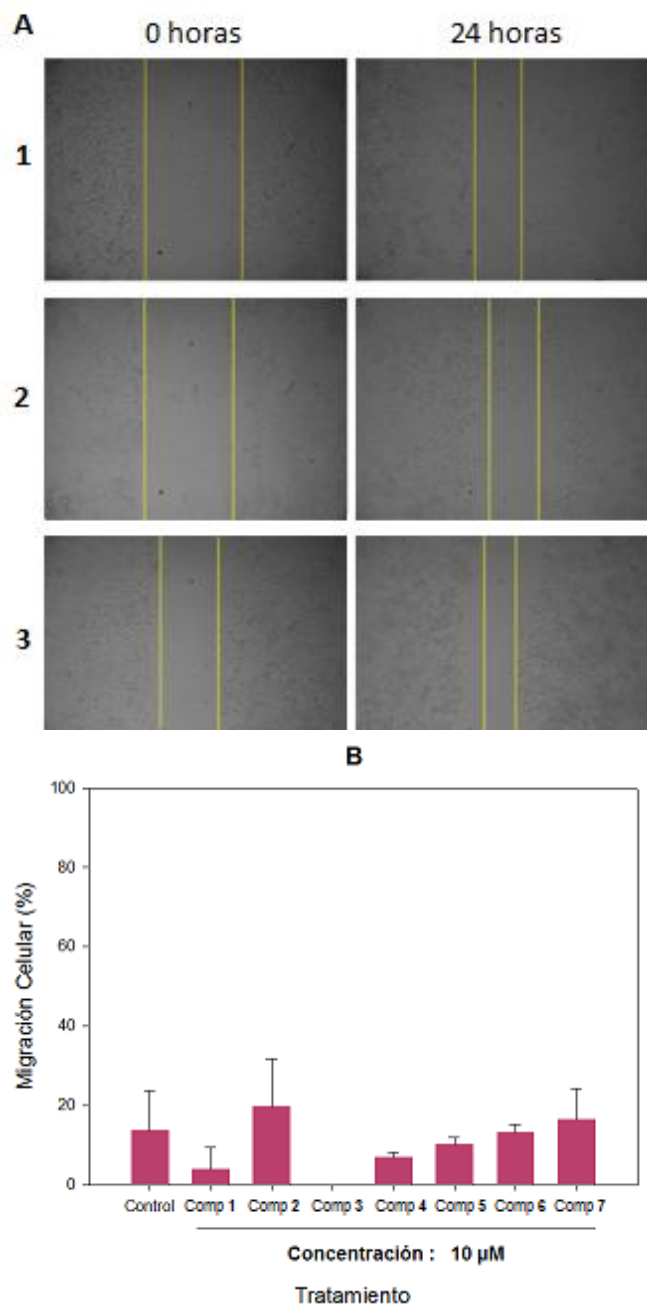
Los resultados muestran que no hubo una disminución estadísticamente significativa de la migración celular en comparación al control en las líneas HT-29, PC-3 y MDA-MB-231 (Figura 28-B, 29-B y 30-B), mientras que en la línea celular CoN, el tratamiento con el compuesto **4** fue el único que provocó una disminución estadísticamente significativa de la migración celular en comparación al control ( $p < 0.05$ ) (figura 31-B).

Los tratamientos con los compuestos **3**, **4**, **5** y **6** presentaron disminuciones de la migración celular en comparación al control en las líneas celulares tumorales HT-29 y PC-3 (Figura 28-B y 29-B).

En la línea celular tumoral MDA-MB-231 todos los compuestos provocaron un aumento de la migración celular, en donde el compuesto **6** presentó diferencias estadísticamente significativas.

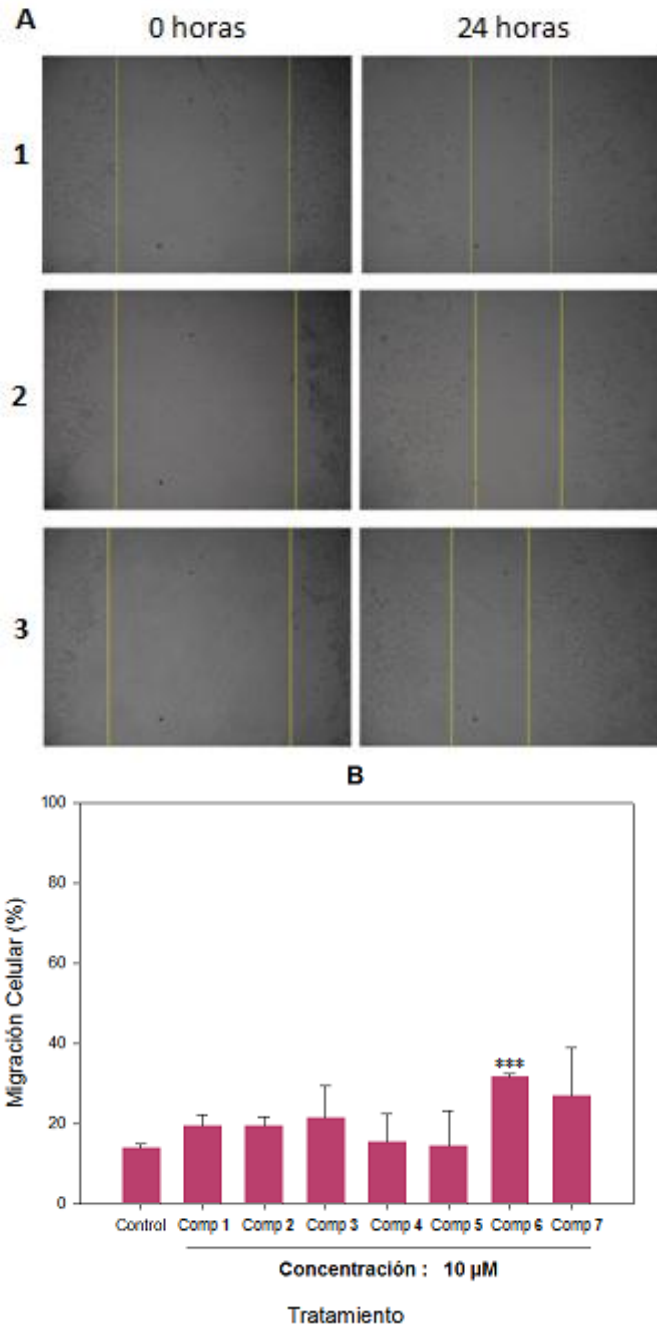


**Figura 28: Efecto de los diferentes compuestos sobre la migración celular en la línea celular HT-29.** Se realizó una herida con una punta de micropipeta a la monocapa celular. Las células fueron tratadas con los diferentes compuestos y fotografiadas a tiempo 0 y 24 horas de tratamiento. **(A)** Imágenes representativas a tiempo 0 y 24 horas del efecto de diferentes compuestos a una concentración de 10  $\mu$ M sobre la migración celular mediante el ensayo de la herida. Las imágenes corresponden a los tratamientos: (1) control, (2) compuesto **4** y (3) compuesto **2**. **(B)** Cuantificación del porcentaje del área de la herida ocupada por células. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar.

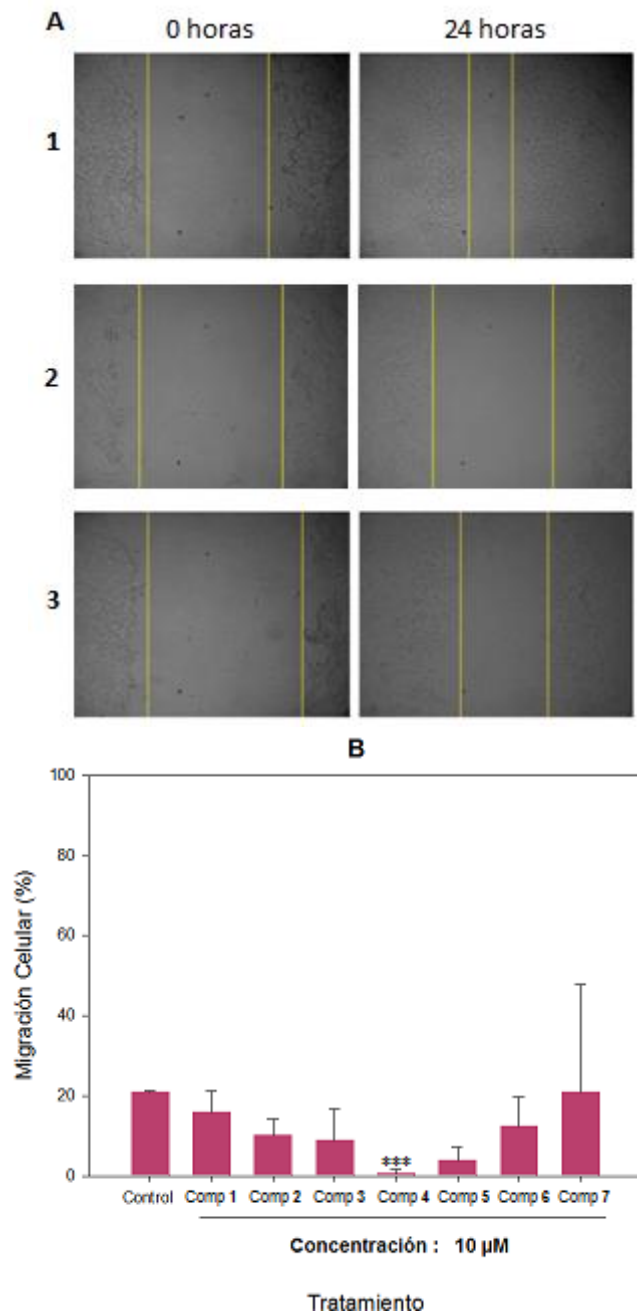


**Figura 29: Efecto de los diferentes compuestos sobre la migración celular en la línea celular PC-3.**

Se realizó una herida con una punta de micropipeta a la monocapa celular. Las células fueron tratadas con los diferentes compuestos y fotografiadas a tiempo 0 y 24 horas de tratamiento. **(A)** Imágenes representativas a tiempo 0 y 24 horas del efecto de diferentes compuestos a una concentración de 10  $\mu$ M sobre la migración celular mediante el ensayo de la herida. Las imágenes corresponden a los tratamientos: (1) control, (2) compuesto **1** y (3) compuesto **3**. **(B)** Cuantificación del porcentaje del área de la herida ocupada por células. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar.



**Figura 30: Efecto de los diferentes compuestos sobre la migración celular en la línea celular MDA-MB-231.** Se realizó una herida con una punta de micropipeta a la monocapa celular. Las células fueron tratadas con los diferentes compuestos y fotografiadas a tiempo 0 y 24 horas de tratamiento. **(A)** Imágenes representativas a tiempo 0 y 24 horas del efecto de diferentes compuestos a una concentración de 10 µM sobre la migración celular mediante el ensayo de la herida. Las imágenes corresponden a los tratamientos: (1) control, (2) compuesto **4** y (3) compuesto **5**. **(B)** Cuantificación del porcentaje del área de la herida ocupada por células. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos versus el control, con su respectiva desviación estándar. (\*\*\*:  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).



**Figura 31: Efecto de los diferentes compuestos sobre la migración celular en la línea celular CoN.**

Se realizó una herida con una punta de micropipeta a la monocapa celular. Las células fueron tratadas con los diferentes compuestos y fotografiadas a tiempo 0 y 24 horas de tratamiento. **(A)** Imágenes representativas a tiempo 0 y 24 horas del efecto de diferentes compuestos a una concentración de 10  $\mu$ M sobre la migración celular mediante el ensayo de la herida. Las imágenes corresponden a los tratamientos: (1) control, (2) compuesto **4** y (3) compuesto **2**. **(B)** Cuantificación del porcentaje del área de la herida ocupada por células. (\*\*\*) :  $p < 0.05$  prueba T-Test varianzas desiguales).

## Ensayo de migración con transwell

Por otra parte se estudió la capacidad de las células HT-29 y PC-3 de migrar utilizando un quimioatrayente (SBF 10%), tras los tratamientos indicados en la Tabla 2.

En este ensayo las células son expuestas a 24 horas de tratamiento y luego sembradas en la parte superior de la cámara de migración en medio con suero al 1%, mientras que en la parte inferior se encuentra el quimioatrayente (medio con suero al 10%). Se evaluó la capacidad de migración luego de 24 horas.

El área ocupada por células migradas en la membrana de la cámara de migración tras los tratamientos fue comparada con el control.

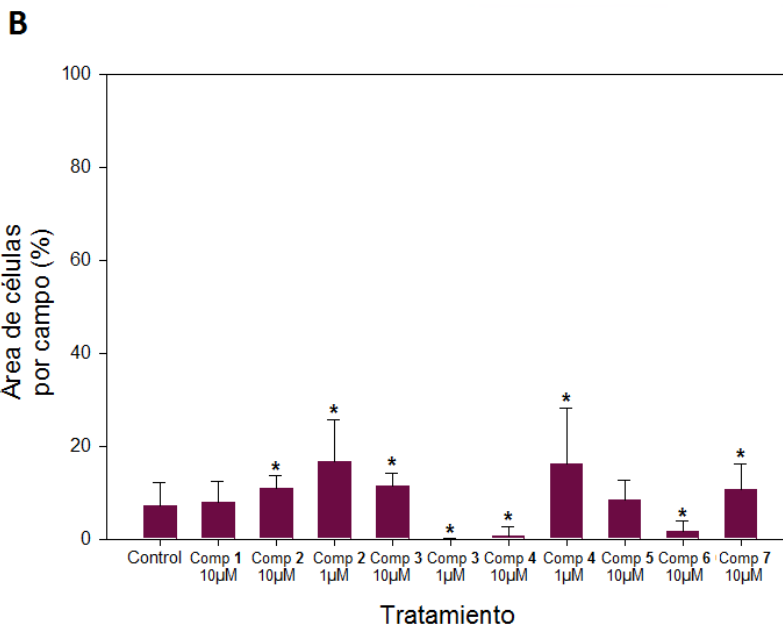
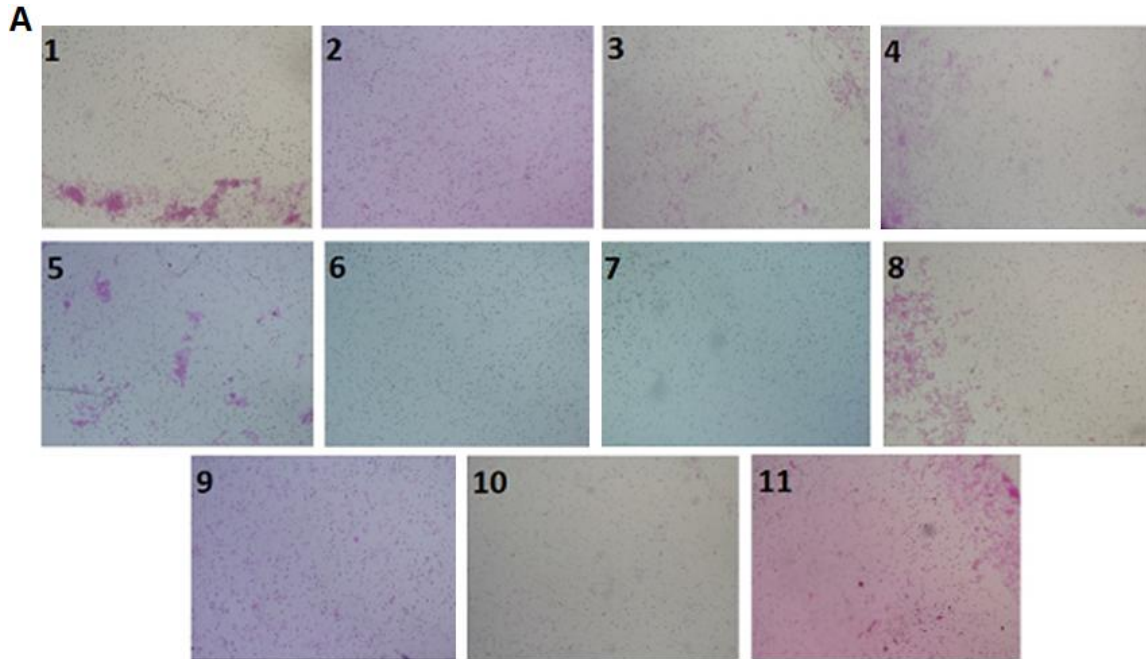
A continuación se presentan imágenes representativas de los campos fotografiados para analizar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la migración celular mediante el ensayo de migración con transwell, junto a la cuantificación del área de la membrana del transwell ocupada por células tras cada tratamiento.

Los efectos sobre las líneas celulares HT-29 y PC-3 se observan en las figuras 32 y 33, respectivamente.

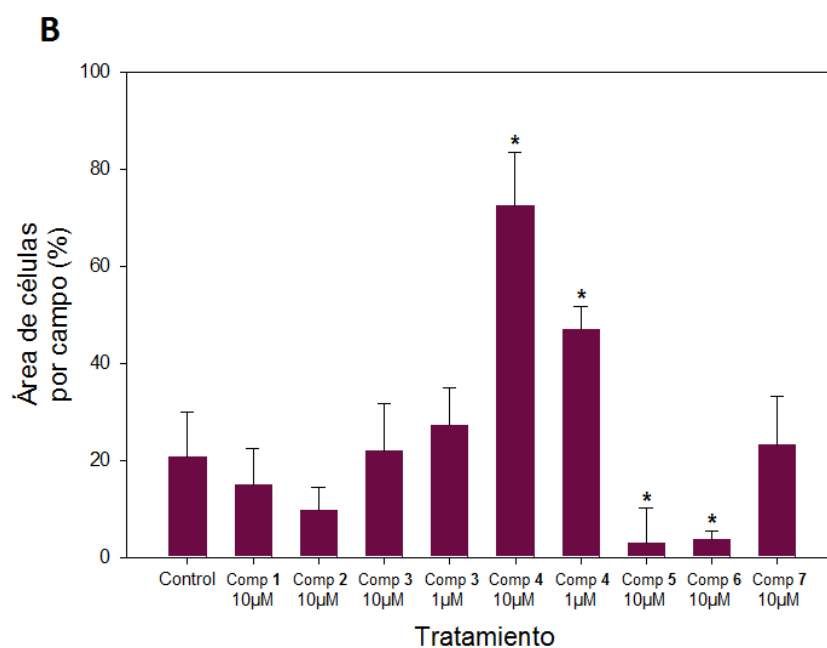
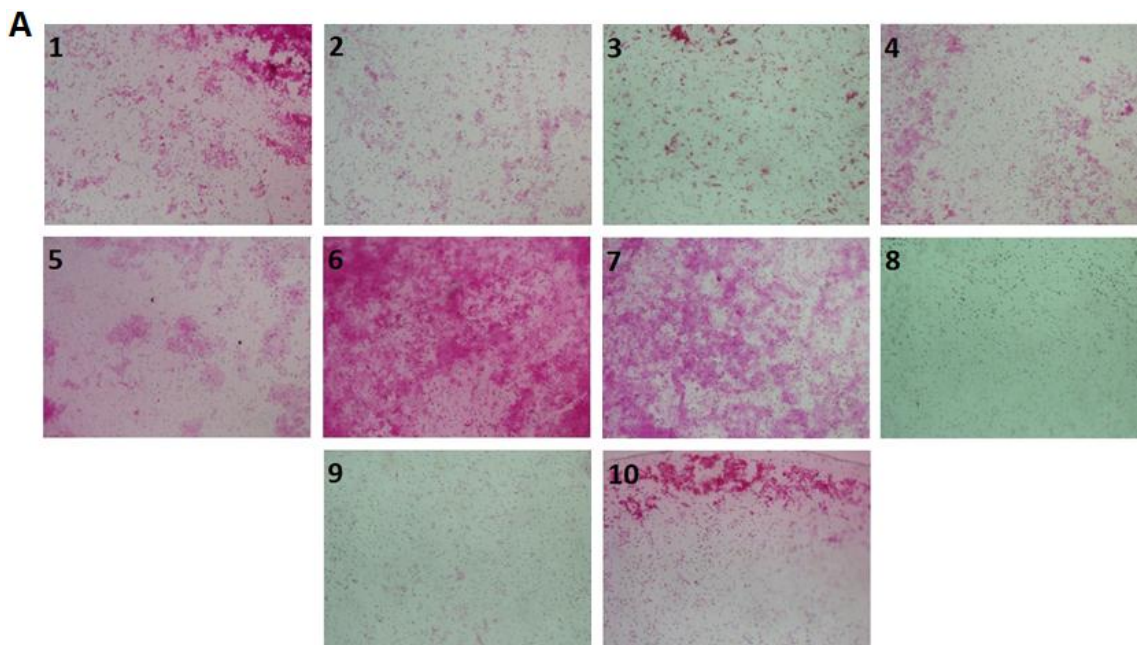
Se observó una disminución del área ocupada por células HT-29 en la membrana de la cámara de migración tratadas con los compuestos **3** a 1  $\mu\text{M}$ , **4** a 10  $\mu\text{M}$  y **6** a 10  $\mu\text{M}$ , presentando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

El resto de los tratamientos llevó a un aumento de la migración celular en comparación al control, presentando diferencias estadísticamente significativas, los tratamientos con los compuestos **2** a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ; compuesto **3** a 10  $\mu\text{M}$ ; compuesto **4** a 1  $\mu\text{M}$  y el compuesto **7** a 10  $\mu\text{M}$  (Figura 32-B).

La migración celular en la línea PC-3 mostró disminución con diferencias estadísticamente significativas tras los tratamientos con los compuestos **5** a 10  $\mu\text{M}$  y **6** a 10  $\mu\text{M}$ , en comparación con el control. Estos tratamientos presentaron una disminución de la migración celular de 18% y 19%, respectivamente. La migración celular control presentó un valor de 21% (figura 33-B). Los tratamientos con los compuestos **1** a 10  $\mu\text{M}$  y **2** a 10  $\mu\text{M}$  presentaron un área menor de células migradas sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Los tratamientos con el compuesto **4** presentaron aumento de la migración celular con diferencias estadísticamente significativas (figura 33-B).



**Figura 32: Efecto de los compuestos sobre la migración celular mediante ensayo en cámara de migración en línea celular HT-29.** Las células HT-29 fueron tratadas con los compuestos, contadas y sembradas sobre la membrana porosa de la cámara de migración. **(A)** Imágenes representativas del efecto de diferentes compuestos a distintas concentraciones mediante el ensayo de la cámara de migración (Transwell). Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) control, (2) compuesto **1** (10 µM), (3) compuesto **2** (10 µM), (4) compuesto **2** (1 µM), (5) compuesto **3** (10 µM), (6) compuesto **3** (1 µM), (7) compuesto **4** (10 µM), (8) compuesto **4** (1 µM), (9) compuesto **5** (10 µM), (10) compuesto **6** (10 µM) y (11) compuesto **7** (10 µM). **(B)** Cuantificación del área ocupada por las células que migraron a través de la membrana porosa por campo fotografiado (10X). Se grafica el promedio del área ocupada por células por campo, con su respectiva desviación estándar, en función al control. (\*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney).



**Figura 33: Efecto de los compuestos sobre la migración celular mediante ensayo en cámara de migración en línea celular PC-3.** Las células PC-3 fueron tratadas con los compuestos, contadas y sembradas sobre la membrana porosa de la cámara de migración. **(A)** Imágenes representativas del efecto de diferentes compuestos a distintas concentraciones mediante el ensayo de la cámara de migración (Transwell). Los tratamientos corresponden a los siguientes: (1) control, (2) compuesto **1** (10 µM), (3) compuesto **2** (10 µM), (4) compuesto **3** (10 µM), (5) compuesto **3** (1 µM), (6) compuesto **4** (10 µM), (7) compuesto **4** (1 µM), (8) compuesto **5** (10 µM), (9) compuesto **6** (10 µM), (10) compuesto **7** (10 µM). **(B)** Cuantificación del área ocupada por las células que migraron a través de la membrana porosa por campo fotografiado (10X). Se grafica el promedio del área ocupada por células por campo, con su respectiva desviación estándar, en función al control. (\*:  $p < 0.05$  prueba Mann-Whitney).

## V. Discusión

Durante el curso de la oncogénesis y la progresión tumoral, las células cancerígenas presentan múltiples vías de señalización relacionadas con la proliferación y supervivencia celular desreguladas como una estrategia para superar la inestabilidad genómica, que además permite también adquirir resistencia fenotípica a los agentes quimioterapéuticos<sup>(67)</sup>.

El estudio de compuestos presentes en plantas ingeridas en la dieta ha sido de gran importancia para el desarrollo de fármacos y por lo tanto para la terapia contra el cáncer<sup>(68)</sup>. Entre la multiplicidad de compuestos naturales descritos en plantas se encuentran una serie de moléculas bioactivas con efecto antitumoral relacionadas con un compuesto denominado indol-3-carbinol (I3C). En un ambiente ácido y pH bajo, I3C puede condensarse en otros productos poliméricos como diindolilmetano (DIM). Indol-3-carbinol y DIM apuntan a múltiples vías de señalización para suprimir las principales características de las células cancerígenas. Se ha demostrado previamente que estos compuestos tienen efectos inhibidores sobre la viabilidad y la proliferación de varias líneas celulares de cáncer humano. Estos estudios demostraron que los compuestos indólicos ejercen sus efectos en las células cancerosas a través de la inducción de apoptosis<sup>(69)</sup>.

La actividad anticancerígena de los compuestos indólicos conlleva a la necesidad de sintetizar nuevos compuestos a partir de estas moléculas para mejorar sus actividades biológicas y reevaluar las propiedades sobre líneas celulares tumorales.

En este estudio se evaluó la actividad biológica de compuestos derivados de indol-3-carbinol en líneas celulares tumorales.

Los mecanismos de citotoxicidad empleados por I3C en células cancerígenas pueden estar relacionados a respuestas que afectan la proliferación celular y la muerte celular. Indol-3-carbinol ha demostrado la capacidad de suprimir la proliferación de células de cáncer de mama<sup>(49,46,47,48)</sup>, colon<sup>(52,50,51)</sup>, próstata<sup>(54,44)</sup> y endometrio<sup>(55)</sup>, sin embargo, el efecto inhibitor de I3C sobre la proliferación celular se produce solo a concentraciones altas (200-300  $\mu\text{M}$ )<sup>(70)</sup>.

Las pruebas realizadas indicaron que los 6 compuestos derivados de indol-3-carbinol poseen efecto citotóxico sobre las líneas de cáncer de mama, colon y próstata con valores de  $IC_{50}$  mucho menores a los indicados para I3C.

La línea celular HT-29 presentó mayor sensibilidad ante los compuestos **2**, **3** y **4**, con un  $IC_{50}$ = 8.65, 0.089 y 3.74  $\mu$ M, respectivamente; la línea MCF-7 presentó mayor sensibilidad ante los compuestos **2**, **4** y **6**, con un  $IC_{50}$ = 0.19, 0.33 y 0.48  $\mu$ M, respectivamente; la línea PC-3 resultó ser más sensible ante los compuestos **2**, **3** y **4**, con un  $IC_{50}$ = 1.47, 1.41 y 2.51  $\mu$ M, respectivamente, y la línea MDA-MB-231 ante los compuestos **2**, **3** y **4**,  $IC_{50}$ = 10.77, 6.35 y 10.68  $\mu$ M, respectivamente.

Los compuestos **1** y **7** presentaron valores de  $IC_{50}$  > 100  $\mu$ M en todas las líneas celulares. Estos datos indican que los compuestos derivados fueron claramente más activos que I3C, con lo cual se consiguió uno de los objetivos para esos nuevos compuestos sintetizados.

El desarrollo de I3C como agente terapéutico ha estado limitado por factores como su fácil conversión en muchos productos poliméricos *in vivo*<sup>(41)</sup>. Estos compuestos tienen algunos objetivos en común, pero se ha demostrado que tienen distintos efectos biológicos en las células de cáncer de mama<sup>(35,71)</sup> y que además las concentraciones necesarias para inhibir la expresión de CDK6 y para inducir la detención del ciclo celular son relativamente altas (50-200  $\mu$ M)<sup>(62,72)</sup>.

Como alternativa a I3C, como un agente quimioterapéutico para el cáncer de mama, se ha propuesto el derivado CTet, el cual ha demostrado ejercer actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7 ( $IC_{50}$  = 1.00 y 1.32  $\mu$ M, respectivamente)<sup>(73)</sup>.

En un estudio que combinaba I3C con genisteína (compuesto natural obtenido a partir de soja), la inhibición de Akt fue más eficaz, lo que resultó en un aumento de la inducción de la apoptosis en células HT-29<sup>(74)</sup>. Otro compuesto, 3-cloroacetilindol, reveló una gran capacidad de inhibición del crecimiento celular en la línea tumoral HCT-116 ( $IC_{50}$  < 4  $\mu$ M ) en comparación con I3C ( $IC_{50}$  > 200  $\mu$ M)<sup>(70)</sup>.

Fue descrito otro compuesto derivado de indol-3-carbinol con potente actividad anticancerígena, OSU-A9. Las investigaciones iniciales en el cáncer de próstata mostraron alto grado de similitud en el modo de acción entre I3C y OSU-A9; sin embargo, a concentraciones muy bajas<sup>(75)</sup>. Por ejemplo, la fosforilación de Akt fue suprimida por OSU-A9 a 2  $\mu$ M mientras que I3C lo hizo a una concentración de 200  $\mu$ M en células de cáncer de próstata, PC- 3.

Si bien se obtuvieron valores bajos de  $IC_{50}$  para ciertos compuestos, fue necesario calcular el índice de selectividad, para determinar si la acción citotóxica de los compuestos es selectiva para células tumorales, debido a que frente a un posible fármaco antitumoral, éste debe afectar lo menos posible a las células no tumorales.

El compuesto **2** resultó ser selectivo con un valor de  $IS > 1$  en las líneas celulares MCF-7 y PC-3; el compuesto **3** fue selectivo en las líneas celulares HT-29 y PC-3; los compuestos **4**, **5** y **6**, fueron selectivos en la línea celular MCF-7 y el compuesto **7** fue selectivo en la línea celular HT-29.

Tras establecer el efecto citotóxico de los distintos compuestos sobre las líneas celulares, se quiso determinar si el mecanismo por el cual los compuestos inducían la muerte celular era la apoptosis.

Los cambios morfológicos indicaban una reducción del número celular y una pérdida de la forma y la adhesión celular adquiriendo las células una forma redondeada. Por otro lado, se observaron cambios de la morfología nuclear como condensación de la cromatina y fragmentación de núcleos, que corresponderían a procesos de muerte celular por apoptosis<sup>(5)</sup>.

Para confirmar el indicio de apoptosis representado en los cambios morfológicos tras la exposición a los distintos compuestos, se realizó la evaluación del potencial de membrana mitocondrial, como una forma de saber si la mitocondria está implicada en la muerte celular y como uno de los fenómenos relacionado con la apoptosis<sup>(76)</sup>.

En los ensayos realizados se observó un efecto disipador del potencial de membrana mitocondrial significativo en la línea tumoral MDA-MB-231, con los compuestos **2** a 50  $\mu$ M, **3** a 50  $\mu$ M y **4** a 25  $\mu$ M. La línea no tumoral CoN mostró una pérdida significativa de potencial de membrana mitocondrial con los compuestos **3** a 50  $\mu$ M, **4** a 50  $\mu$ M y **4** a 25  $\mu$ M.

Se ha reportado que I3C induce la pérdida de potencial mitocondrial a una concentración de 60 y 100  $\mu$ M en células de cáncer de mama, CA1a, pero no induce la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ni la liberación de citocromo c en las células no tumorales MCF10A, a pesar de que Bax se transloca desde el citosol a la mitocondria tras el tratamiento con I3C, se indica que la pérdida del potencial mitocondrial inducida por I3C es un evento directo para la liberación del citocromo c y la inducción de apoptosis en células cancerosas<sup>(59)</sup>. Por otra parte, el derivado de I3C, OSU-A9, ha mostrado una potencia alrededor de 100 veces mayor en comparación a indol-3-carbinol, en la inducción de la liberación del citocromo c en células de cáncer

oral, SCC2095. La capacidad de disipar el potencial de membrana mitocondrial se demostró de una manera dependiente de la dosis (1, 2 y 3  $\mu\text{M}$ ), en donde se mostró un aumento de 4,6%, 22,2% y 42,3% de células con pérdida de potencial mitocondrial en comparación al control<sup>(77)</sup>.

Los datos sobre el mecanismo de inducción de apoptosis por I3C son contradictorios. La apoptosis inducida por I3C estaba relacionada con el aumento de receptores de muerte, DR4 y DR5, en células de cáncer de próstata, LNCaP, lo cual apunta a una vía extrínseca<sup>(78)</sup>. Por el contrario, la regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas como Bax y la regulación negativa de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL coinciden con el inicio de la apoptosis en células de cáncer de próstata PC3 y de cáncer de mama MDA-MB-435<sup>(79,43,53)</sup>. Estos datos implican la participación de la vía intrínseca de apoptosis<sup>(60)</sup>. Nuestros datos están acorde con esta última opción dado que parte de los compuestos inducen la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial.

La mayoría de estímulos que conducen a la apoptosis convergen en la mitocondria y provocan una permeabilización de su membrana externa, lo que genera la liberación de una serie de proteínas que activan las caspasas, quienes son consideradas como responsables finales de la muerte celular<sup>(80)</sup>.

Nuestros datos indican la activación de caspasas en la línea tumoral MDA-MB-231 en conjunto con la pérdida de potencial de membrana mitocondrial.

Estudios indican que el tratamiento con I3C a una concentración mayor a 100  $\mu\text{M}$  incrementa la activación de caspasas 3/7 en líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-231<sup>(60)</sup>.

En células de cáncer de colon, DIM ha mostrado la activación de caspasas 3, 7, 8 y 9, el incremento de la translocación de citocromo c, mientras reduce las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2<sup>(81)</sup>.

Estudios indican que se produce un aumento significativo en la actividad de la caspasa 9 en la línea celular de cáncer de próstata tras el tratamiento con DIM a 75  $\mu\text{M}$ , cuya actividad superó al control en 9 veces, tras 48 horas de exposición a DIM<sup>(69)</sup>. Además se ha reportado que los efectos de indol-3-carbinol y OSU-A9 sobre la activación de la caspasa 3 poseen un comportamiento similar, aunque OSU-A9 supera 100 veces la potencia de I3C<sup>(75)</sup>.

En la carcinogénesis, el fenómeno de migración celular surge como un mecanismo complejo que logra que las células tumorales migren desde su sitio primario, hacia otros sitios que no necesariamente están conectados por contigüidad<sup>(82)</sup>.

La migración no se vio reducida de forma significativa tras la exposición a los derivados de I3C mediante el ensayo de la herida, mientras que en el ensayo con la cámara de migración se redujo la migración celular de manera significativa con los derivados **3** a 1  $\mu\text{M}$ , **4** y **6** a 10  $\mu\text{M}$  en la línea tumoral HT-29, y en la línea PC-3 los compuestos **5** y **6** a 10  $\mu\text{M}$ . Indol-3-carbinol no mostró efecto sobre la migración celular a 10  $\mu\text{M}$ .

Estudios reportan que I3C reduce la migración celular a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en la línea de cáncer de próstata DU145<sup>(64)</sup>, esta concentración resulta ser superior a las ensayadas y que mostraron efecto sobre la migración celular en nuestro caso.

DIM mostró efecto sobre la migración celular en células de cáncer de colon, a concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$ , a través de la supresión de las vías de ERK y AKT<sup>(83)</sup>.

En resumen, los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** redujeron la viabilidad celular en todas las líneas celulares estudiadas, afectando la permeabilidad de membrana mitocondrial y la activación de caspasas en las líneas celulares PC-3 y MDA-MB-231. Por otra parte, los compuestos **3**, **4** y **6** inhibieron la migración celular en la línea celular tumoral HT-29 y los compuestos **5** y **6** en la línea celular tumoral PC-3.

## **VI. Conclusión**

Los derivados de indol-3-carbinol evaluados en este estudio reducen la viabilidad celular en las líneas tumorales estudiadas.

Los carbinoles derivados de I3C presentaron mayor efecto citotóxico en comparación a los carboxaldehídos, lo cual estaría relacionado al grupo funcional -OH.

Los derivados **2**, **3** y **4** provocaron disminución estadísticamente significativa del potencial de membrana mitocondrial en la línea celular tumoral MDA-MB-231.

Los derivados **3**, **4** y **6** disminuyeron de forma estadísticamente significativa la migración celular en la línea celular tumoral HT-29, mientras que en la línea celular tumoral PC-3 este efecto lo tuvieron los compuestos **5** y **6**.

## **VII. Proyecciones**

Este estudio aporta información para la realización de futuras evaluaciones con las que complementar las actividades biológicas obtenidas en esta tesis.

La modificación de compuestos presentes en productos naturales ingeridos en la dieta podría llevar a la obtención nuevos fármacos con efectos anticancerígenos, como se demuestra con las modificaciones realizadas desde el indol-3-carbinol en este trabajo.

## VIII. Bibliografía

1. IARC. Latest world cancer statistics *PRESS RELEASE N° 223* 2013:<http://www.iarc.fr/>.
2. OMS. Cáncer. *Nota descriptiva N°297* 2015:<http://www.who.int/>.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
4. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular cancer research : MCR* 2008;6(10):1521-33.
5. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972;26(4):239-57.
6. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature reviews. Cancer* 2009;9(7):501-07.
7. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology* 2003;15(6):740-6.
8. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 1980;68:251-306.
9. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73(8):2013-26.
10. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 2004;19:124-8.
11. Bauer JH, Helfand SL. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging cell* 2006;5(5):437-40.
12. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, et al. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(1):246-51.
13. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(19):7555-9.

14. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2002;4(2):70-6.
15. Jensen M, Engert A, Weissinger F, Knauf W, Kimby E, Poynton C, et al. Phase I study of a novel pro-apoptotic drug R-etodolac in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Investigational new drugs* 2008;26(2):139-49.
16. Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Spandidos DA, Salcedo M, Bonavida B. The anti-CD20 mAb LFB-R603 interrupts the dysregulated NF-kappaB/Snail/RKIP/PTEN resistance loop in B-NHL cells: role in sensitization to TRAIL apoptosis. *International journal of oncology* 2011;38(6):1683-94.
17. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011;30(1):1-14.
18. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science (New York, N.Y.)* 1997;275(5303):1129-32.
19. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102(1):33-42.
20. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
21. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397(6718):441-6.
22. Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 1999;32(9):1053-61.
23. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in cell biology* 1998;8(7):267-71.
24. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2008;18(6):572-85.
25. Vaux DL, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;304(3):499-504.
26. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae* 2000;74(2-3):281-6.
27. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death. *Cell*;116(2):205-19.

28. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Seminars in hematology* 1997;34(4 Suppl 5):9-19.
29. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1010:186-94.
30. Fulda S. Evasion of Apoptosis as a Cellular Stress Response in Cancer. *International Journal of Cell Biology* 2010.
31. von der Mark K, Schober S, Goodman SL. Integrins in cell migration. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1999;129:219-30.
32. Cho SY, Klemke RL. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *The Journal of cell biology* 2000;149(1):223-36.
33. Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 2010;46(1):66-80.
34. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology* 2015.
35. Safe S, Papineni S, Chintharlapalli S. Cancer chemotherapy with indole-3-carbinol, bis(3'-indolyl)methane and synthetic analogs. *Cancer letters* 2008;269(2):326-38.
36. Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological research* 2007;55(3):224-36.
37. Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(1):61-8.
38. Minich DM, Bland JS. A review of the clinical efficacy and safety of cruciferous vegetable phytochemicals. *Nutrition reviews* 2007;65(6 Pt 1):259-67.
39. Verhoeven DT, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA. Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 1996;5(9):733-48.
40. Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2005;4(9):1201-15.
41. Grose KR, Bjeldanes LF. Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chemical research in toxicology* 1992;5(2):188-93.

42. Brew CT, Aronchik I, Hsu JC, Sheen JH, Dickson RB, Bjeldanes LF, et al. Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2006;118(4):857-68.
43. Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001;20(23):2927-36.
44. Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Haj A, Fares FA. Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2003;41(6):745-52.
45. Meng Q, Qi M, Chen DZ, Yuan R, Goldberg ID, Rosen EM, et al. Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2000;78(3):155-65.
46. Rahman KM, Aranha O, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutrition and cancer* 2003;45(1):101-12.
47. Hong C, Firestone GL, Bjeldanes LF. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochemical pharmacology* 2002;63(6):1085-97.
48. Howells LM, Gallacher-Horley B, Houghton CE, Manson MM, Hudson EA. Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line. *Molecular cancer therapeutics* 2002;1(13):1161-72.
49. Katdare M, Osborne MP, Telang NT. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncology reports* 1998;5(2):311-5.
50. Frydoonfar HR, McGrath DR, Spigelman AD. Inhibition of proliferation of a colon cancer cell line by indole-3-carbinol. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2002;4(3):205-07.
51. Hudson EA, Howells LM, Gallacher-Horley B, Fox LH, Gescher A, Manson MM. Growth-inhibitory effects of the chemopreventive agent indole-3-carbinol are

- increased in combination with the polyamine putrescine in the SW480 colon tumour cell line. *BMC cancer* 2003;3:2.
52. Zheng Q, Hirose Y, Yoshimi N, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, et al. Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2002;128(10):539-46.
  53. Chinni SR, Sarkar FH. Akt inactivation is a key event in indole-3-carbinol-induced apoptosis in PC-3 cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002;8(4):1228-36.
  54. Frydoonfar HR, McGrath DR, Spigelman AD. The effect of indole-3-carbinol and sulforaphane on a prostate cancer cell line. *ANZ journal of surgery* 2003;73(3):154-6.
  55. Leong H, Firestone GL, Bjeldanes LF. Cytostatic effects of 3,3'-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor-alpha expression. *Carcinogenesis* 2001;22(11):1809-17.
  56. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology* 2006;71(10):1397-421.
  57. Kim YS, Milner JA. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *The Journal of nutritional biochemistry* 2005;16(2):65-73.
  58. Rogan EG. The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *In vivo (Athens, Greece)* 2006;20(2):221-8.
  59. Sarkar FH, Rahman KM, Li Y. Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. *The Journal of nutrition* 2003;133(7 Suppl):2434S-39S.
  60. Moiseeva EP, Fox LH, Howells LM, Temple LA, Manson MM. Indole-3-carbinol-induced death in cancer cells involves EGFR downregulation and is exacerbated in a 3D environment. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2006;11(5):799-812.
  61. Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, Hong C, Riby JE, Bjeldanes LF, et al. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer research* 1999;59(6):1244-51.
  62. Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, et al. Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(7):3838-47.

63. Cram EJ, Liu BD, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression in human MCF-7 breast cancer cells by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the CDK6 gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(25):22332-40.
64. Jeong YM, Li H, Kim SY, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, et al. Indole-3-carbinol inhibits prostate cancer cell migration via degradation of beta-catenin. *Oncology research* 2011;19(5):237-43.
65. Sundberg RJ, Katritzky AR, Meth-Cohn O, Rees CS. *Indoles*: Elsevier Science, 1996.
66. Gribble GW. Recent developments in indole ring synthesis-methodology and applications. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2000(7):1045-75.
67. Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen CS. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett* 2008;262(2):153-63.
68. Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK, et al. Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. *Current drug metabolism* 2008;9(7):581-91.
69. Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Fares FA. Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3'-diindolylmethane through the mitochondrial pathway. *British journal of cancer* 2004;91(7):1358-63.
70. Kim DJ, Reddy K, Kim MO, Li Y, Nadas J, Cho YY, et al. (3-Chloroacetyl)-indole, a novel allosteric AKT inhibitor, suppresses colon cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 2011;4(11):1842-51.
71. Firestone GL, Bjeldanes LF. Indole-3-carbinol and 3-3'-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter-Sp1 transcription factor interactions. *The Journal of nutrition* 2003;133(7 Suppl):2448S-55S.
72. Jump SM, Kung J, Staub R, Kinseth MA, Cram EJ, Yudina LN, et al. N-Alkoxy derivatization of indole-3-carbinol increases the efficacy of the G1 cell cycle arrest and of I3C-specific regulation of cell cycle gene transcription and activity in human breast cancer cells. *Biochemical pharmacology* 2008;75(3):713-24.
73. De Santi M, Galluzzi L, Lucarini S, Paoletti MF, Fraternali A, Duranti A, et al. The indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet inhibits cell proliferation via overexpression of p21/CDKN1A in both estrogen receptor-positive and triple-negative breast cancer cell lines. *Breast cancer research : BCR* 2011;13(2):R33.

74. Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Molecular cancer* 2009;8:100.
75. Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Wang D, Lin CH, Yang HC, et al. A potent indole-3-carbinol derived antitumor agent with pleiotropic effects on multiple signaling pathways in prostate cancer cells. *Cancer research* 2007;67(16):7815-24.
76. Lugli E, Troiano L, Ferraresi R, Roat E, Prada N, Nasi M, et al. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2005;68(1):28-35.
77. Weng JR, Bai LY, Omar HA, Sargeant AM, Yeh CT, Chen YY, et al. A novel indole-3-carbinol derivative inhibits the growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro. *Oral oncology* 2010;46(10):748-54.
78. Jeon KI, Rih JK, Kim HJ, Lee YJ, Cho CH, Goldberg ID, et al. Pretreatment of indole-3-carbinol augments TRAIL-induced apoptosis in a prostate cancer cell line, LNCaP. *FEBS letters* 2003;544(1-3):246-51.
79. Rahman KM, Aranha O, Glazyrin A, Chinni SR, Sarkar FH. Translocation of Bax to mitochondria induces apoptotic cell death in indole-3-carbinol (I3C) treated breast cancer cells. *Oncogene* 2000;19(50):5764-71.
80. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 1998;281(5381):1309-12.
81. Kim EJ, Park SY, Shin HK, Kwon DY, Surh YJ, Park JH. Activation of caspase-8 contributes to 3,3'-Diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells. *The Journal of nutrition* 2007;137(1):31-6.
82. Miguel Angel Mayoral Chávez EZG, Blanca Espinosa Mancilla SMC, Jorge Guevara Fonseca. ENFOQUES MOLECULARES DE LA METÁSTASIS TUMORAL. *Revista de Educación Bioquímica* 2004;23((3)):117-22.
83. Rajoria S, Suriano R, Wilson YL, Schantz SP, Moscatello A, Geliebter J, et al. 3,3'-diindolylmethane inhibits migration and invasion of human cancer cells through combined suppression of ERK and AKT pathways. *Oncology reports* 2011;25(2):491-7.