

**EVALUACIÓN DE LA INDUCCION DE APOPTOSIS DE TRES HIDROXY-
CHALCONAS CON POTENCIAL CITOTOXICO SOBRE CELULAS DE CANCER
DE PULMON**



Sebastián Alexander Pinilla Rodríguez

**Universidad Militar Nueva Granada
Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Biología Aplicada
Bogotá D.C. 2023**

**EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS DE TRES HIDROXY-
CHALCONAS CON POTENCIAL CITOTÓXICO SOBRE CELULAS DE CÁNCER
DE PULMÓN**



AUTOR

Sebastián Alexander Pinilla Rodríguez

Trabajo de grado presentado para optar por el título de:

BIÓLOGO APLICADO

Directora:

Gina Marcela Méndez Callejáz M.Sc. PhD.

Codirectora:

Biviana Barrera Bailón. PhD.

**Universidad Militar Nueva Granada
Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Biología Aplicada
Bogotá D.C. 2023**

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1: REVISION BIBLIOGRAFICA	6
1. CÁNCER Y SUS CARACTERÍSTICAS CELULARES	6
1.2. Aspectos moleculares sobre cáncer	6
1.3. Apoptosis	8
1.3.1. Vía extrínseca apoptosis	8
1.3.2. Vía intrínseca apoptosis o mitocondrial	9
1.4. Cáncer de pulmón:	10
1.4.1. Aspectos moleculares cáncer de pulmón	11
2. LINEAS CELULARES	12
2.1. Líneas celulares para estudios de Cáncer	12
2.2. Líneas celulares de cáncer de pulmón	13
3. PERSPECTIVA TERAPEUTICA Y TRATAMIENTOS DEL CANCER DE PULMON.....	13
3.1. Tratamiento quirúrgico	13
3.2. Quimioterapia	14
3.3. Radioterapia	15
3.4. Inmunoterapia.....	15
3.5. Nanotecnología.....	15
4. FITOQUÍMICOS.....	16
4.1 Farmacognosia	16
4.2. Actividad biológica fitoquímicos	17
4.3. Chalconas y actividad biológica:.....	18
4.4. Farmacología Chalconas	18
4.5. Uso de diferentes Chalconas con actividades anticancerígenas.....	18
CAPITULO 2: ESCRITO TRABAJO DE GRADO	20
RESUMEN	20
1. INTRODUCCIÓN	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
MATERIALES Y METODOS.....	24
4.1. Obtención de chalconas	24
4.2. Cultivos celulares:.....	24
4.3. Determinación de la viabilidad celular MTT	25

4.4. Apoptosis por citometría de flujo kit Casp3/7-AAD	25
4.5. Detección de cambios en la morfología celular asociados a la inducción de apoptosis	25
4.6. Extracción de ARN	25
4.7. RT-qPCR	26
4.8. Análisis estadístico.	28
CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION	29
1. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
1.1. Citotoxicidad e índice de selectividad de los compuesto CS1, CS4 y CS12	29
1.2. Análisis morfológico por inflorescencia de la línea celular A549	31
1.3. Citometría de flujo marcadas con Casp-3/7 + 7-AAD	35
1.4. Análisis de expresión genética	38
1.4.1. Análisis de expresión TP53	39
1.4.2. Análisis expresión BAX.....	40
1.4.3. Análisis expresión BIM.....	41
1.4.4. Análisis de expresión CAS 3.....	42
3. CONCLUSIONES	43
4. RECOMENDACIONES	43
6. ANEXOS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de inflorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CN (Taxol).....	32
Figura 2. Micrografía de inmunofluorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CS1 a la concentración encontrada con el IC5 y así mismo su control negativo (CN). Se señala con flechas rojas los aparentes síntomas de apoptosis.....	33
Figura 3. Micrografía de inmunofluorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CS4 a la concentración encontrada con el IC50, así mismo su control negativo (CN). Se señala con flechas rojas los aparentes síntomas de apoptosis.....	33
Figura 4. Micrografía de inmunofluorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CS12 a la concentración encontrada con el IC50, así mismo su control negativo (CN).....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Chalconas aisladas por el grupo de investigación InQuiBio de la UMNG. .	24
Tabla 2. Primers diseñados por el grupo de investigaciones GIBGA para el estudio de genes proapoptóticos.....	27
Tabla 3. Protocolo de amplificación utilizado en la qPCR.....	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de viabilidad celular Células MR5 después de la exposición de los 3 compuestos.	55
Anexo 2. Porcentajes de viabilidad celular Células A549 después de la exposición de los 3 compuestos.	55
Anexo 3. Datos de qPCR para los cálculos del Fold change.	57

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de corazón a mis padres Carlos Alberto Pinilla Ochoa y Carolina Rodríguez Camacho, por darme el gran privilegio de estudiar, por apoyarme durante todos estos años de carrera, permitiendo que mi única responsabilidad fuese el estudio y que con gran esfuerzo permitieron que culminara esta carrera.

A las docentes la Dra. Gina Méndez Callejaz y la Dra. Biviana Barrera Bailón, que fueron indispensables para el desarrollo de este trabajo de grado, acompañándome con sus conocimientos, experiencia profesional y hasta personal, enseñándome que un proyecto requiere mucho más que solo conocimientos científicos, si no que requiere total compromiso y dedicación.

A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales que permitió el desarrollo de este proyecto en sus instalaciones, permitiendo que este proyecto saliese adelante durante estos años.

A la Universidad Militar Nueva Granada y sus docentes, que me mostraron el mundo de las ciencias biológicas como algo bello que vale la pena explorar, dándome retos en diferentes materias que me demostraban que en la vida las cosas solo se consiguen con esfuerzo y perseverancia.

A mi amigo y compañero de carrera William Andres Gomez Corredor, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera y trabajo de grado, permitiendo que nunca me rinda, aunque las cosas fueran difíciles, enseñándome el valor del orden y de la lectura.

A mis amigas y compañeras de carrera María Catalina Pinzón Barrera, Paula Alejandra Roza y Tania Alexandra Latorre Páez, que sin duda fueron pieza clave para mi formación como científico, mostrándome que la disciplina y el estudio abren la mente, y que no solo basta con ser inteligente para lograr las cosas.

Por último, agradezco a todos mis compañeros de carrera y de vida que me acompañaron durante la carrera, que, aunque sus nombres no están plasmados acá, sin duda me llevo algo de cada uno y que mi formación como biólogo es completa hoy en día gracias a todas las experiencias que todos me brindaron.

Agradecimientos profundos.

CAPITULO 1: REVISION BIBLIOGRAFICA

1. CÁNCER Y SUS CARACTERÍSTICAS CELULARES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer representa la primera causa de muerte en el mundo con casi 10 millones de defunciones en 2020, en su mayoría cáncer de pulmón, recto, mama, colon y próstata (Ferlay *et al.*, 2020). El cáncer es el termino genérico atribuido a un conjunto de enfermedades de carácter genético asociado a la proliferación celular sin control, debido a la modificación en la tasa de expresión de genes que regulan el ciclo celular, consecuencia de mutaciones en secuencias de protooncogenes, genes supresores de tumores y reguladores de la expresión (Pecorino, 2021).

Las modificaciones de los genes asociados a la enfermedad pueden ser causados por agentes cancerígenos, tanto físicos, químicos o biológicos (Carretero, 2005). Las modificaciones en la secuencia de nucleótidos se traducen en la multiplicación rápida y anormal de células del tejido asociado, provocando que sobrepase límites habituales de número y tamaño. Además, evade distintos sistemas de control celular, lo que permite que se propague a otros órganos, a través del tejido sanguíneo y linfático proceso conocido como metástasis (Geiger y Peeper, 2009).

En la mayoría de los casos, se debe a variantes alélicas de protooncogenes, genes de reparación del ADN y supresores tumorales con predisposición a mutar. Se han descrito marcadores, que son característicos para un solo tipo de cáncer o mutaciones puntuales en genes reguladores asociados a diferentes tipos de cáncer (Hernández y Hernandez-Mendez, 2001). El cáncer también se puede asociar a cambios en tejidos, por ejemplo, la hiperplasia se define como el aumento de células de un tejido formando un cumulo de células, en un caso más avanzado se produce displasia, ya que cambia la estructura del tejido (Vesely *et al.*, 2011). Y, por último, el carcinoma se conoce como cáncer en estadio 0, donde las células anormales crecen en el tejido, pero sin avanzar a otros tejidos (Hassanpour y Dehghani, 2017).

Las acumulación de mutaciones traen como consecuencia la modificación del ciclo celular, se presentan características propias de células cancerosas descritas por Sánchez en 2013. Entre estas características se encuentra el origen clonal, la inmortalidad celular, la inestabilidad genética, metástasis, pérdida de la inhibición lateral, la evasión inmunológica (Hanahan y Weinberg ,2011; Vesely *et al.*, 2011; Eljaszewicz *et al.*, 2013). Siendo estas características, las que determinan el estadio del cáncer y sus posibles tratamientos.

1.2. Aspectos moleculares sobre cáncer

Los diferentes tipos de cáncer se producen por modificaciones en los genes que participan la división y muerte celular programada. Estas mutaciones pueden ser

heredadas, como las variantes alélicas con predisposición a mutar o adquiridas a lo largo de la vida, y pueden ser desencadenadas por factores ambientales, como la exposición a agentes cancerígenos que dañan el material genético (Carretero, 2005). Las mutaciones en los genes implicados en el cáncer pueden llevar a la producción de proteínas anormales que promueven la proliferación celular, inhiben la muerte celular programada, o activan vías de señalización que fomentan el crecimiento tumoral. Además, las células cancerosas a menudo desarrollan la capacidad de evadir la respuesta inmunitaria del cuerpo y de invadir otros tejidos (Pecorino, 2021).

En términos generales, la enfermedad ocurre por una serie de eventos sobre una célula normal adquiere una mutación o alteración en su material genético (ADN) que provoca que la célula empiece a dividirse y crecer de forma anormal. Seguido de la proliferación, donde las células anormales se dividen y crecen sin control, formando una masa de células anormales que se conoce como tumor (Hassanpour y Dehghani, 2017). Las células del tumor pueden diseminarse a otras partes del cuerpo a través de la invasión de tejidos y vasos sanguíneos, lo que se conoce como metástasis. Para crecer y diseminarse, el tumor necesita desarrollar un suministro de sangre a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos, conocido como angiogénesis. La metástasis y angiogénesis varían según el tipo y la etapa del cáncer, por lo que es fundamental un diagnóstico y tratamiento tempranos para mejorar las posibilidades de curación y supervivencia. (Williams y Stoeber, 2012).

Existen varios genes que relacionan la carcinogénesis y la formación de tumores, por ejemplo, el supresor tumoral gen TP53 que da origen a una proteína denominada p53 la cual se activa al comenzar la división celular para monitorear los acontecimientos genéticos que regulan la proliferación celular. Si el gen TP53 sufre una mutación no permite que la célula sea eliminada por apoptosis cuando hay una desregulación asociada al incremento de la expresión de protooncogenes y/o fallo de proteínas supresoras de tumores (Olivier *et al.*, 2012). Por consiguiente, facilita la acumulación de mutaciones y la desestabilización del ADN al no generar muerte celular, sino la continuación de las divisiones celulares sin este control regulatorio, dando lugar a la producción de células tumorales. La mutación de este gen es la responsable de al menos el 50% del desarrollo de tumores en los distintos tipos de cáncer; el porcentaje restante está relacionado con otros tipos de mutaciones que generalmente se asocian a genes involucrados en el ciclo celular y su regulación (Levine, 2019).

La epigenética juega un rol importante en la carcinogénesis, alteraciones complejas como la hipometilación, hipermetilación, aumento en el promotor de las islas CpG, cambios en el nucleosoma, entre otras (Sharma *et al.*, 2010). Por ejemplo, en el caso de la hipermetilación de genes que controlan el ciclo celular, comúnmente los genes *RB*, *BRCA1/2* y *PTEN*, son silenciados y como consecuencia ocurre el proceso de tumorigénesis (Hatzia Apostolou y Iliopoulos, 2011). Se destaca el papel de los miARNs, son un tipo de ARN monocatenario que participa en el proceso de regulación de la expresión de los ARNm. En los últimos años se han descrito miARNs que están

relacionados con el desarrollo de cáncer, se conocen como miARNs oncogénicos (Fabbri y Calin 2010, Ryan *et al.*, 2010). Las mutaciones en los miARNs alteran la complementariedad que tienen con la secuencia de ARNm, activando oncogenes o la supresión tumoral (Kasinski y Slack 2011, You y Jones 2012).

1.3. Apoptosis

La muerte celular programada es un proceso celular altamente regulado que es esencial para la homeostasis y desarrollo normal de tejidos (Obeng, 2020). Este proceso tiene unas características morfológicas particulares, como la contracción celular, la condensación celular y nuclear, la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos (Yu y Cho, 2001). El proceso no ocurre de manera aleatoria, por el contrario, está regulado por una secuencia programada de eventos moleculares dependientes de energía, que permite a los organismos multicelulares el mantenimiento de las células (Pinon *et al.*, 2008), sin embargo, la desregulación de las vías apoptóticas puede contribuir al desarrollo del cáncer y la resistencia a la terapia en contra de esta enfermedad (D'Arcy, 2019).

Es así como la apoptosis ha mostrado tener una fuerte influencia en las últimas décadas en investigaciones sobre el desarrollo de tratamientos de cáncer, debido a la comprensión de este mecanismo que ha demostrado un efecto importante en el fenotipo maligno (Lowe y Lin, 2000). Aunque se conocen varios mecanismos claves dentro de la apoptosis, todos los mecanismos moleculares que están detrás de este proceso no se han dilucidado por completo, aunque se sabe que intervienen ciertas proteínas aún no se conoce bien cómo esto podría contribuir a la aplicación en distintos tratamientos (Kaczanowski, 2016).

En las células humanas se describen 2 vías apoptóticas que están regidas por unos mecanismos moleculares muy específicos. La vía extrínseca en donde se da la unión de unos ligandos específicos de muerte celular a unos receptores de la célula. Y, la vía intrínseca o mitocondrial que se desencadena por la citotoxicidad (D'Arcy, 2019). Estas dos vías principales de la apoptosis convergen en la vía de terminación o en la vía de ejecución, iniciando en la incisión de las caspasas-3. Dando como resultado la fragmentación del ADN, la degradación de proteínas citoesqueléticas y nucleares, la reticulación de proteínas, la formación de cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para los receptores de células fagocíticas y por último la captación de células fagocíticas (Xu y hua, 2019).

1.3.1. Vía extrínseca apoptosis

La vía extrínseca de la apoptosis es también conocida como la vía de receptor de la muerte, es un mecanismo bastante importante para los estudios relacionados con cáncer y sus tratamientos, en los cuales se han buscado diferentes dianas moleculares que puedan activar este mecanismo. Debido a que es mediada por

receptores transmembranales de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), en el que se encuentra el TNF α (Factor de necrosis tumoral α), Fas (CD95 / APO-1) y TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF), los cuales están ligados a los niveles de expresión de los ligandos desencadenantes (Xu y hua, 2019). Los miembros de la familia TNF comparten dominios extracelulares que son ricos en cisteína, además tienen un dominio citoplasmático con cerca de 80 aminoácidos que es denominado “dominio de la muerte”. Este dominio es muy importante en la transmisión de las señales de muerte dentro de la célula. Las señales apoptóticas son transmitidas desde la superficie de la célula, hasta las vías de señalización intracelular donde se encuentran los dominios de muerte citoplasmáticos correspondientes (Erekat, 2022).

Los receptores de muerte son producidos por Macrófagos o células Natural Killer (NK), que posteriormente se unen a los receptores de muerte que se encuentran en la membrana de la célula diana, e inducen la vía extrínseca con la activación de ProCaspasa-8 a Caspasa-8 (Obeng, 2020). Tras la unión de los ligandos a los receptores de muerte en la célula, se reclutan proteínas adaptadoras citoplasmáticas que muestran los dominios efectores de muerte, de forma que interactúen con la procaspasa-8 (D’Arcy, 2019). Lo que posteriormente genera un complejo de señalización que induce la muerte celular, provocando la autocatálisis de la procaspasa-8 (Xu y hua, 2019; Erekat, 2022).

1.3.2. Vía intrínseca apoptosis o mitocondrial

La vía intrínseca de la apoptosis, también conocida como apoptosis mitocondrial, a diferencia de la vía extrínseca no está mediada por receptores, si no por una variedad de estímulos, lo que ha generado interés para diferentes tratamientos de cáncer, debido a que es una de las vías que se ven alteradas con el cáncer, por lo que se han propuesto nuevos fármacos que puedan generar estímulos que promuevan esta vía apoptótica (Igney y Kramer, 2002). Estos estímulos generan señales intracelulares, generando cambios bioquímicos intracelularmente, iniciando la apoptosis en la mitocondria (Westaby *et al.*, 2021). Los estímulos pueden actuar de manera positiva o negativa. Los estímulos positivos incluyen, entre otros, radiación, toxinas, hipoxia, hipotermia, infecciones virales y radicales libres. Por otro lado, los estímulos negativos incluyen la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citocinas (Fulda y Debatin, 2006).

Como hay un estímulo, ocurre la interrupción de la membrana mitocondrial interna, lo que hace que se disipe el potencial de membrana haciéndola más permeable, lo que genera la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), resultando en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la liberación de dos tipos de proteínas pro apoptóticas, normalmente secuestradas en el espacio intermembranoso hacia el citosol (Westaby *et al.*, 2021).

El primer grupo de proteínas está conformado por el citocromo c, Smac/DIABLO y la serina proteasa HtrA2/Omi, las cuales activan la vía mitocondrial que es dependiente de las caspasas (Chai *et al.*, 2000). El citocromo C activa Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1) al unirse a esta, esta tiene un dominio de unión a caspasas (CARD), el cual se libera una vez se forma el complejo c/Apaf-1, de esta manera se recluta la caspasa iniciadora, procaspasa 9 dependiente de dATP. Esto resulta en la formación de un apoptosoma heptamérico (Shakeri *et al.*, 2017). Después de la formación de este apoptosoma, la procaspasa 9 se activa, provocando así mismo la activación de la Caspasa-9 y subsiguiente a esto su disociación en el apoptosoma. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi fomentan la apoptosis mediante la inhibición de IAP (Proteínas inhibidoras de apoptosis) (Chai *et al.*, 2000).

El segundo grupo de proteínas está formado por proteína factor inductor de apoptosis (AIF), Endonucleasa G y CAD, que durante la apoptosis son liberadas de la mitocondria, siendo un evento tardío que ocurre cuando la apoptosis ya ha dado inicio por la célula (Doti *et al.*, 2014). Las AIF, se encuentran en la membrana interna de la mitocondria, estas son translocadas al núcleo, lo que provoca la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina nuclear periférica conocida como condensación de etapa I (Fulda y Debian, 2006). La endonucleasa G, se traslada al núcleo donde escinde la cromatina nuclear para producir fragmentos de ADN oligonucleosomal. Las AIF y la endonucleasa G son independientes de las caspasas (Fulda y Debian, 2006). Después de esto CAD es soltada de la mitocondria y es movilizada al núcleo, donde una vez dada la escisión por la caspasa 3, conduce a la fragmentación del ADN oligonucleosomal y una condensación de la cromatina mucho más avanzada conocida como la condensación de etapa II (Jan, 2019).

1.4. Cáncer de pulmón:

El cáncer de pulmón (CP) es uno de los tantos tipos que se origina en los tejidos de los órganos respiratorios (Organización mundial de la salud OMS, 2018). Es importante destacar que no existe un solo tipo de cáncer de pulmón debido a que los pulmones no son una masa uniforme de células, dividiéndose en dos grandes grupos: carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP) y carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPNPC), clasificados por la Asociación Internacional De Estudios De Cáncer De Pulmón (IASLC), la Sociedad Americana Torácica (ATS) y la Sociedad Europea De Respiración (ERS) (Yanagawa *et al.*, 2014).

El CPNPC representa el 65% de los cánceres de pulmón y en el 70% de los casos se encuentra en estado avanzado, además de eso se divide 3 tipos de carcinomas el adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o epidermoide y carcinoma de células grandes (Travis, 2011, Barrios *et al.*, 2014, Pérez *et al.*, 2017). En cuanto al CPCP es un tipo de cáncer con una alta incidencia de metástasis y un alto grado de malignidad, lo que causa que casi el 95% de los casos mueran producto de la

enfermedad, en adición a eso tiene solo un tipo de carcinoma clasificable conocido como carcinoma microcítico (Barrios *et al.*, 2014, Martínez *et al.*, 2016).

El cáncer de pulmón se asocia a diferentes carcinógenos, pero el más común de ellos es el cigarrillo que aumenta las posibilidades de tener este tipo de cáncer en un 17,2% para hombres y 11,6% para mujeres. El humo de cigarrillo tiene 70 tipos de compuestos distintos que pueden ser considerados como carcinógenos entre los que se encuentran nitrosaminas, los benzopirenos y los radioisótopos (Ferrero *et al.*, 2003). De igual manera, encontramos otros agentes que contribuyen a la carcinogénesis, como lo es el humo de leña o los excrementos de animales donde se ha demostrado que las partículas nocivas de carácter orgánico o inorgánico tienen efectos sobre la expresión de los genes *TP53* y *MDM2* (Bach *et al.*, 2007). Además de los carcinógenos ya mencionados, la aparición del cáncer de pulmón también se debe a predisposiciones genéticas, en vista de que se ha evidenciado en pacientes que algunas enzimas que regulan la carcinogénesis poseen alteraciones genéticas que aumentan la predisposición a padecer cáncer de pulmón (Viñolas, 2007).

1.4.1. Aspectos moleculares cáncer de pulmón

En general cada tipo de cáncer posee marcadores moleculares que permiten caracterizar la enfermedad desde otra perspectiva, en el caso del cáncer de pulmón existe una gran variedad de marcadores distintos, pero existe una gran parte de genes susceptibles que se asocia directamente a los carcinógenos que pueden causar la enfermedad (Wadowska *et al.*, 2020). De igual forma esta información no solo sirve para caracterizar el cáncer, sino también para encontrar agentes quimiopreventivos y entender el funcionamiento de la enfermedad a profundidad, así mismo conocer estos genes de susceptibilidad permitirá tener marcadores moleculares importantes para el diagnóstico temprano de la misma, predicciones de riesgo y terapias individuales (Brennan *et al.*, 2011).

El ciclo celular se compone de diferentes fases; siendo primera la fase de síntesis de ADN (S), luego la mitosis (M) y finalmente dos fases 2 gaps (G1 y G2). En este proceso se incluyen componentes importantes como las ciclinas, las ciclinas dependientes de quinasas (CdK), el retinoblastoma (Rb), p53, entre otros. durante la fase G1 que es un punto crucial del ciclo celular, donde la célula se compromete a completar el ciclo celular, en este punto pueden interactuar factores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) aumentando la proliferación celular, lo cual sucede generalmente en el pulmón debido ya que las células tumorales de este órgano pueden producir dichos factores, haciendo que el tumor crezca de forma autocrina. Dichas señales provocan la sobreexpresión de las ciclinas de tipo D, siendo una anomalía muy característica del cáncer de pulmón (Wadowska *et al.*, 2020).

El locus 15q25, que ha demostrado ser una región de susceptibilidad con 3 genes (*CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4*) que codifican receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en tejidos neuronales y otros tejidos. Esta susceptibilidad ha sido demostrada en estudios que han relacionado pacientes fumadores y variantes en esta región aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, debido a que los nAChR están relacionados con la sensibilidad a la nicotina, es decir que variantes de estos receptores aumentan la adicción a la nicotina y por ende aumentan las probabilidades de exposición a agentes carcinógenos provenientes del tabaco (Wu *et al.*, 2009, Hung *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no explica del todo porque ciertas variantes de este locus aumentan la probabilidad de poseer este tipo de cáncer, ya que el riesgo aumenta en un 80% en personas que poseen alelos de riesgo, lo que puede indicar que esta región tenga varios loci de susceptibilidad que aún tienen que ser estudiados (Amos *et al.*, 2008, Shiraishi *et al.*, 2009).

La glutatión S-transferasa (GST) es una enzima detoxificante de carcinógenos (Enzimas de fase II) y posee más de 20 isoenzimas (GSTM1, GSTT1, GSTP1, etc.), un polimorfismo en el gen *GSTM1* aumenta el riesgo de poseer CP, lo cual fue comprobado mediante un metaanálisis realizado por Benhamou y colaboradores en 2002, donde descubrieron que personas que no poseen esta enzima tenían mayores posibilidades de poseer CP. Entre los marcadores más significativos encontramos enzimas que aparecen en fase I que son derivadas de polimorfismos de los genes *CYP* (citocromo P450) que se relacionan con la activación de importantes procarcinógenos asociados al humo del tabaco. Debido a esto se han estudiado una gran variedad de variables alélicas del *CYP* destacando *CYP1A1* y *CYP2D6*, aunque para estos no se ha comprobado un aumento significativo en el riesgo de desarrollar CP (Houlston, 2000, Sánchez de Cos Escuin, 2004).

2. LINEAS CELULARES

2.1. Líneas celulares para estudios de Cáncer

En la actualidad existen distintos modelos experimentales que permiten estudiar a profundidad el cáncer, entre las más importantes se encuentran las líneas celulares, siendo por mucho el modelo más utilizado, gracias a su fácil manipulación genética y propagación, además de que permite resultados reproducibles al utilizar los mismos protocolos de experimentación (Tsang y Wong, 2021)

Para el adecuado mantenimiento de las líneas celulares es necesario entender que los cultivos celulares son los encargados de generar el ecosistema idóneo para que la línea celular crezca, por lo que este debe mantener sus propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas al máximo. Para el mantenimiento de líneas celulares de cáncer se hace uso de cultivos primarios y pueden ser tanto de tipo monocapa, como en suspensión (Palmero, 2011). Este tipo de cultivos son ideales para estudios

relacionados con cáncer debido a que aunque las líneas celulares por lo general cuentan con un tiempo de vida finito tras un número determinado de pases (20-100), en el caso de las líneas celulares de cáncer o tumorales estas crecen indefinidamente, por lo que esto resulta ser una ventaja al usar este tipo de células ya que permitirá tener células en cultivo la mayoría del tiempo y así mismo realizar todas las pruebas necesarias para completar las investigaciones (Segretin,2003).

2.2. Líneas celulares de cáncer de pulmón

En la actualidad existe un promedio de 200 a 400 líneas diferentes de cánceres de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, el número de publicaciones realizadas usando este tipo líneas celulares asciende a 1000 por año, demostrando ser modelos muy eficaces para las investigaciones. El uso de líneas celulares de cáncer de pulmón ha ayudado a los investigadores a dilucidar los mecanismos moleculares que se encuentran en este tipo de cáncer (Gazdar *et al.*, 2010). Unos ejemplos de esto es el entendimiento de mutaciones en genes de supresión tumoral como *TP53*, oncogenes relacionados frecuentemente con cáncer de pulmón como *KRAS* y *EGFR*, el hallazgo de la disomía uniparental y entre otros descubrimientos que han permitido crear diversos estudios para diferentes tipos de tumores de cáncer de pulmón (Gazdar *et al.*,2010).

Para el cáncer de pulmón se han logrado distinguir líneas celulares tumorales con diferencias metabólicas y genéticas, lo que ha permitido estudiar las bases moleculares del cáncer de pulmón (Morantes *et al.*,2013). Entre las líneas celulares que se han logrado diferenciar se encuentra la línea A549 que fue desarrollada en 1972 mediante la extracción de un tejido tumoral de un varón de 58 años. Es una línea celular con características de células de tipo II del epitelio pulmonar, son de tipo escamoso y se encargan del transporte de algunas sustancias como electrolitos y agua a través del epitelio alveolar (Foster *et al.*, 1998). Una vez en cultivo *in vitro* estas crecen en una monocapa adheridas a la base del frasco de cultivo. Generalmente son usadas como modelo de estudio para la prueba de fármacos sobre el epitelio pulmonar alveolar tipo II como Paclitaxel, Docetaxel y Bevacizumab (Foster *et al.*, 1998).

3. PERSPECTIVA TERAPEUTICA Y TRATAMIENTOS DEL CANCER DE PULMON

3.1. Tratamiento quirúrgico

Existen diferentes procedimientos quirúrgicos que tratan el cáncer dependiendo de la forma en la que este ha afectado el órgano respiratorio, entre las más comunes encontramos; la lobectomía es el procedimiento mediante el cual se extrae el lóbulo

del pulmón en donde se encuentra el cáncer; la neumonectomía que es la extirpación total del pulmón; la segmentectomía o resección en cuña en donde solo se extrae una sección del tumor y la resección en manga donde se extirpa una sección del bronquio(Toledo *et al.*, 2015)

El cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) generalmente en estadios tempranos suele tener una buena tasa de respuesta a la cirugía. La cirugía es una alternativa a la cual solo pueden acceder pacientes con estadio I, II y III de la enfermedad, el resto de los estadios deberán acceder a un tratamiento multidisciplinario en el que se incluya la cirugía una vez los demás tratamientos han mostrado una buena respuesta. Generalmente para los estadios III y IV se suelen tratar con cuidados paliativos y en muy raras ocasiones se puede contemplar la idea de una cirugía (Alonso *et al.*, 2004).

3.2. Quimioterapia

Por otro lado, existen los tratamientos de tipo sistémico o también conocidos como terapia adyuvante, los cuales son tratamientos conocidos para la prevención de la reaparición del tumor o mantener el tumor en un tamaño exacto. Como es el caso de la quimioterapia que es un tratamiento en el cual se utilizan fármacos para que las células cancerígenas no crezcan ni se dividan bloqueando ciertos genes específicos o proteínas. En ciertas etapas de cáncer de colon resulta de ser gran ayuda para eliminar el cáncer, a pesar de esto también resulta contraproducente para el paciente ya que se utilizan fármacos bastante potentes que pueden afectar otros órganos (Cárdenas 2002, Chabner y Roberts, 2005). Como el caso del Irinotecan, es un fármaco derivado semisintético de la camptotecina se extrae de *Camptotheca acuminata* es usado con gran frecuencia en cáncer en estadio II y III. Siendo un inhibidor de la Topoisomerasa 1 proteína importante en el replicación y transcripción del ADN, el cual tiene un porcentaje de respuesta global de un 17% a 25%, lo que indica su eficacia como tratamiento (Aranda, 2004).

La quimioterapia consiste en usar una serie de medicamentos que tienen como fin atacar a las células cancerosas, cabe mencionar que este no es un tratamiento dirigido, es decir que estos medicamentos también pueden atacar células normales. Para el cáncer de pulmón la quimioterapia se suele hacer adyuvante es decir después de un procedimiento quirúrgico el cual disminuye la mortalidad en 13% con esquemas basados en platino y en un 11% con esquemas basados en UFT (Roberts, 2005). La otra forma de administrar quimioterapia es neoadyuvante es decir antes de un procedimiento quirúrgico, esto con el fin de disminuir el tamaño del tumor y permitir que la cirugía sea menos complicada, este tipo de tratamientos son proporcionados a pacientes con enfermedades en estadios IB, II y IIIA (Chabner *et al.*, 2005).

3.3. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento que consiste en la administración de radiación para destruir células cancerosas, y al igual que la quimioterapia puede ser neoadyuvante o adyuvante, siendo un tratamiento con fines curativos o paliativos (Moreno-Jimenez y Aritsu, 2007). Este tratamiento generalmente es administrado en conjunto con la quimioterapia que pueden llegar a curar al paciente o aliviar a un gran número de pacientes. Cuando se realiza este tipo de tratamientos hay una serie de factores que son tomados en cuenta para establecer qué tipo de tratamiento será el que ayude al paciente, generalmente uno de los factores más importantes es el estadio (Rodríguez-Garrido y Rodríguez de la Peña, 2010).

La radioterapia según el estadiaje se resume de la siguiente manera

- *Estadio I* con tumores que no pueden ser operables con menos de 4cm, aumenta la supervivencia a 5 años y suele usarse braquiterapia endobronquial
- *Estadio II*: la tasa de supervivencia en estos casos es del 10% en 5 años, generalmente se usa para tumores inoperables.
- *Estadio III y IV*: Se utiliza generalmente para aumentar la supervivencia y mejorar el control de pacientes con ganglios positivos cuyos tumores han sido resecados.

3.4. Inmunoterapia

El sistema inmune juega un papel importante dentro del reconocimiento y desaparición de células neoplásicas, por lo que se han realizado numerosos estudios en los cuales se tratan de generar tratamientos a partir del estímulo del sistema inmune para erradicar enfermedades relacionadas con el cáncer. El uso del sistema inmune como herramienta tiene dos grandes flancos, el primero se trata del ataque de dianas tumorales y el segundo como se había mencionado anteriormente el estímulo del sistema inmune para atacar tumores (Steven *et al.*, 2016).

Por otra parte, se creía que el cáncer de pulmón no era muy inmunogénico, pero hay evidencias de que pacientes con VIH tienen más incidencia de cáncer de pulmón. Así mismo se tiene evidencia de que muchos cánceres de pulmón no microcítico tienen la capacidad de producir antígenos con una buena respuesta inmune (Casado *et al.*, 2020). Por esto, se han creado vacunas antineoplásicas y sustancias inmunoestimuladoras (interferón e interleuquinas) que han mostrado resultados prometedores en contra el cáncer de pulmón (de Cos Escutin, 2017)

3.5. Nanotecnología

El uso de nuevos tratamientos novedosos en el campo de la tecnología se hace necesarios frente a la falta de tratamientos eficaces en contra del cáncer de pulmón.

El campo de la nanotecnología ha abierto nuevas investigaciones que al parecer podrían salvar la vida de muchos pacientes, ya que esta tiene diferentes ventajas como; la capacidad de diferenciar células malignas de células sanas, permitiendo la erradicación selectiva de las células malignas, también se encuentra la buena biodisponibilidad, la mejora de imágenes diagnósticas, alta estabilidad *in vivo* y la buena absorción intestinal (Gmenier y Ghosh, 2014; Li *et al.*, 2021).

La nanotecnología en esta área se refiere al uso de nanomateriales con diferentes fines, uno de los más estudiados actualmente es el uso de nanomateriales que encapsulan los agentes quimioterapéuticos como moléculas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y hormonas. Con el fin de transportarlos directamente a la células del cáncer de pulmón, evitando de esta manera matar a las células sanas (Cryer *et al.*, 2019). Uno de los ejemplos más novedosos se encuentra en el uso de nano robots que una vez dentro del tumor liberan trombina, evitando que se generen trombos en los vasos sanguíneos del tumor, lo que genera un bloqueo de estos, haciendo que el tumor no tenga acceso a nutrientes, por lo que inhibe su crecimiento (Li *et al.*, 2021).

Aunque existen múltiples usos de la nanotecnología en esta área, solo se encuentran habilitados 2 tratamientos que incluyen esta tecnología en el cáncer de pulmón. El primero es Abraxane® el cual es un tratamiento usado como primera línea para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado o metastásico, y se hace en combinación con el uso de platino, este se basa en la administración de Paclitaxel gracias a la unión de este fármaco a nanopartículas de albúmina de 130 nm, evitando así el uso del disolvente polietoxilado tóxico e inmunogénico Cremophor® mejorando la farmacocinética y además disminuyendo los efectos secundarios (Ma y Mumper, 2013). El segundo tratamiento es Genexol-PM, es la formulación de nanopartículas de micelas poliméricas de Paclitaxel que evitan el uso del disolvente anteriormente mencionado, mejorando así la eficacia antitumoral (Cryer *et al.*, 2019).

4. FITOQUÍMICOS

4.1 Farmacognosia

El estudio sistemático de drogas de origen natural es abordado por una ciencia conocida como farmacognosia, enfocándose principalmente en los principios activos de sustancias de origen animal, vegetal y mineral que puedan tener efectos terapéuticos. Esta ciencia tiene una relación muy estrecha con diferentes áreas de la biología, entre ellas la botánica de donde se extrae la materia prima de estudio y la fitoquímica que permite el análisis de los extractos vegetales (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

Al igual que la farmacología la cual estudia los efectos curativos de una sustancia y los efectos que pueden tener estas sustancias dentro del cuerpo, entendiendo que estas sustancias pueden provenir de cualquier medio ya sea natural o sintético. Teniendo en cuenta esto se puede entender que la farmacología proporciona conocimientos a la farmacognosia, es decir que al conocer cómo ciertas sustancias de origen natural tienen efectos curativos o terapéuticos, al extrapolarse a la ciencia de la farmacología se puede entender de manera directa como esta sustancia proviene de diferentes medios y cómo estos medios pueden proporcionar ayuda a pacientes con diferentes enfermedades, como es el caso de sustancias de origen vegetal que provienen de muchas plantas medicinales (Valverde, 1996).

4.2. Actividad biológica fitoquímicos

Las plantas juegan un papel importante en la vida del ser humano, debido a que algunas de ellas poseen unas propiedades biológicas y químicas que durante siglos han servido a la humanidad para la cura y prevención de enfermedades (Vayalil, 2020). Estas propiedades biológicas generalmente vienen de unos compuestos provenientes del metabolismo de la planta, se les ha atribuido el nombre de fitoquímicos que generalmente son polifenoles, flavonoides, ligninas, alcaloides, terpenoides, carotenoides, vitaminas (Agbor *et al.*, 2011). Varios de los compuestos provenientes de los grupos mencionados anteriormente prueban tener una serie de propiedades biológicamente importantes como la antioxidación, resistencia a patógenos y hasta propiedades anticancerígenas (Fukumoto y Mazza, 2000).

Los estudios sobre fitoquímicos y sus propiedades anticancerígenas, muestran que estos son una opción viable para tratamientos con pacientes de cualquier tipo de cáncer y disminuir las reacciones adversas de estos tratamientos (Choudhari *et al.*, 2020). Los estudios para el descubrimiento de nuevos fitoquímicos con estas propiedades citotóxicas o antiproliferativas poseen una serie de pasos preclínicos. Empezando por la prueba del fitoquímico evaluando qué actividades biológicas posee, seguido de esto se realizan bioensayo con pruebas a nivel *in vitro* y los efectos *in vivo* de los fitoquímicos en este caso con el uso de animales modelo (Hosein *et al.*, 2016).

Para estudiar los mecanismos detrás de la acción de los fitoquímicos también se siguen una serie de pasos; siendo el primero determinar los objetivos moleculares diana de los fitoquímicos, luego el estudio de validación en líneas celulares, modelos animales, objetivos poblacionales específicos, para finalizar con estudios clínicos para estudiar las vías dirigidas que se ven alteradas en distintos tipos de cáncer (Afrin *et al.*, 2018). El uso de modelos *in vitro* e *in vivo* han permitido identificar una amplia gama de actividades anticancerígenas y citotóxicas de diferentes fitoquímicos que incluyen la antiproliferación, bloqueo del ciclo celular, alteración en la reparación del

ADN, inducción de apoptosis, antiinflamación, activación de genes supresores tumorales y supresión de oncogenes (Johnsin, 2007).

4.3. Chalconas y actividad biológica:

Las chalconas corresponden a un grupo de compuestos polifenólicos provenientes de plantas, caracterizado por poseer dos anillos aromáticos unidos por un sistema carbonilo, β -insaturado de tres carbonos (Rao *et al.*, 2010). Este grupo de compuestos son precursores de los flavonoides e isoflavonoides los cuales también pueden ser sintetizados en el laboratorio una vez se conoce su estructura (Detsi *et al.*, 2007).

4.4. Farmacología Chalconas

Las chalconas naturales y sus derivados sintéticos muestran ser un grupo de compuestos con una amplia gama de actividades biológicas. Entre las que se incluyen antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, anti infectivas, antiviral, siendo importantes en la industria farmacéutica (Mahapatra *et al.*, 2015). Varias chalconas puras aisladas han sido probadas en ensayos clínicos para tratamientos de cáncer, virus y trastornos cardiovasculares mostrando un alto potencial farmacológico.

Investigaciones recientes se han centrado en las actividades anti proliferativas en células cancerosas y la reducción de tumores, mostrando incluso que el consumo de estos compuestos de origen vegetal en la dieta no tiene ningún efecto adverso en la salud de los pacientes (Sharma *et al.*, 2016). Este tipo de moléculas pueden ser utilizadas como agentes quimioterapéuticos, como es el caso de Xanthohumol, un agente quimiopreventivo en la hiperplasia y carcinogénesis de próstata. Ha mostrado una disminución de la proliferación celular (Girisa *et al.*, 2021). Existen diferentes tipos de chalconas que muestran actividades importantes sobre el cáncer, como la acumulación de moléculas p53 y p21. Induciendo la apoptosis en células cancerosas, la inhibición de la invasión celular que es la responsable de la metástasis y sin mostrar ningún efecto sobre células sanas, lo que demuestra que pueden ser fármacos seguros para el tratamiento del cáncer (Mahapatra *et al.*, 2015).

4.5. Uso de diferentes Chalconas con actividades anticancerígenas

En torno a las chalconas han surgido múltiples investigaciones, gracias a sus propiedades anticancerígenas. Entre las que se encuentran sus blancos moleculares dentro de las células, induciendo la inhibición de genes que contribuyen al crecimiento tumoral o activando vías que contribuyen a la apoptosis mostrando alta citotoxicidad y selectividad en líneas celulares como lo son las de cáncer de pulmón (Mahapatra *et al.*, 2015). Al comparar todas las evidencias mostradas por diferentes investigadores, se ha llegado a la conclusión de que la estructura de las chalconas influye de manera significativa en el tipo de interacción que pueda existir entre este tipo de compuestos

y los objetivos moleculares dentro de las líneas celulares de cáncer (Firoozpour *et al.*, 2012). Lo que permite entender que una chalcona específica no tiene el mismo potencial citotóxico sobre todas las líneas celulares, si no por el contrario puede tener este efecto solo sobre una línea específica.

El estudio realizado por Ethiraj y colaboradores (2013) evaluaron la citotoxicidad de unas chalconas sobre 3 líneas celulares distintas (carcinoma de colon humano (HCT-15), carcinoma de cuello uterino (HeLa), adenocarcinoma de pulmón (A549)), demostrando que una de sus chalconas en este caso la 3c (3- (3,4,5-trimetoxifenil) -1- (2-naftil) prop-2-en-1-ona) poseía mayor citotoxicidad sobre HeLa que sobre las demás líneas celulares, presentando que dependiendo la chalcona se puede tener un efecto citotóxico diferencial dependiendo de la línea celular.

Además, se ha evidenciado el efecto citotóxico de distintas chalconas sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 mostrando además el blanco molecular y la manera en que se genera este efecto. Como se presenta en el estudio de Warmka y colaboradores (2012), que observaron la chalcona-24 promueve la inhibición de la proliferación celular, estimulación de las vías apoptóticas e inhibe NF- κ B en líneas celulares A549.

CAPITULO 2: ESCRITO TRABAJO DE GRADO

RESUMEN

El cáncer de pulmón es una enfermedad con gran incidencia en el mundo, siendo el segundo tipo de cáncer más común, causando 262,000 muertes al año en América. Además, es uno de los tipos de Cáncer con mayor mortalidad, debido a la detección tardía presentando una esperanza de vida no mayor a 5 años. Habitualmente las personas con este tipo de cáncer se someten a tratamientos como la quimioterapia, radioterapia e intervenciones quirúrgicas, procedimientos que traen efectos secundarios agresivos que pueden llevar a la muerte. En los últimos años han surgido investigaciones para desarrollar nuevos tratamientos que reduzcan los efectos secundarios en los pacientes. Los fitoquímicos y este caso los polifenoles han demostrado tener diferentes actividades biológicas sobre diferentes tipos de cáncer. Entre estos se encuentran 3 chalconas (CS1, CS4 y CS12) que han demostrado tener un posible potencial citotóxico, partir de la técnica MTT que determinó la IC50 que mide la citotoxicidad en células A549, lo que dio como resultado que estas tres chalconas son tienen un potencial citotóxico, siendo CS4 el compuesto con mayor citotoxicidad y menor valor de IC50 (21,52 µg/mL), seguido de CS1 (21,73 µg/mL) y por último CS12 (51,7 µg/mL). se les determinó su actividad proapoptótica., a partir de microscopia de inmunofluorescencia se observó en las células A549 tratadas con CS1 y CS4 una serie de cambios morfológicos en los microtúbulos mostrando cambios en el tamaño del citoplasma y también en el núcleo, por otro lado, CS12 presento una forma irregular del citoplasma sin cambios en el núcleo. Con la citometría de flujo usando el marcador apoptótico caspasa 3/7, se determinó que CS1 tiene una actividad apoptótica temprana de 66,04% y apoptosis tardía de 14,55%, CS4 con 46,51% (Temprana) - 20,58 (Tardía) y CS12 con 30,35% (Temprana) - 30,0% (Tardía), todo esto en la línea celular A549. Por último, utilizando RT-qPCR se hizo el análisis de expresión de los genes proapoptoticos Tp53, BIM, BAX y CASP3 evidenciando que la expresión de los genes en las células expuestas a CS4 fue mayor en comparación con las expuestas a CS1. Por lo que se concluye que CS4 es el compuesto con mayor actividad citotóxica y proapoptótica en líneas A549, por lo que pueden ser una chalcona candidata para futuras investigaciones donde se profundice el mecanismo molecular que soporte su potencial terapéutico.

Palabras clave: Cáncer, Líneas celulares, Genes, Citotoxicidad, apoptosis

ABSTRACT:

Lung cancer is a disease with a high incidence in the world, being the second most common type of cancer, causing 262,000 deaths per year in America. In addition, it is one of the types of cancer with the highest mortality, due to late detection, with a life expectancy of no more than 5 years. Usually, people with this type of cancer undergo treatments such as chemotherapy, radiotherapy and surgical interventions,

procedures that bring aggressive side effects that can lead to death. In recent years, research has emerged to develop new treatments to reduce side effects in patients. Phytochemicals and in this case, polyphenols have been shown to have different biological activities on different types of cancer. Among these are 3 chalcones (CS1, CS4 and CS12) that have been shown to have a possible cytotoxic potential, based on the MTT technique that determined the IC50 that measures cytotoxicity in A549 cells, which resulted that these three chalcones have a cytotoxic potential, being CS4 the compound with the highest cytotoxicity and the lowest IC50 value (21.52 µg/mL), followed by CS1 (21.73 µg/mL) and finally CS12 (51.7 µg/mL). Their proapoptotic activity was determined, from immunofluorescence microscopy, a series of morphological changes in the microtubules were observed in A549 cells treated with CS1 and CS4, showing changes in the size of the cytoplasm and in the nucleus; on the other hand, CS12 presented an irregular shape of the cytoplasm without changes in the nucleus. With flow cytometry using the apoptotic marker caspase 3/7, it was determined that CS1 has an early apoptotic activity of 66.04% and late apoptosis of 14.55%, CS4 with 46.51% (Early) - 20.58 (Late) and CS12 with 30.35% (Early) - 30.0% (Late), all this in the A549 cell line. Finally, using RT-qPCR, the expression analysis of the proapoptotic genes Tp53, BIM, BAX and CASP3 was performed, showing that the expression of the genes in cells exposed to CS4 was higher compared to those exposed to CS1. Therefore, it is concluded that CS4 is the compound with the highest cytotoxic and proapoptotic activity in A549 lines, so it may be a candidate chalcone for future research to deepen the molecular mechanism that supports its therapeutic potential.

Keywords: Cancer, Cell lines, Genes, Cytotoxicity, apoptosis.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades producto de mutaciones que se generan en los genes que controlan el ciclo celular, dando lugar a neoplasias que afectan al organismo. Para este tipo de enfermedades generalmente son usados tratamientos sumamente agresivos como la quimioterapia, la radioterapia y las intervenciones quirúrgicas, los cuales generan efectos secundarios y secuelas que pueden afectar gravemente la salud del paciente (Cárdenas, 2002, Moreno-Jiménez y Aritsu, 2007, Hanahan, 2022).

En Colombia se estima que anualmente se presentan 11,8 afectados por 100.000 habitantes, al igual que en otros países de la región como: Brasil, Chile, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela, se estima que la esperanza de vida de un paciente luego de ser diagnosticado es menor a 5 años (Ferlay *et al.*, 2021). Por lo tanto, el diseño de modelos de estudio a nivel celular permite evaluar productos naturales con potencia anticancerígeno y citotóxico con fines farmacológicos y terapéuticos.

Actualmente han surgido tratamientos alternativos como el uso de la nanotecnología para atacar directamente tumores, terapias inmunológicas que afectan dianas (“*Targets*”) específicas en las células cancerígenas y el uso de quimioterapias que son menos agresivas que la quimioterapia tradicional (Till *et al.*, 2004; Heath y Davis, 2008; Demain y Vaishnav, 2011). Se ha destacado el uso de extractos y compuestos naturales como agentes quimioterapéuticos, con los que se busca complementar tratamiento anticancerígeno, así facilitar el manejo de la enfermedad al disminuir el tiempo y/o el uso de tratamientos clásicos y agresivos normalmente utilizados (Ouyang *et al.*, 2021).

Dentro de los compuestos fitoquímicos que han presentado actividad en dianas específicas, identificadas con actividad citotóxica y/o anticancerígena se encuentra: La Curcumina, Resveratrol y Matairesinol (Cione *et al.*, 2019). Se destacan las chalconas como un grupo de compuestos flavonoides que han demostrado tener una gran cantidad de actividades biológicas, entre las que se resaltan la citotoxicidad y diversos efectos anticancerígenos. Además, resultado tener respuestas citotóxicas sobre diferentes líneas celulares de cáncer, como células HT29, A549 (Rao *et al.*, 2010).

Este estudio se centrará en la evaluación de la actividad citotóxica que tienen 3 diferentes chalconas, que fueron aisladas por el grupo de investigaciones InQuiBio – Universidad Militar Nueva Granada. Se evaluaron en la línea celular (A549), determinando si estas chalconas tienen potencial uso complementario a tratamientos anticancerígenos y dilucidar posibles mecanismos por los que estos actúan. Por lo que la pregunta de investigación es; ¿Las 3 chalconas tienen actividad citotóxica y/o actividad proapoptotica en una línea celular de cáncer de pulmón A549?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Evaluar el potencial citotóxico de 3 diferentes chalconas provenientes de una biblioteca *in house* sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 y determinar las candidatas con actividad proapoptótica.

3.2. Objetivos específicos

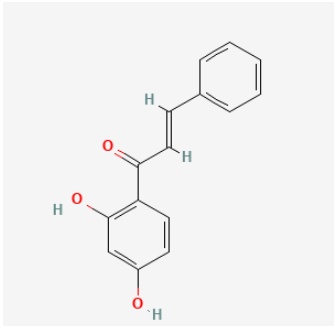
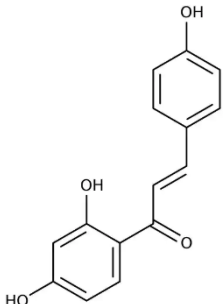
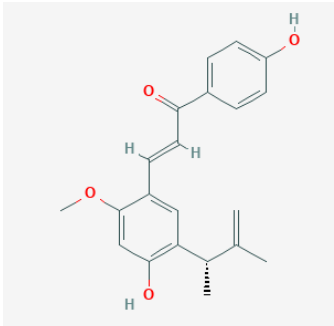
- Estimar la actividad citotóxica e índice de selectividad de las 3 chalconas sobre la línea celular A549.
- Determinar si las chalconas con mejor actividad citotóxica en células A549 inducen apoptosis en las células A549.
- Observar los cambios morfológicos que producen las chalconas con mejor actividad citotóxica en las células A549.
- Analizar la expresión de genes pro apoptóticos en células A549 sometidas a tratamientos con las chalconas inductoras de apoptosis.

MATERIALES Y METODOS

4.1. Obtención de chalconas

En este trabajo se evaluaron 3 chalconas que fueron aisladas por el grupo de investigación InQuiBio de la Universidad Militar Nueva Granada y fueron donadas por el Dr. Ericsson Coy.

Tabla 1. Chalconas aisladas por el grupo de investigación InQuiBio de la UMNG.

Compuesto	Nombre Chalcona	Origen	Estructura
CS1	2',4'-dihydroxychalcone	<i>Piper aduncum</i>	
CS4	4,2',4'-trihydroxychalcone	<i>Nectandra longifolia</i>	
CS12	4,2'-dihydroxy-3-methoxychalcone (Licochalcone A)	<i>Lupinus mutabilis</i>	

4.2. Cultivos celulares:

Se utilizaron las líneas A549, como línea tumoral de pulmón, y la MRC5, como línea celular de control normal. Las líneas celulares se sembraron en cajas de cultivo T25, en RPMI-1640 (Lonza) y suplementado con SFB al 10% 1% de L-Glutamina y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

4.3. Determinación de la viabilidad celular MTT

Se determinó la actividad citotóxica de los compuestos mediante el ensayo MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro; azul de tiazolilo), para esto se cultivaron aproximadamente 8000 células por pozo en una placa de 96 pozos. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, luego se realizó el tratamiento con los compuestos por triplicado y se dejó en incubación durante 48 horas. Se retiró el medio de cultivo y se adicionó 100 µl del reactivo MTT (Sigma-Aldrich) [0.5 mg/mL] del Y se le adicionó 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver cristales. La lectura se realizó en el lector de microplacas modelo 680 de BIO-RAD® con longitud de onda de 570 nm, se calculó el porcentaje de viabilidad y se determinó la concentración de inhibición del crecimiento del 50% de la población celular (IC₅₀) utilizando regresión no lineal en el software GraphPad Prism 9.0.

4.4. Apoptosis por citometría de flujo kit Casp3/7-AAD

Se realizó el análisis cuantitativo de células vivas y apoptosis con el Kit “Muse® Casp3/7-AAD & Dead Cell Kit” de Luminex en el analizador de células Guava® Muse®. A partir de células A549 tratadas con los compuestos al IC₅₀. Se cultivaron células en concentración 1x10⁴ células/mL, en un tubo con 100µL de suspensión celular se agregó 100µL del reactivo Muse® Casp3/7-AAD y Dead Cell, se incubó durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se midieron las muestras en el analizador de células Guava® Muse® (Delgado, 2021).

4.5. Detección de cambios en la morfología celular asociados a la inducción de apoptosis

Se cultivaron aproximadamente 7000 células por pozo en placa de 96 pozos. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, posteriormente se trataron las células con los 3 compuestos y se incubaron por 24 horas. Se fijaron las células con metanol absoluto se incubaron a -20°C por 10 minutos y acetona 20 segundos. Se adicionó en los pozos el anticuerpo monoclonal Anti-α-Tubulina en relación 1:2000 en Albúmina de Suero Bovino (BSA) 5% y se incubó durante 12 horas a 4°C, se lavaron las muestras con “Tween-Tris-buffered saline” (TTBS) por 5 minutos en agitación a 70 rpm. Luego se adicionaron 80µL de Alexa Flour™ 488 (Pierce- Thermo-Fisher) 1:700 anticuerpo/BSA 2,5% y se incubaron en oscuridad durante 2 horas y se lavaron las muestras con TTBS.

La tinción de los núcleos se realizó con 50 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) [1 µg/mL] en relación 3:1 con VECTASHIELD® y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos. Se observó el resultado en el microscopio Motic 2.0.

4.6. Extracción de ARN

Se cultivaron aproximadamente 1x10⁶ células las cuales fueron tratadas con CS1 y CS4. A partir de células lavadas con buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS) 1X se realizó

la extracción del ARN total mediante el protocolo de extracción preestablecido en el script para el Kit de extracción de ARN Total MagMAX™ mirVana™ en el equipo “KingFisher Flex System” de Thermo Fisher Scientific. Se adicionó 200µL de “Lysis Binding Mix” para cada una de las muestras se programó la agitación de la placa durante 3 minutos a 950 rpm, luego se agita por 5 minutos con 20µL de “Binding Beads Mix” a 850 rpm.

Luego se programó un lavado con 150µL de “Wash Solution 1” con agitación de 1 minuto a 950 rpm. Nuevamente se puso la placa de procesamiento en el soporte magnético por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se retiró la placa de procesamiento del soporte magnético y con 150µL de “Wash Solution 2”. Se agito por 2 minutos a 1150 rpm la placa de procesamiento sin cubrir para secar las perlas de unión de ARN. Se añadieron 50µL de Turbo DNase™ a cada muestra con agitación por 15 minutos a 1050 rpm. Luego se añadió 50µL de “Rebinding Buffer” y 100µL de isopropanol en cada muestra. Se cubrió y agito durante 3 minutos a 950 rpm. Se colocó la placa de procesamiento en el soporte magnético por 3 minutos, se retiró el sobrenadante sin arrastrar las perlas de unión de ARN. Luego se retiró la placa del soporte magnético y se agregaron 150µL de “Wash Solution 2” a cada muestra. Se cubrió y agito la placa por 1 minuto a 950 rpm, luego se retiró el sobrenadante.

Agitando la placa de procesamiento por 2 minutos a 1050 rpm para secar las perlas de unión al ARN. Se añadió 100µL de “Elution Buffer” precalentado a cada muestra, se cubrió y agito 3 minutos a 1050 rpm. Se dispuso la placa en el soporte magnético por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a el plato de elución. El ARN extraído y purificado se almaceno a -80°C en un tubo de PCR de 200µL para cada muestra.

4.7. RT-qPCR

Se sintetizó cDNA a partir de RNA total extraído y purificado, con el Kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” de ROCHE, se empleó el sistema de priming basado en dos primers y la transcriptasa reversa de alta sensibilidad. Para la qPCR se utilizó el Kit “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I” en termociclador de referencia “LightCycler® 96 System” con los “primers” para los genes proapoptóticos BIM, BAX, CASP3 y TP53. se empleó como “Housekeeping” Beta-actina (Tabla 3.). la cual fue cuantificada en todas las muestras

Los primers (Tabla 2.) fueron diseñados por el grupo de investigaciones GIBGA de la U.D.C.A., realizaron alineamientos a partir de secuencias curadas en la base de datos RefSeq con el fin de determinar regiones consenso Y quienes verificaron en el software OligoAnalyzer 3.0. los parámetros de diseño utilizados para los iniciadores

Tabla 2. Primers diseñados por el grupo de investigaciones GIBGA para el estudio de genes proapoptóticos

Gen	Primer (5'–3')	Annealing Tm(°C)	Amplicon (nt)
BIM	CCCCGCTTTTCA TCTTTATG	58.00	85
	GGGCTCCTGTCT GTGTCAA		
TP53	GGGAGCACTAA GCGAGCA	59.00	105
	AAAGCTGGTCTG GTCCTGAA		
CASP3	TGAGTGCTCGCA GCTCATA	59.00	95
	GGGCTCGCTAA CTCCTCAC		
BAX	ACCTTGACTTGA TTAGTGCCTTCT	59.00	78
	GGGTCATCAATG AACTTGAGC		
Beta-Actina	AAGTCCCTTGCC ATCCTAAAA	59.00	91
	ATGCTATCACCT CCCCTGTG		

Tabla 3. Protocolo de amplificación utilizado en la qPCR

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 min
45 CICLOS		
Desnaturalización	95°C	10 s
Annealing	59°C	30 s
Extensión	68°C	1 min
Final		
Elongación	40°C	30 min

Se cuantificó la expresión de estos genes de células A549 no tratadas y tratadas con los compuestos CS1, CS4, CS12 y el control positivo Taxol (Tx). El experimento se realizó por triplicado.

Para comparar la variación de expresión del gen de interés se utilizó el método ΔC_t , donde se usaron las siguientes ecuaciones para calcular el ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ y el Fold change a partir del promedio de los datos.

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{gen de referencia})$$

Luego se calcularon las diferencias entre las muestras del experimento es decir las células tratadas con los compuestos y las tratadas con el Taxol (Tx), es decir las muestras tratadas con Taxol (Tx).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra del experimento}) - \Delta Ct (\text{control positivo})$$

Por último, se calculó las variaciones relativas de la expresión genética utilizando 2 como la eficiencia que se fija en el 100% con la siguiente formula:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.8. Análisis estadístico.

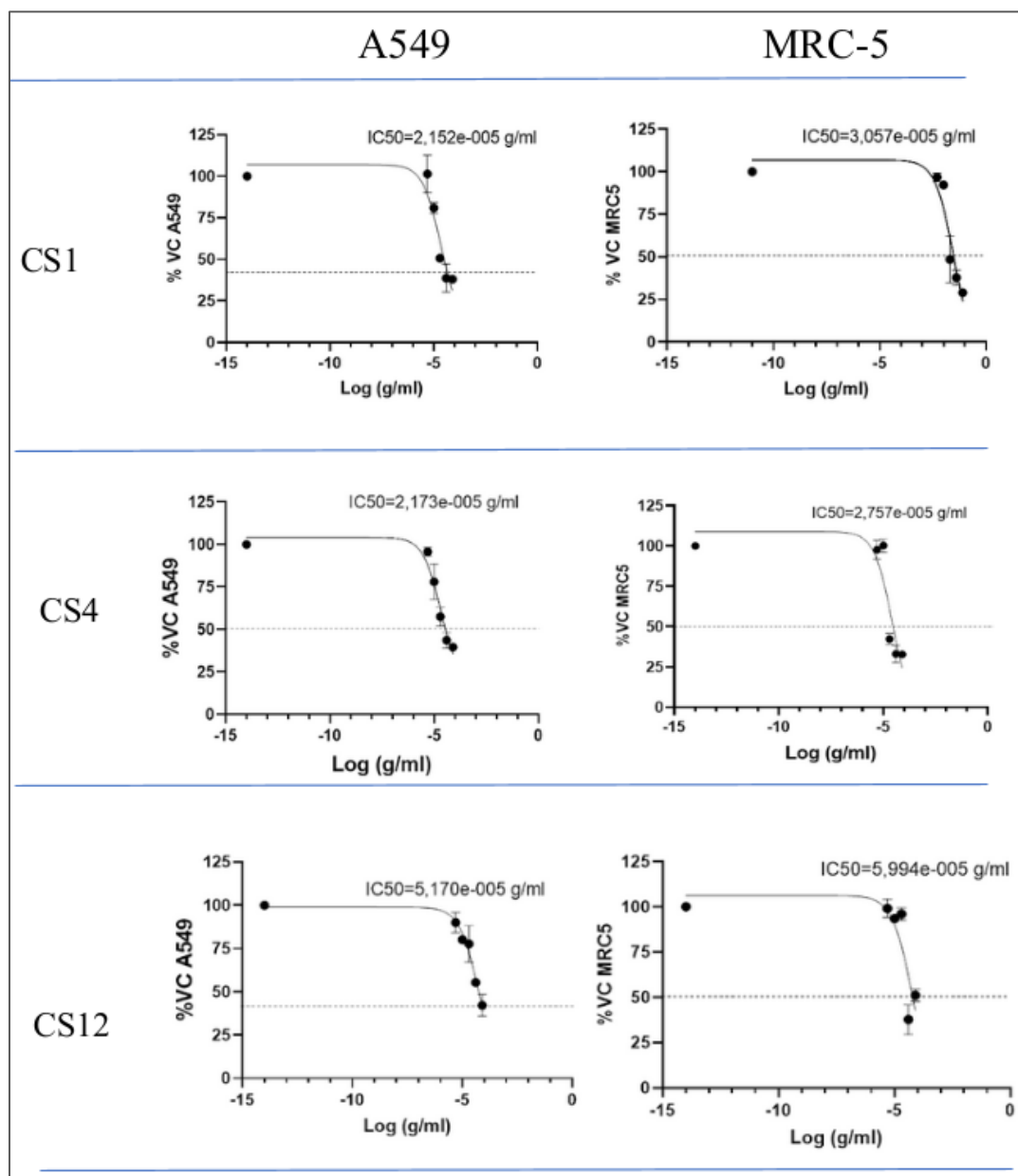
Para el análisis estadístico primero se realizó un test de Shapiro Wilk, para observar la normalidad de los datos de "Fold change" que provocaba cada uno de los 3 compuestos (CS1, CS4 y Tx), donde el nivel de significancia fue de 0,005. Posterior a esto se realizó un test de Welch T-student no apareado para comparar las diferencias significativas del "Fold chance" entre cada una de las muestras, estableciendo como nivel de confianza del 95%. Todo esto se realizó en el programa GraphPad Prims 9.

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación, se presenta el análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la evaluación de la actividad citotóxica de 3 chalconas y proapoptótica de las candidatas para el potencial uso en el tratamiento contra el cáncer de pulmón.

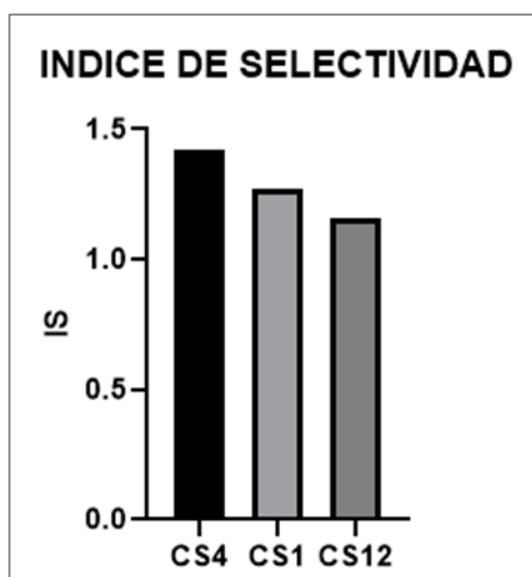
1. ANÁLISIS DE RESULTADOS

1.1. Citotoxicidad e índice de selectividad de los compuesto CS1, CS4 y CS12



Grafica 1. Valores de IC₅₀ (Línea punteada) representados por la gráfica de regresión lineal. donde el eje Y representa el porcentaje de viabilidad celular, y el eje X representa los valores de las distintas concentraciones evaluadas de los compuestos CS1, CS4 y CS12 a los cuales fueron sometidas las células MRC-5 y A549 por triplicado. El valor de IC₅₀ está representado en g/ml en la parte superior de la gráfica.

La viabilidad celular de la línea celular (A549) y células de broblastos sanos de pulmón (MRC-5) (MRC-5), se evaluó después de 48 horas de exposición con cada una de las chalconas (CS1, CS4 y CS12) en el ensayo MTT (Grafica 1). Se determinó la concentración de inhibición para cada una de las chalconas en la que el 50% de las células muere. La línea celular A549 y las células sanas (MRC-5) presentan con el compuesto CS1 con $IC_{50}=21,52 \mu\text{g/mL}$ (A549) y $30,57 \mu\text{g/mL}$ (MRC-5) siendo más sensibles las células A549 en comparación con el control. Con respecto al ensayo con el compuesto CS4, las células A549 presentaron un $IC_{50}=21,73 \mu\text{g/mL}$ y el control MRC-5 $IC_{50}=27,57 \mu\text{g/mL}$, siendo la línea MRC-5 más resistente al compuesto. En cuanto a CS12, la línea MRC-5 tuvo un $IC_{50}=59,94 \mu\text{g/mL}$ mayor al resultado en la línea A549 con $IC_{50}=51,70 \mu\text{g/mL}$, siendo MRC-5 más resistente al compuesto en comparación a A549. En el ensayo de citotoxicidad, la línea celular A549 tuvo menor IC_{50} en comparación con el control MRC-5, en cada uno de los ensayos con exposición a las chalconas. Se destacan CS4 y CS1, ya que presentaron valores cercanos de sus respectivos IC_{50} en A549, en comparación al compuesto CS12 donde las células A549 tuvieron mayor resistencia al tratamiento.



Grafica 2. Grafica de barras representando el Índice de selectividad donde el eje Y representa el valor de IS (Índice de selectividad) de los compuestos CS1, CS4 y CS12 que están el eje X. Esto representa la relación del IC_{50} entre las células sanas MRC5 y células de cáncer A549.

El índice de selectividad (IS) es la relación del IC_{50} de células sanas (Control) y las células de cáncer tratadas con el mismo compuesto (Wang *et al.*, 2012). La relación entre el IC_{50} de la línea celular control MRC-5 y la línea celular A549 tratadas con cada una de las chalconas. La figura 4 presenta el IS de cada compuesto, CS4 presento el IS mayor, seguido por CS1 y CS12. Por ende, CS4 es el compuesto que tiende a tener mayor capacidad antiproliferativa en comparación con las otras chalconas evaluadas.

El compuesto CS1 ha demostrado tener capacidad antiproliferativa y anticancerígena en diferentes líneas celulares. Wang y colaboradores (2012), a partir del ensayo *in vitro* con Sulforhodamina B (SRB) en células tumorales MCF-7 presentaron el IC50 ($IC_{50} = 8,4\text{--}34,3 \mu\text{M}$), en células MDA-MB-231 ($IC_{50} = 8,4\text{--}34,3 \mu\text{M}$) y A549 ($IC_{50} 15,3\text{--}36,3 \mu\text{M}$). La línea celular A549 tratada con CS1 presento un $IC_{50}=90,45 \mu\text{M}$, un valor más alto a los presentados por Wang y colaboradores. Al ser diferentes las condiciones del ensayo, no se pueden comparar los valores IC_{50} menores a los resultados con los presentados en ese estudio. Sin embargo, el resultado de citotoxicidad y IS permite identificar el potencial antiproliferativo que tiene el compuesto CS1 en la línea celular A549.

El compuesto CS4 ha demostrado tener actividad quimiopreventiva en estudios *in vivo* e *in vitro*, se le han atribuido propiedades anticancerígenas y citotóxicas como la inhibición de proliferación, migración y adhesión heterogénea en células A549 (Hsu *et al.*, 2004). Además, Yamazaki y colaboradores (2002), demostró el potencial terapéutico que tiene el CS4 en la inducción de apoptosis en diferentes modelos celulares, inhibiendo la formación de tumores, carcinogénesis y metástasis. El IC_{50} obtenido en el ensayo de la línea A549 tratada con CS4 fue $IC_{50}=83,98$, en comparación con los resultados presentados por Sun y colaboradores (2022), se evaluó CCK-8 a 48 horas después del tratamiento con el compuesto en la línea celular A549, se obtuvo el $IC_{50}=33.46\pm 4.11 \mu\text{M}$. Sin embargo, el resultado del IC_{50} varía puesto que se evaluaron con diferentes condiciones, pero se destaca que la concentración de CS4 en A549 tuvo la menor concentración en la citotoxicidad y IS entre las 3 chalconas evaluadas.

En cuanto CS12, en la revisión bibliográfica son pocos los estudios que se han realizado evaluando este compuesto en cuanto a citotoxicidad. En el estudio presentado por Cho y colaboradores (2017) presentaron un $IC_{50}= \pm 25 \mu\text{g/mL}$ en las células cancerosas escamosas KB humana. El IC_{50} obtenido en el ensayo de la línea celular A549 tratadas con CS12 fue de $IC_{50}=51,7 \mu\text{g/mL}$, siendo el IC_{50} más alto y el IS más bajo en comparación con los tratamientos utilizando CS1 y CS12 en células A549. Por ende, el compuesto CS12 tiene actividad diferencial dependiendo de la línea celular, en el caso de KB humana presenta una capacidad citotóxica importante, por otro lado, en A549 no muestra esa capacidad de citotoxicidad ni selectividad con células tumorales en esta línea.

1.2. Análisis morfológico por inflorescencia de la línea celular A549

Se realizó el análisis de microscopía de inflorescencia en las células A549 tratadas con las tres chalconas (CS1, CS4 y CS12) a partir de la concentración de inhibición dada por el IC_{50} en el ensayo MTT en comparación con el control positivo Taxol (Tx) y negativo (CN).

En general, se pueden observar diferentes variaciones en las células a nivel de microtúbulos, núcleo, tamaño y forma. Para poder observar síntomas de la apoptosis se marcaron con flechas rojas aquellos cambios evidentes relacionados con apoptosis.

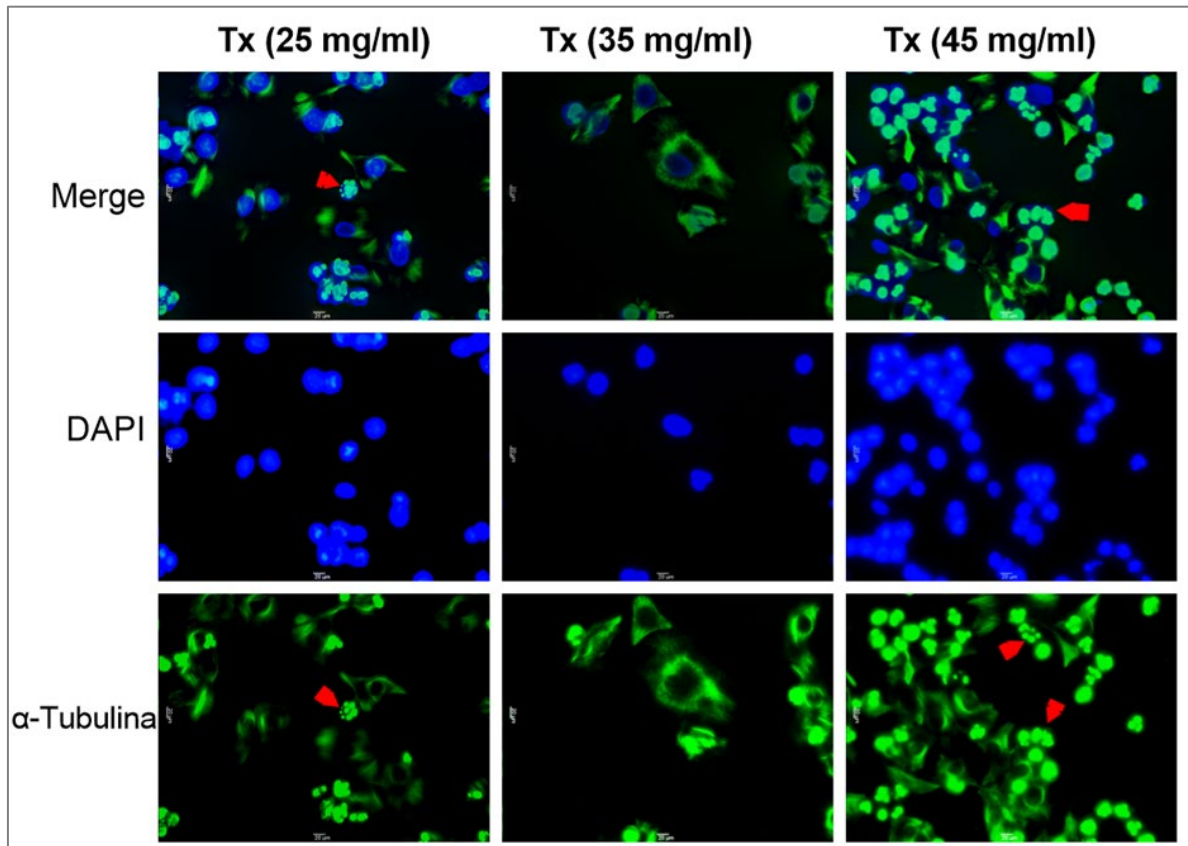


Figura 1. Micrografía de inflorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CN (Taxol).

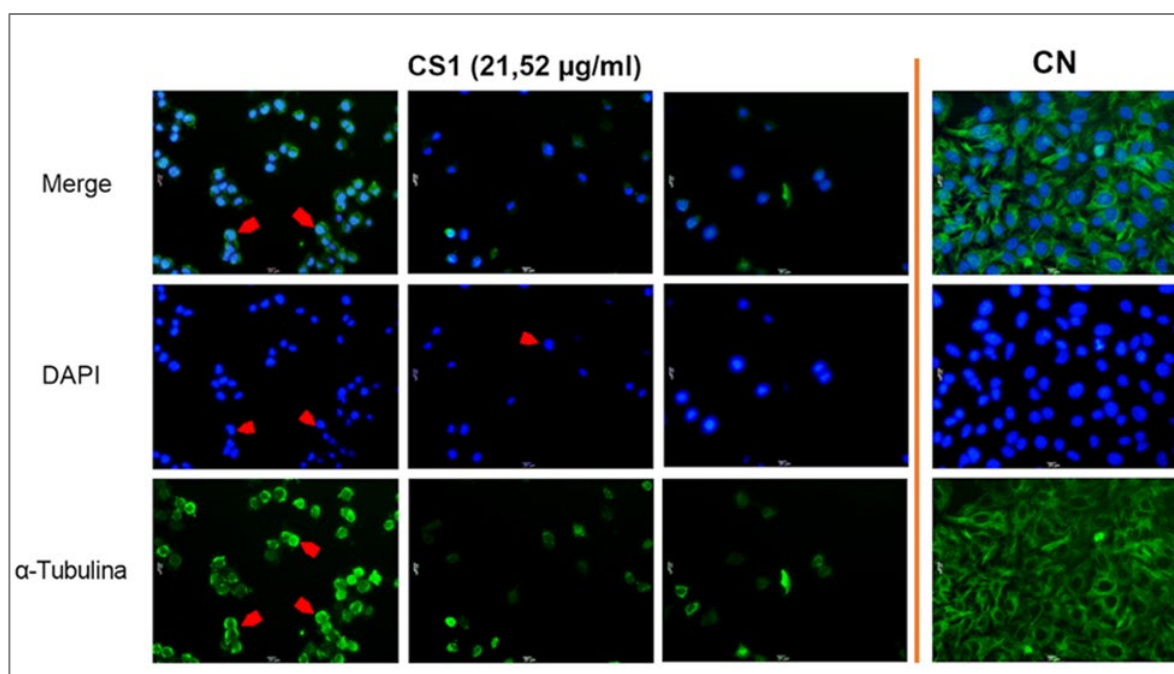


Figura 2. Micrografía de inmunofluorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CS1 a la concentración encontrada con el IC5 y así mismo su control negativo (CN). Se señala con flechas rojas los aparentes síntomas de apoptosis.

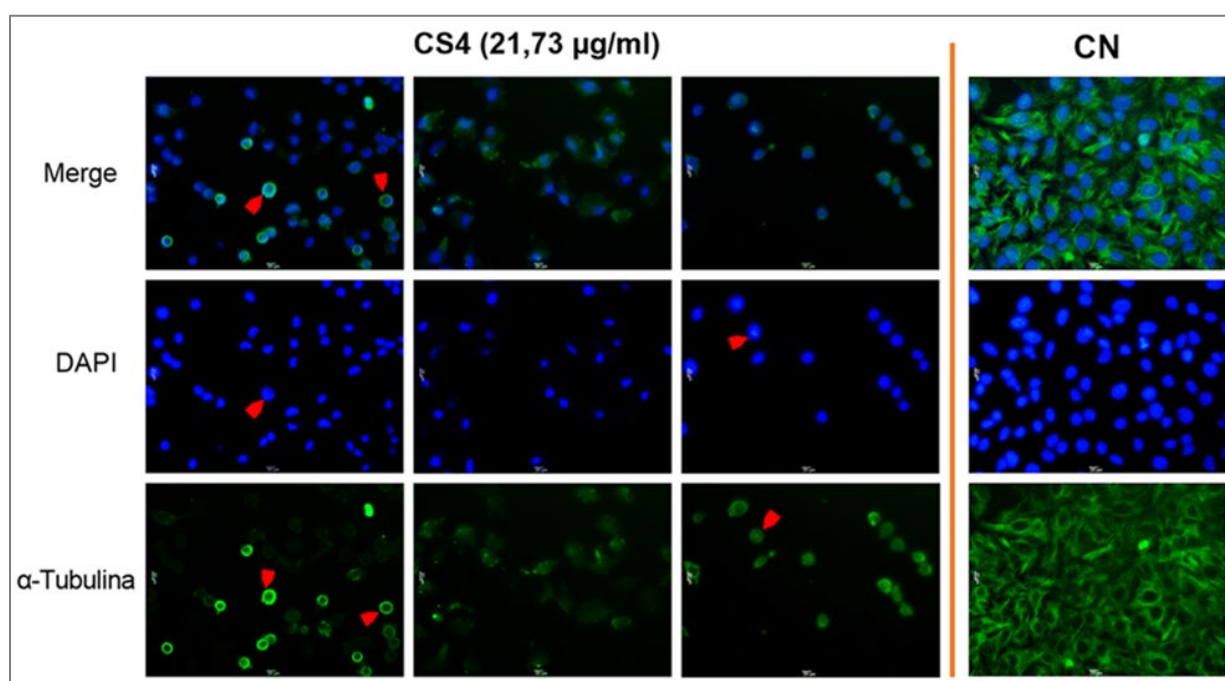


Figura 3. Micrografía de inmunofluorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CS4 a la concentración encontrada con el IC50, así mismo su control negativo (CN). Se señala con flechas rojas los aparentes síntomas de apoptosis.

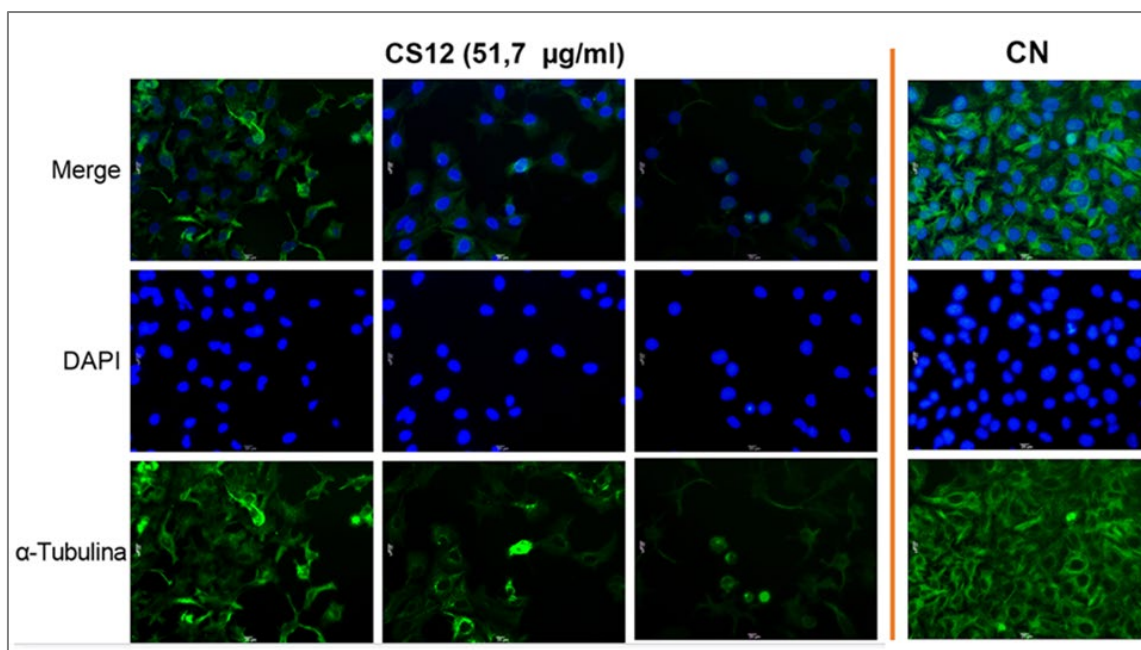


Figura 4. Micrografía de inmunofluorescencia, mostrando el efecto en núcleo (DAPI-AZUL) y en los microtúbulos (α -tubulina-Verde) sobre células A549 después de 24h de incubación con el compuesto CS12 a la concentración encontrada con el IC50, así mismo su control negativo (CN).

Las células A549 tratadas con los compuestos CS1 y CS4 (Figura 2 – 3) marcadas α -tubulina, se observan cambios en los microtúbulos que comprometen el tamaño del citoplasma como se señala en la microscopia (Flecha roja) en comparación con el control negativo (CN). Con respecto las células marcadas con DAPI se evidencia cambio en el tamaño y forma de los núcleos, estos se ven afectados por el tratamiento con CS1 y CS4, siendo más pequeños en comparación con el CN. Con respecto a las células tratadas con el compuesto CS12 (Figura 4) en comparación con CS1 y CS4, fue menor el daño causado por la exposición a este compuesto, se observan cambios en la morfología y el tamaño de los núcleos en comparación con el CN. Este tipo de cambios pueden ser asociados a apoptosis dado que los síntomas observables están definidos como: la contracción citoplasmática que puede explicar por qué hay un cambio en el tamaño del citoplasma, y condensación de la cromatina que a su vez nos daría una explicación de por qué el núcleo cambia de tamaño y forma (Galluzzi *et al.*, 2018). Sin embargo, no en este caso no se puede afirmar que los cambios en la morfología asociados al tratamiento con CS1, CS4 y CS12 son atribuidos a apoptosis, ya que el “Nomenclature Committee on Cell Death” (NCCD) aclara que, para definir apoptosis, se necesita una base genética, bioquímica, farmacología y funcional.

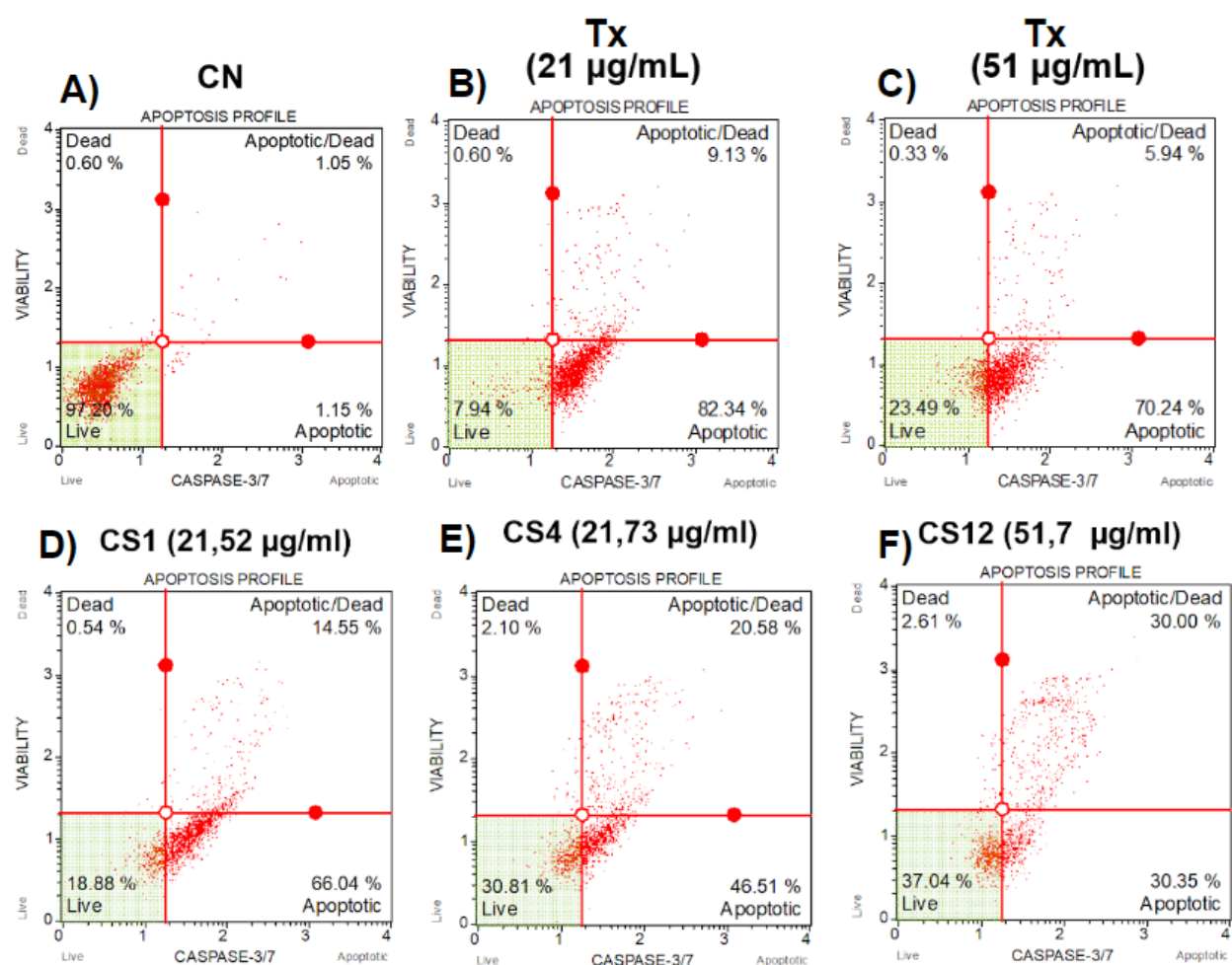
Los cambios morfológicos y el modo de muerte dependen de varios factores como el tipo de células y los estímulos a los que son sometidas (Ziegler & Groscurth 2004). Por esto, cada uno de los compuestos va a generar una respuesta diferente, dependiendo de la estructura molecular propia. Tanto CS1 y CS4 han demostrado

tener similitud en la actividad sobre las células A549, esto podría estar relacionado con la similitud que tienen la estructura (Tabla 2). Estas comparten dos hidroxilos en posición 1-3 en el anillo B, donde la única diferencia es que CS4 en este caso posee un hidroxilo en el anillo A. Go y colaboradores (2005) sugieren que la presencia de sustituyentes oxigenados en la posición 2' es una de las características favorables para la citotoxicidad. En caso CS1, CS2 y CS12 comparten esa característica, CS4 posee una mayor cantidad de grupos hidroxilos, teniendo dos en el anillo B y uno adicional en el anillo A, lo cual se puede relacionar con su actividad dentro de las células A549. Se ha evidenciado en líneas de cáncer que la cantidad y posición de hidroxilos en las chaconas se relaciona con su actividad citotóxica (Kikuchi *et al.*, 2018). Por ende, se requieren más investigaciones que permitan determinar si esta premisa es correcta en todos los compuestos que tengan esta característica.

1.3. Citometría de flujo marcadas con Casp-3/7 + 7-AAD

Se realizó el análisis cuantitativo de células vivas, apoptosis temprana – tardía y muerte celular a partir de citometría de flujo marcada con Casp 3/7+AAD, se evaluaron las concentraciones de inhibición dadas por el IC50 de los compuestos CS1, CS4 y CS12

Las caspasas son proteínas que participan activamente en el proceso de muerte celular programada (Apoptosis), en respuesta a señales proapoptóticas (Riedl y Shi, 2004). Existen dos tipos de caspasas unas que se encargan del inicio de la cascada de señalización para iniciar apoptosis, y otras que son conocidas como caspasas efectoras, que su papel radica en la descomposición celular mediante la escisión de proteínas estructurales (Caspasas-3 y -7) (Alcolea *et al.*, 2019; Scabini *et al.*, 2011). Por lo que la activación de la caspasa -3/7 es un muy buen marcador para estudiar la apoptosis (Kitagawa *et al.*, 2016).



Grafica 3. Detección de Casp-3/7+ AAD por citometría de flujo para la identificación de apoptosis en la línea celular A549 Con el control negativo (A), controles positivos con la exposición de las células con Taxol(B-C) y la exposición a CS1 (D),CS4 (E) y CS12 (F)durante 24h al IC50.

Como se observa en la citometría de flujo del control negativo (CN) (Grafica 3-A.) en el cuadrante inferior izquierdo corresponde a células vivas que no fueron detectadas por los marcadores (97,20%), en el cuadrante inferior derecho corresponden a células marcadas con Muse® Casp-3/7 las cuales están en apoptosis temprana (1,15%), el cuadrante superior derecho marcadas con Muse® Casp 3/7 y 7-AAD corresponde a células apoptóticas muertas (1,05%) y el cuadrante superior izquierdo presenta la células únicamente con 7-AAD, correspondiente a células muertas (0,60%). Se evidencia que en las células que no fueron tratadas no hubo % importante en apoptosis temprana – tardía y muerte celular, el % de células vivas fue el más relevante.

La citometría de flujo del control positivo Taxol (Tx) con 2 concentraciones 21 µg/mL y 51 µg/mL (Grafica 3 B y C .) en el cuadrante inferior izquierdo corresponde a células vivas que no fueron detectadas por los marcadores (7,94% y 23,49%), el cuadrante

inferior derecho corresponden a células marcadas con Muse® Casp-3/7 las cuales están en apoptosis temprana (83,34% y 70,24%), el cuadrante superior derecho marcadas con Muse® Casp 3/7 y 7-AAD corresponde a células apoptóticas muertas (9,13% y 5,94%) y el cuadrante superior izquierdo presenta la células únicamente con 7-AAD, correspondiente a células muertas (0,60% y 0,33%). Se evidencia que en las células que fueron tratadas Tx en las concentraciones 21 µg/mL y 51 µg/mL, presentaron un % importante de apoptosis temprana, mayor en la concentración 21 µg/mL con menor % de células vivas.

Como se observa en la citometría de flujo con el tratamiento CS1 (21,52 µg/mL) (Grafica 3-D) el cuadrante inferior izquierdo corresponde a células vivas que no fueron detectadas por los marcadores (18,88%), en el cuadrante inferior derecho corresponden a células marcadas con Muse® Casp-3/7 las cuales están en apoptosis temprana (66,04%), el cuadrante superior derecho marcadas con Muse® Casp 3/7 y 7-AAD corresponde a células apoptóticas muertas (14,55%) y el cuadrante superior izquierdo presenta la células únicamente con 7-AAD, correspondiente a células muertas (0,54%). En comparación con CN, se evidencia un aumento en el % de apoptosis temprana, y menor al % presentado con el control positivo (Tx). Lo que demuestra que CS1 tiene actividad apoptótica sobre las células A549 tratadas.

La citometría de flujo con el tratamiento CS4 (21,73 µg/mL) (Grafica 3-E.) el cuadrante inferior izquierdo corresponde a células vivas que no fueron detectadas por los marcadores (30,81%), en el cuadrante inferior derecho corresponden a células marcadas con Muse® Casp-3/7 las cuales están en apoptosis temprana (46,51%), el cuadrante superior derecho marcadas con Muse® Casp 3/7 y 7-AAD corresponde a células apoptóticas muertas (20,58%) y el cuadrante superior izquierdo presenta la células únicamente con 7-AAD, correspondiente a células muertas (2,10%). En comparación con CN, se evidencia un aumento en el % de apoptosis temprana y tardía, y menor al % presentado con el control positivo (Tx) y a las células tratadas con CS1. Lo que demuestra que CS4 tiene actividad apoptótica sobre las células A549 tratadas.

La citometría de flujo con el tratamiento CS12 (51,7 µg/mL) (Grafica 3-F.) el cuadrante inferior izquierdo corresponde a células vivas que no fueron detectadas por los marcadores (37,81%), en el cuadrante inferior derecho corresponden a células marcadas con Muse® Casp-3/7 las cuales están en apoptosis temprana (30,35%), el cuadrante superior derecho marcadas con Muse® Casp 3/7 y 7-AAD corresponde a células apoptóticas muertas (30,0%) y el cuadrante superior izquierdo presenta la células únicamente con 7-AAD, correspondiente a células muertas (2,61%). En comparación con CN, se evidencia un aumento en el % de apoptosis temprana y tardía, y menor al % presentado con el control positivo (Tx) y a las células tratadas con CS1 y CS4. Lo que demuestra que CS4 tiene actividad apoptótica tardía y temprana, pero el % de células vivas fue mayor que lo relacionado con muerte celular.

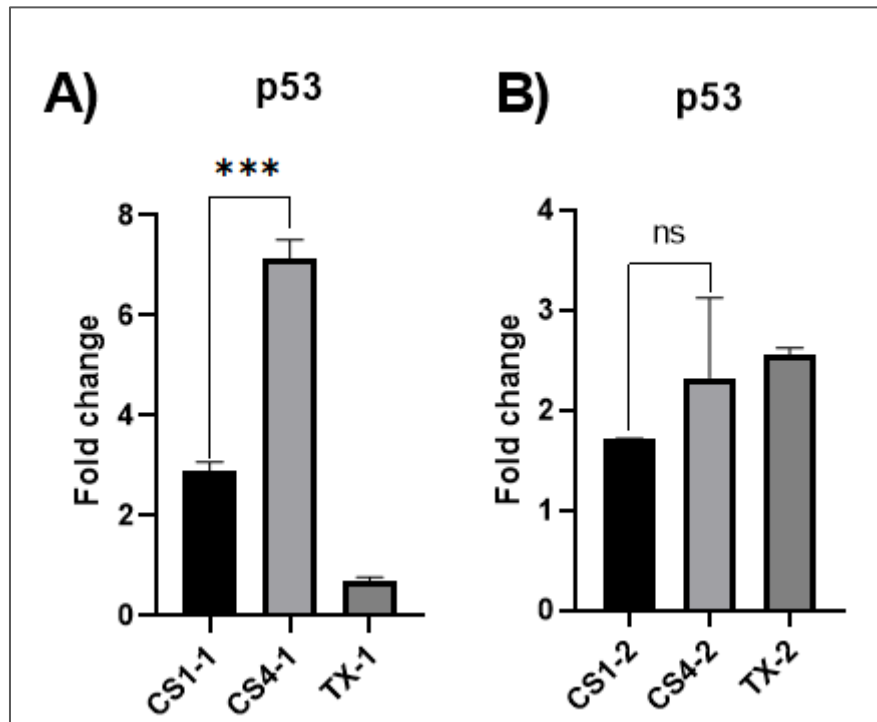
En este estudio se demuestra como las chalconas CS1, CS4 y CS12 inducen la apoptosis en la vía dependiente de caspasas 3 y 7. Estas son ejecutoras de apoptosis, ya que coordinan la escisión de proteínas estructurales y de reparación (Slee *et al.*, 2001). La caspasa 3 juega un papel importante en la apoptosis, debido a que participa en la degradación de ADN, formación de ampollas en la membrana plasmática, proteólisis de sustratos y la condensación nuclear presentada en las Figuras 5-8 (Fan *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2008).

La caspasa 3 y 7 tiene un rol importante en la apoptosis, debido a que esta participa en la degradación del ADN, la condensación nuclear que vimos en las figuras..., la formación de ampollas en la membrana plasmática y la proteólisis de sustratos de algunas caspasas (Fan *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2008). En este estudio se demostró que CS1 y CS4 y CS12 participan en la activación mediada por las caspasas 3 y 7, participando en la apoptosis temprana y tardía. La actividad anti proliferativa de las chalconas se relaciona con la detención del ciclo celular y la inducción apoptótica (Michjalkova *et al.*, 2021). Aunque las chalconas han demostrado detener el ciclo celular en varias fases, se ha demostrado que en su mayoría lo hacen la fase G2/M, lo que subsecuentemente provocará la apoptosis (Mirzaei *et al.*, 2017). Por lo general, la actividad apoptótica que tienen este tipo de compuestos se relaciona con el estrés oxidativo que provoca a la apoptosis, es decir apoptosis intrínseca o mediada por la mitocondria (Szliszka *et al.*, 2009). Sin embargo, no se puede definir cómo funciona la cascada de señalización con los ensayos realizados, que provoca la activación de estas proteínas, por lo que se requiere más investigación para dilucidar la Bioquímica estos compuestos en la cascada de señalización.

1.4. Análisis de expresión genética

Se realizó el análisis de expresión a partir de RT-qPCR de genes proapoptóticos (P53, BAX, BIM y CASP) con el método ΔC_t , inducidos por los compuestos CS1 (IC₅₀= 21,52 $\mu\text{g/mL}$) y CS4 (IC₅₀= 21,73 $\mu\text{g/mL}$).

1.4.1. Análisis de expresión TP53



Gráfica 4. Expresión del gen *TP53* en células A549 expuestas a los compuestos CS1, CS4 y TX (Control positivo-CP) a concentraciones de 20 µg/mL (A) y 40 µg/mL (B). Diferencias significativas entre tratamientos: p value < 0.1234 (no significativo - ns); p value < 0,0002(***)

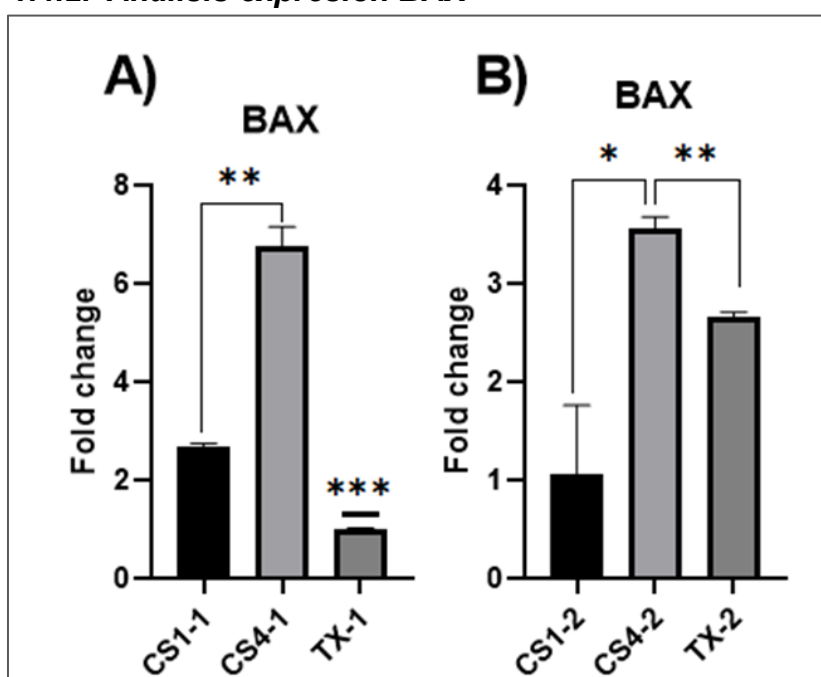
La expresión del gen *TP53* en células A549 (Gráfica 4.) expuestas a CS4, CS1 y Taxol (Tx). En la gráfica 6 (A) se presenta la expresión de *Tp53* inducida por CS1 con Fold change (>2), CS4 (> 6) y Tx (< 2). En la gráfica 4 (B) se utilizó el doble de la concentración de los compuestos, se muestra menor expresión del gen con los compuestos CS1 (< 2) y CS2 (< 3) y el aumento en Tx (> 2). Por ende, CS4 indujo la expresión del gen en comparación con el CS1 (P value= 0,0004) y Tx (P value= 0,0008) en la concentración inicial, pero con el doble de la concentración, disminuyó la expresión en CS4 y aumento en control positivo Tx.

El gen *TP53* codifica a la proteína p53, es un gen que participa como supresor tumoral y juega un papel importante en diferentes procesos del ciclo celular, tales como la regulación genética y la apoptosis (López *et al.*, 2001). La pérdida de función o mutación de este gen provoca la pérdida de respuesta de esta regulación génica, por lo que se desencadena una proliferación descontrolada de las células, llevando a la aparición de neoplasias, que por consecuencia pueden llevar a la aparición de cáncer (Muller y Vousden, 2013). En células de cáncer, por lo general los niveles de expresión de *Tp53* son bajos o nulos, en el caso de este estudio el control negativo dio un valor de expresión de 0. Cuando las células se enfrentan a condiciones de estrés ambiental como puede ser la exposición a las chalconas, *Tp53* se activa, lo

que conlleva a la acumulación de esta proteína en el núcleo, desencadenando la apoptosis (Moreira *et al.*, 2021).

CS4 en este estudio mostró un aumento de la expresión de *Tp53* mayor en comparación con CS1, lo que indica que la actividad proapoptótica de estos dos compuestos, aunque en diferente medida, están mediadas por *Tp53* en células A549 a concentraciones de IC50. En un estudio realizado por Hsu y colaboradores (2004), se observó que 4,2',4'-trihydroxychalcone (CS4) bloqueaba la progresión del ciclo celular en fase G0/G1 mediante un aumento de la expresión de *Tp53*, lo que resultaba en la muerte celular por apoptosis. En varios reportes se ha evidenciado que la actividad de las chalconas sobre la actividad de *Tp53* está mediada por los hidroxilos, si observamos que CS4 provocó mayor expresión de gen al tener mayor cantidad de hidroxilos que CS1 (Moreira y vousden, 2021). En cuanto a CS1 son pocos los estudios que relacionan la actividad de este compuesto con la actividad de *Tp53*, pero este al ser un compuesto con actividad citotóxica y genotóxica, puede llegar a provocar apoptosis mediada por el gen al aumentar las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (Mohamed *et al.*, 2020).

1.4.2. Análisis expresión BAX



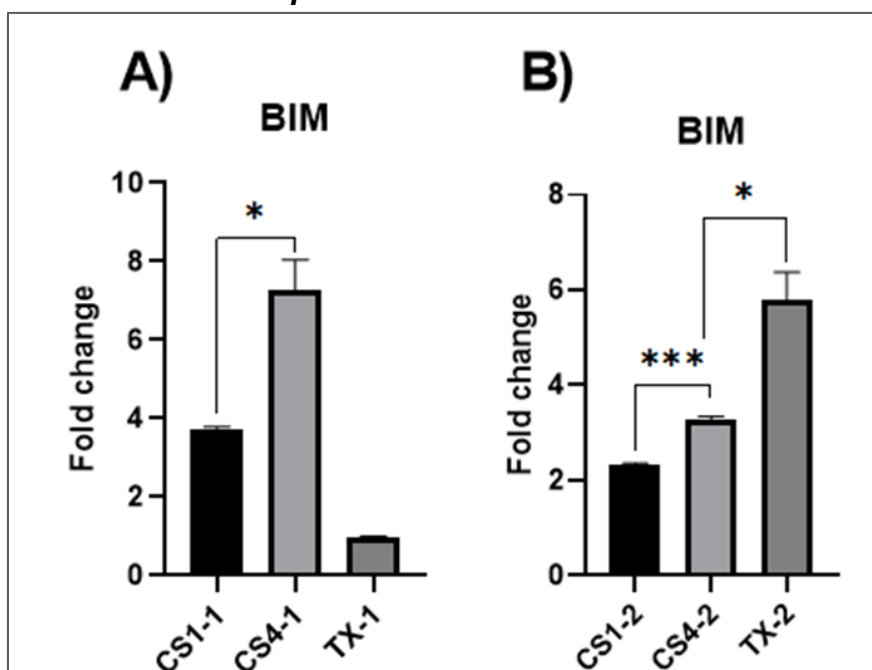
Grafica 5. Expresión del gen BAX en células A549 expuestas a los compuestos CS1, CS4 y TX (Control positivo-CP) a concentraciones de 20 µg/mL (A) y 40 µg/mL (B). Diferencias significativas entre tratamientos: p value < 0,0332 (*); p value < 0,0021 (**); p value < 0,0002(***)

La expresión del gen *BAX* en células A549 (Grafica 5) expuestas a CS1, CS4 y Taxol (Tx). En la gráfica 5 se presenta la expresión de *BAX* inducida por CS1 con Fold change (< 3), CS4 (> 6) y Tx (< 2). En la gráfica 5 se utilizó el doble de la concentración

de los compuestos, la expresión de *BAX* fue menor con los compuestos CS1 (< 1) y CS2 (< 4), y aumento en Tx (> 2). Por ende, CS4 indujo la expresión del gen en comparación con CS1 (P value= 0,0142) y Tx (P value= 0,0048) a partir de la concentración inicial, sin embargo, con el doble de la concentración disminuyó la expresión en CS1 y CS4 y aumento en control positivo Tx

El gen *BAX* pertenece a la familia de genes que da origen a proteínas proapoptóticas (Bcl-2), que hacen parte de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis, participa en la activación de caspasas consecuente con la muerte celular (Martino y youle, 2011). El gen *BAX* da origen a la proteína BAX-alfa, esta juega un papel importante en la regulación de apoptosis intrínseca (Apte *et al.*, 1995). La regulación de este gen esta mediada por Tp53, por ende, la expresión de ambos está estrechamente relacionada (Chipuk *et al.*, 2004). La expresión de este gen en células A549 tras la exposición a CS1 y CS4, puede ser generada por la producción de ROS a nivel intracelular, estimulando la apoptosis intrínseca. Diferentes estudios han demostrado que diferentes chalconas están relacionadas con la regulación positiva de proteínas de la familia Bcl-2 dependientes de *BAX* (Kello *et al.*, 2016; Takac *et al.*, 2018; Carpenter y Brady, 2023).

1.4.3. Análisis expresión *BIM*



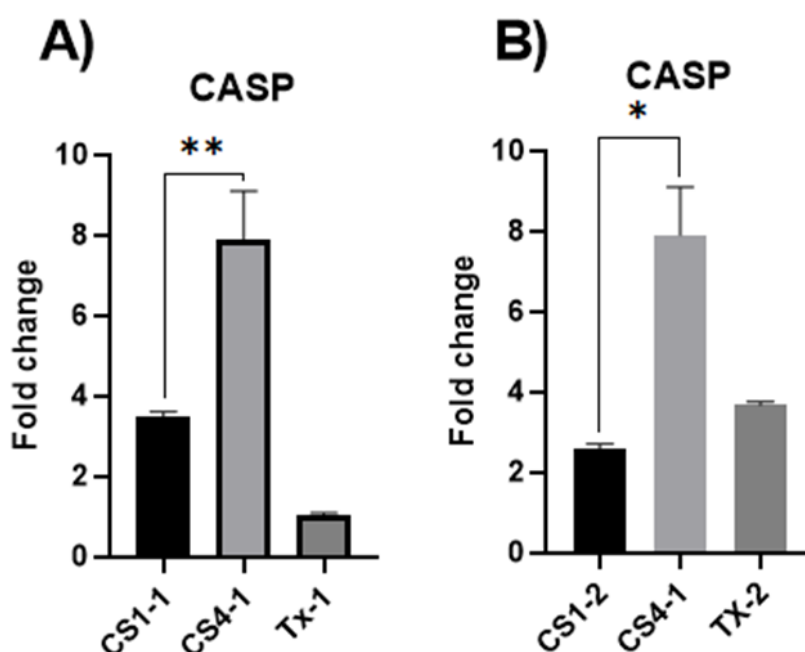
Grafica 6. Expresión del gen *BIM* en células A549 expuestas a los compuestos CS1, CS4 y TX (Control positivo-CP) a concentraciones de 20 µg/mL (A) y 40 µg/mL (B). Diferencias significativas entre tratamientos: p value < 0,0332 (*); p value < 0,0002(***)

La expresión del gen *BIM* en células A549 (Grafica 6) expuestas a CS1, CS4 y Taxol (Tx). En la gráfica 6 se presenta la expresión de *BIM* inducida por CS1 con Fold change (< 4), CS4 (< 8) y Tx (< 2). En la gráfica 6 se utilizó el doble de la concentración

de los compuestos, la expresión de *BIM* fue menor en los compuestos CS1 (> 2) y CS4 (< 4), y aumento la expresión en TX (> 6). Por ende, CS4 indujo la expresión del gen en comparación con CS1 (P value= 0,0026) y Tx (P value= 0,0015) a partir de la concentración inicial, sin embargo, con el doble de la concentración disminuyo la expresión en CS1 y CS4 y aumento en control positivo Tx.

BIM codifica a la proteína Bim, perteneciente a la familia Bcl-2 con motivo BH3, que se une con bastante afinidad a cualquier proteína de la familia Bcl-2, de forma que su participación en los procesos de apoptosis es bastante amplia. BIM fue uno de los genes seleccionados para el estudio por su rol dentro de la apoptosis intrínseca, la expresión de este gen se ve inducida por chalconas (Waber *et al.*, 2008; Faber *et al.*, 2012). Los compuestos evaluados CS1 y CS4 activan vías apoptóticas y se relacionan con el aumento en la expresión de *BIM* en células de cáncer de pulmón A549 por su potencial citotóxico.

1.4.4. Análisis de expresión CAS 3



Grafica 7. Expresión del gen *BAX* en células A549 expuestas a los compuestos CS1, CS4 y TX (Control positivo-CP) a concentraciones de 20 µg/mL (A) y 40 µg/mL (B). Diferencias significativas entre tratamientos: p value < 0,0332 (*); p value < 0,0021 (**).

La expresión del gen *CASP3* en células A549 (Grafica 7) expuestas a CS1, CS4 y Taxol (Tx). En la gráfica 7 se presenta la expresión de *CASP3* inducida por CS1 con Fold change (< 4), CS4 (< 8) y Tx (< 2). En la gráfica 7 se utilizó el doble de la concentración de los compuestos, la expresión de *CASP3* fue menor en los compuestos CS1 (< 3), se mantuvo en CS4 (< 8) y aumento en Tx (< 4). Por ende, CS4 indujo la expresión del gen en comparación con CS1 (P value= 0,0223) y Tx (P

value= 0,0100) en el tratamiento con la concentración inicial. Sin embargo, con el doble de la concentración la expresión de CS1 bajo, pero manteniéndose mayor a 2, CS4 se mantuvo en rangos similares y aumento en el control positivo Tx.

El gen CASP3 codifica a la proteína caspasa-3, esta participa en la vía intrínseca de la apoptosis conocida por pertenecer al grupo de las caspasas efectoras. Esto sugiere que las chalconas CS1 y CS4 activan las rutas apoptóticas relacionadas con apoptosis intrínseca. No hay estudios que relacionen CS4 o CS1 con la actividad de las caspasas, tampoco sobre la interacción a nivel celular. Pero es evidente la inducción que hacen sobre CASP3, se requieren más estudios para determinar la relación con la vía apoptótica, más allá de la citotoxicidad.

3. CONCLUSIONES

- El compuesto CS4 mostro los mejores valores de citotoxicidad teniendo los menores valores de IC50 y mayor valor de índice de selectividad, seguido por CS1 y CS12.
- Los compuestos CS4 y CS1 indujeron cambios en la morfología celular en la línea celular A549 que podrían estar relacionados con la apoptosis.
- El compuesto CS1 provoco mayor apoptosis en células A549, seguido por CS4 y CS12
- El compuesto CS4 y CS1 indujeron la expresión de los cuatro genes proapoptoticos (TP53, BAX, BIM y CASP3) en células A549, siendo CS4 el que presentó mayores valores de expresión en comparación con CS1.

4. RECOMENDACIONES

- Profundizar en las dianas moleculares con las que interactuaran las 3 chalconas, y explorar como estas desencadenan mecanismos apoptóticos en las células A549.
- Diseñar una estrategia que permita solubilizar las chalconas para permitir su entrada a las células, a fin de poder evaluar su actividad con mayor efectividad.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Afrin, S., Giampieri, F., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, TY, Cianciosi, D., Reboledo-Rodriguez, P., Battino, M. (2020). Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnology Advances* 38.
2. Apte, S. S., Mattei, M. G., & Olsen, B. R. (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13. 3–q13. 4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX δ . *Genomics*, 26(3), 592-594.
2. Alcolea, V., Karelia, D. N., Pandey, M. K., Plano, D., Singh, P., Palop, J. A., ... & Sharma, A. K. (2019). Identification of a novel quinoxaline-isoselenourea

- targeting the STAT3 pathway as a potential melanoma therapeutic. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 521.
3. Agbor, G. A., Moubegna, P., Oluwasola, E. O., Nwosu, L. U., Njoku, R. C., Kanu, S., ... & Abudei, F. A. (2011). Antioxidant capacity of some plants foods and beverages consumed in the eastern region of Nigeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(4).
 4. Amos, C. I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I. P., Gu, J., Eisen, T., ... & Houlston, R. S. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25. 1. *Nature genetics*, 40(5), 616-622.
 5. Alonso, A. R., Pons, M. A. C., Bravo, M. L. S., Jiménez, P. C. L., & de Oncología Radioterápica, S. (2004). *Cáncer de pulmón. Biocáncer*, 1.
 6. Abu, N., Ho, W. Y., Yeap, S. K., Akhtar, M. N., Abdullah, M. P., Omar, A. R., & Alitheen, N. B. (2013). The flavokawains: uprising medicinal chalcones. *Cancer Cell International*, 13(1), 1-7.
 7. Abu, N., Akhtar, M. N., Yeap, S. K., Lim, K. L., Ho, W. Y., Zulfadli, A. J., ... & Alitheen, N. B. (2014). Flavokawain A induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and inhibits the metastatic process in vitro. *PLoS One*, 9(10), e105244.
 8. Ahmed, F. F., Abd El-Hafeez, A. A., Abbas, S. H., Abdelhamid, D., & Abdel-Aziz, M. (2018). New 1, 2, 4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells. *European journal of medicinal chemistry*, 151, 705-722.
 9. Alemán, F. H. (2011). Actualidades en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón. *Rev Med Hondur*, 79(1).
 10. Bach, P. B., Jett, J. R., Pastorino, U., Tockman, M. S., Swensen, S. J., & Begg, C. B. (2007). Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *Jama*, 297(9), 953-961.
 11. Batovska, D. I., & Todorova, I. T. (2010). Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current clinical pharmacology*, 5(1), 1-29.
 12. Barrio, P. R., & Mejía, Y. A. (2014). *Cáncer de pulmón. Medicina-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(67), 3983-3994.
 13. Benhamou, S., Lee, W. J., Alexandrie, A. K., Boffetta, P., Bouchardy, C., Butkiewicz, D., & Taioli, E. (2002). Meta-and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*, 23(8), 1343-1350.
 14. Cardona, A. F., Carranza, H., Vargas, C. A., Otero, J. M., Reveiz, L., Reguart, N., ... & Castro, C. (2010). Supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en cuatro instituciones de Colombia. *Revista Venezolana de Oncología*, 22(1), 66-83.
 15. Carretero, J. (2005). Carcinógenos y origen del cáncer de pulmón. *CÁNCER DE PULMÓN*, 40.
 16. Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates

- mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303(5660), 1010-1014.
17. Carpenter, R., & Brady, M. F. (2023). BAX gene. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
 18. Cho, I. A., Kang, K. R., Kim, S. G., Kim, D. K., Kim, C. S., Lee, S. Y., ... & Kim, J. S. (2017). Anti-tumor effect of licochalcone-E is mediated by caspase-dependent apoptosis through extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways in KB cancer cells. *Oral Biology Research*, 41(4), 191-200.
 19. Cryer, A. M., & Thorley, A. J. (2019). Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 198, 189-205.
 20. Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1614.
 21. Gmeiner, W. H., & Ghosh, S. (2014). Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnology reviews*, 3(2), 111-122.
 22. Casado, D., Bellido, L., del Barco, E., Cigarral, B., Escalera, E., Claros, J., ... & Cruz, J. J. (2021). Inmunoterapia en el cáncer de pulmón. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(25), 1424-1428.
 23. Chen, J. J., Lee, H. H., Duh, C. Y., & Chen, I. S. (2005). Cytotoxic chalcones and flavonoids from the leaves of *Muntingia calabura*. *Planta medica*, 71(10), 970-973.
 24. Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., & Rodríguez-Landa, J. F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*, 15(2), 123-136.
 25. Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C. A., Hadjipavlou-Litina, D., & Kefalas, P. (2009). Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(23), 8073-8085.
 26. Ducki, S. (2007). The development of chalcones as promising anticancer agents. *IDrugs*, 10(1), 42.
 27. Doti, N., Reuther, C., Scognamiglio, P. L., Dolga, A. M., Plesnila, N., Ruvo, M., & Culmsee, C. (2014). Inhibition of the AIF/CypA complex protects against intrinsic death pathways induced by oxidative stress. *Cell death & disease*, 5(1), e993-e993.
 28. Delgado, C., Mendez-Callejas, G., & Celis, C. (2021). Caryophyllene Oxide, the Active Compound Isolated from Leaves of *Hymenaea courbaril* L.(Fabaceae) with Antiproliferative and Apoptotic Effects on PC-3 Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Line. *Molecules*, 26(20), 6142.
 29. D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
 30. Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial biotechnology*, 4(6), 687-699.

31. de Cos Escuin, J. S. (2017). Nueva inmunoterapia y cáncer de pulmón. *Archivos de Bronconeumología*, 53(12), 682-687.
32. Ethiraj, K. R., Aranjani, J. M., & Khan, F. R. N. (2013). Synthesis of Methoxy-substituted Chalcones and in vitro Evaluation of their Anticancer Potential. *Chemical biology & drug design*, 82(6), 732-742.
33. Erekat, N. S. (2022). Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clinical Anatomy*, 35(1), 65-78.
34. Eljaszewicz, A., Wiese, M., Helmin-Basa, A., Jankowski, M., Gackowska, L., Kubiszewska, I., ... & Zegarski, W. (2013). Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators of inflammation*, 2013.
35. Ferrero, M. B., Mezquita, M. H., & García, M. T. (2003). Manual de prevención y tratamiento del tabaquismo. Ergon.
36. Fabbri, M., & Calin, G. A. (2010). Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Advances in genetics*, 70, 87-99.
37. Faber, A. C., Ebi, H., Costa, C., & Engelman, J. A. (2012). Apoptosis in targeted therapy responses: the role of BIM. *Advances in pharmacology*, 65, 519-542.
38. Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.
39. Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11), 719-727.
40. Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597-3604.
41. Fu, Y., Hsieh, T. C., Guo, J., Kunicki, J., Lee, M. Y., Darzynkiewicz, Z., & Wu, J. M. (2004). Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(1), 263-270.
42. Firoozpour, L., Edraki, N., Nakhjiri, M., Emami, S., Safavi, M., Ardestani, S. K., ... & Foroumadi, A. (2012). Cytotoxic activity evaluation and QSAR study of chromene-based chalcones. *Archives of pharmacal research*, 35(12), 2117-2125.
43. Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.
44. Franceschelli, S., Pesce, M., Vinciguerra, I., Ferrone, A., Riccioni, G., Antonia, P., ... & Speranza, L. (2011). Licocalchone-C extracted from *Glycyrrhiza glabra* inhibits lipopolysaccharide-interferon- γ inflammation by improving antioxidant conditions and regulating inducible nitric oxide synthase expression. *Molecules*, 16(7), 5720-5734.
45. Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.

46. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.
47. Gazdar, A. F., Gao, B., & Minna, J. D. (2010). Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science?. *Lung cancer*, 68(3), 309-318.
48. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... & Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
49. Gazdar, A. F., Girard, L., Lockwood, W. W., Lam, W. L., & Minna, J. D. (2010). Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17), 1310-1321.
50. Go, M. L., Wu, X., & Liu, X. L. (2005). Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Current medicinal chemistry*, 12(4), 483-499.
51. Geiger, T. R., & Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(2), 293-308.
52. García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 351-364.
53. Houlston, R. S. (2000). CYP1A1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Pharmacogenetics and Genomics*, 10(2), 105-114.
54. Hsu, Y. L., Kuo, P. L., Chiang, L. C., & Lin, C. C. (2004). Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(7), 414-418.
55. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
56. Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., ... & Brennan, P. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*, 452(7187), 633-637.
57. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
58. Hosein Farzaei, M., Bahramsoltani, R., & Rahimi, R. (2016). Phytochemicals as adjunctive with conventional anticancer therapies. *Current pharmaceutical design*, 22(27), 4201-4218.
59. Hernández, M. D. L. A. R., & Hernández-Menéndez, M. (2001). Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol*, 17(1), 65-71.
60. Hatziapostolou, M., & Iliopoulos, D. (2011). Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(10), 1681-1702.
61. Heath, J. R., & Davis, M. E. (2008). Nanotechnology and cancer. *Annual review of medicine*, 59, 251.
62. Insuasty-Obando, B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 234-243.

63. Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205.
64. Jiménez Márquez, A. C., & Ochoa, J. S. (2021). Cáncer de pulmón y consumo de tabaco en Colombia.
65. Katsori, A. M., & Hadjipavlou-Litina, D. (2011). Recent progress in therapeutic applications of chalcones. *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(10), 1575-1596.
66. Kwak, A. W., Choi, J. S., Liu, K., Lee, M. H., Jeon, Y. J., Cho, S. S., ... & Shim, J. H. (2020). Licochalcone C induces cell cycle G1 arrest and apoptosis in human esophageal squamous carcinoma cells by activation of the ROS/MAPK signaling pathway. *Journal of Chemotherapy*, 32(3), 132-143.
67. K Sahu, N., S Balbhadra, S., Choudhary, J., & V Kohli, D. (2012). Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Current medicinal chemistry*, 19(2), 209-225.
68. Kasinski, A. L., & Slack, F. J. (2011). MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(12), 849-864.
69. Kello, M., Drutovic, D., Pilatova, M. B., Tischlerova, V., Perjesi, P., & Mojzis, J. (2016). Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in the G2/M phase and induce apoptosis. *Life sciences*, 150, 32-38.
70. Kitagawa, N., Morikawa, T., Motai, C., Ninomiya, K., Okugawa, S., Nishida, A., ... & Muraoka, O. (2016). The antiproliferative effect of chakasaponins I and II, floratheasaponin A, and epigallocatechin 3-O-gallate isolated from *Camellia sinensis* on human digestive tract carcinoma cell lines. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1979.
71. Kikuchi, H., Kuribayashi, F., & Madhyastha, H. (2018). Positions and numbers of hydroxyl groups in hydroxychalcone derivatives are involved in cytotoxicity against human monoblastic U937 cells. *Fundamental Toxicological Sciences*, 5(4), 149-152.
72. Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*, 13(3), 031001.
73. Kuo, Y. F., Su, Y. Z., Tseng, Y. H., Wang, S. Y., Wang, H. M., & Chueh, P. J. (2010). Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 214-226.
74. Lou, C., Wang, M., Yang, G., Cai, H., Li, Y., Zhao, F., ... Cai, B. (2009). Preliminary studies on anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxychalcone isolated from *Herba Oxytropis* in human gastric cancer MGC-803 cells. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 906–910. doi:10.1016/j.tiv.2009.05.002
75. Levine, A. J. (2019). Targeting therapies for the p53 protein in cancer treatments. *Annual Review of Cancer Biology*, 3, 21-34
76. Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cáncer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.

77. López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M., & de Pancorbo, M. M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta médica de Bilbao*, 98(1), 21-27.
78. Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter Jr, G. A., Booth, C. J., Mehal, W. Z., ... & Flavell, R. A. (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311(5762), 847-851.
79. Li, J., Zheng, L., Yan, M., Wu, J., Liu, Y., Tian, X., ... & Wang, R. (2020). Activity and mechanism of flavokawain A in inhibiting permeability P-glycoprotein expression in paclitaxel resistance of lung cancer. *Oncology letters*, 19(1), 379-387.
80. Li, S., Xu, S., Liang, X., Xue, Y., Mei, J., Ma, Y., ... & Liu, Y. (2021). Nanotechnology: breaking the current treatment limits of lung cancer. *Advanced Healthcare Materials*, 10(12), 2100078.
81. Viñolas, N., & Carcereny, E. (2007). El cáncer de pulmón. Libro de la salud del Hospital Clínic de Barcelona y la fundación BBVA. 4ª ed. Bilbao: Editorial Nerea, 305-314.
82. Mancina, E. G. (2021). Investigación de la selectividad anticancerosa de nuevos compuestos y estrategias contra el cáncer (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
83. Mahapatra, D. K., Bharti, S. K., & Asati, V. (2015). Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *European journal of medicinal chemistry*, 98, 69-114.
84. Martínez Fera, F., Matos Pineda, L. E., Acosta Brooks, S. C., & Cobián Caballero, C. O. (2016). Características clínicas y evolutivas de pacientes con cáncer pulmonar de células pequeñas. *Medisan*, 20(1), 42-48.
85. Moreno-Jiménez, M., & Aristu, J. (2007). Radioterapia combinada con quimioterapia en el tratamiento del cáncer de pulmón. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 13-33.
86. Morantes, S. J., Perdomo, S., Carrillo, E. F., & Aristizábal, F. (2013). Caracterización del perfil quimiosensibilidad y del estado de ampliación génica de un panel de líneas celulares de origen tumoral pulmonar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 42-51.
87. Matos, M. J., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E., & Santana, L. (2015). Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*, 25(3), 351-366.
88. Moreira, J., Almeida, J., Saraiva, L., Cidade, H., & Pinto, M. (2021). Chalcones as promising antitumor agents by targeting the p53 pathway: An overview and new insights in drug-likeness. *Molecules*, 26(12), 3737.
89. Michalkova, R., Mirossay, L., Gazdova, M., Kello, M., & Mojzis, J. (2021). Molecular mechanisms of antiproliferative effects of natural chalcones. *Cancers*, 13(11), 2730.
90. Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology*, 15(1), 2-8.

91. Moreira, J., Almeida, J., Saraiva, L., Cidade, H., & Pinto, M. (2021). Chalcones as promising antitumor agents by targeting the p53 pathway: An overview and new insights in drug-likeness. *Molecules*, 26(12), 3737.
92. Michalkova, R., Mirossay, L., Gazdova, M., Kello, M., & Mojzis, J. (2021). Molecular mechanisms of antiproliferative effects of natural chalcones. *Cancers*, 13(11), 2730.
93. Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology*, 15(1), 2-8.
94. Mohamed, L., Chakraborty, S., ArulJothi, K. N., Mabasa, L., Sayah, K., Costa-Lotufo, L. V., ... & Prince, S. (2020). Galenia africana plant extract exhibits cytotoxicity in breast cancer cells by inducing multiple programmed cell death pathways. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(10), 1155-1165.
95. Mirzaei, H., Keighobadi, M., & Emami, S. (2017). An overview of anticancer chalcones with apoptosis inducing activity. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 26(146), 254-268.
96. Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell*, 21(1), 92-101.
97. Mohamed, L., Chakraborty, S., ArulJothi, K. N., Mabasa, L., Sayah, K., Costa-Lotufo, L. V., ... & Prince, S. (2020). Galenia africana plant extract exhibits cytotoxicity in breast cancer cells by inducing multiple programmed cell death pathways. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(10), 1155-1165.
98. Mirzaei, H., Keighobadi, M., & Emami, S. (2017). An overview of anticancer chalcones with apoptosis inducing activity. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 26(146), 254-268.
99. Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell*, 21(1), 92-101.
- 100.
101. Mohammed, I. A., Akhtar, M. N., Biau, F. J., Tor, Y. S., Zareen, S., Binti Shahabudin, S., ... & Khalaf, R. M. (2019). Isolation of cardamonin and pinostrobin chalcone from the rhizomes of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and their cytotoxic effects on H-29 and MDA-MB-231 cancer cell lines. *The Natural Products Journal*, 9(4), 341-348.
102. Nakhjavani, M., Zarghi, A., & Shirazi, F. H. (2014). Cytotoxicity of selected novel chalcone derivatives on human breast, lung and hepatic carcinoma cell lines. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(3), 953.
103. Oh, H. N., Seo, J. H., Lee, M. H., Kim, C., Kim, E., Yoon, G., ... & Chae, J. I. (2018). Licochalcone C induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells by regulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 119(12), 10118-10130.
104. Obeng, E. (2020). Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143.

105. Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., & Wu, Q. (2021). Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy. *Biomolecules*, 11(6), 894.
106. Pouget, C., Lauthier, F., Simon, A., Fagnere, C., Basly, J. P., Delage, C., & Chulia, A. J. (2001). Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(24), 3095-3097.
107. Patel, N. K., Jaiswal, G., & Bhutani, K. K. (2016). A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin. *Natural product research*, 30(18), 2017-2027.
108. Pinon, J. D., Labi, V., Egle, A., & Villunger, A. (2008). Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene*, 27(1), S41-S52.
109. Pecorino, L. (2021). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. Oxford university press.
110. Pérez Escobar, M. M., García Rodríguez, M. E., Armas Moredo, K., Álvarez Montané, I., Oliva Díaz, J. A., & Pérez Escobar, E. (2017). Cáncer de pulmón de células no pequeñas: presentación de caso. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 21(2), 258-263.
111. Palmero, M. (2011). Cultivos celulares. *Avances en Cultivos Celulares*.
112. Patel, K., Singh, G. K., & Patel, D. K. (2014). A Review on Pharmacological and Analytical Aspects of Naringenin. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 24(7), 551–560. doi:10.1007/s11655-014-1960-x.
113. Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(11), 897-907.
114. Rao, Y. K., Kao, T. Y., Ko, J. L., & Tzeng, Y. M. (2010). Chalcone HTMC causes in vitro selective cytotoxicity, cell-cycle G1 phase arrest through p53-dependent pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells, and in vivo tumor growth suppression. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(22), 6508-6512.
115. Rodríguez Garrido, M., & Rodríguez de la Peña, T. (2010). Revisión Sistemática Rápida sobre Radioterapia en Cáncer de Pulmón.
116. Ryan, B. M., Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature reviews cancer*, 10(6), 389-402.
117. Sun, J. L., Cao, Z. Q., Sun, S. W., Sun, Z. H., Sun, S. H., Ye, J. F., & Leng, P. (2022). Effects of 2, 2', 4'-trihydroxychalcone on the proliferation, metastasis and apoptosis of A549 human lung cancer cells. *Oncology Letters*, 23(4), 1-11.
118. Sun, J., Cao, Z., Sun, S., Sun, Z., Sun, S., Ye, J., & Leng, P. (2021). The Effects of 2, 2', 4'-Trihydroxychalcone on the Cell Proliferation, Metastasis, and Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549.
119. Szliszka, E., Czuba, Z. P., Mazur, B., Sedek, L., Paradysz, A., & Krol, W. (2009). Chalcones enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 11(1), 1-13.

120. Scabini, M., Stellari, F., Cappella, P., Rizzitano, S., Texido, G., & Pesenti, E. (2011). In vivo imaging of early stage apoptosis by measuring real-time caspase-3/7 activation. *Apoptosis*, 16, 198-207.
121. Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of biological Chemistry*, 276(10), 7320-7326.
122. Sánchez de Cos Escuín, J., & Hernández Hernández, J. (2004). Marcadores tumorales y cáncer de pulmón.¿ Qué hay de nuevo?. *Archivos de Bronconeumología*, 40, 35-40.
123. Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
124. Shiraishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H., Watanabe, S. I., Goto, K., Nishiwaki, Y., ... & Yokota, J. (2009). Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis*, 30(1), 65-70.
125. Segretín, M. E. (2003). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *Argen Bio*.
126. Sun, J., Cao, Z., Sun, S., Sun, Z., Sun, S., Ye, J., & Leng, P. (2021). The Effects of 2, 2', 4'-Trihydroxychalcone on the Cell Proliferation, Metastasis, and Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549.
127. Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562.
128. Salum, L. B., Altei, W. F., Chiaradia, L. D., Cordeiro, M. N., Canevarolo, R. R., Melo, C. P., ... & Vogt, A. (2013). Cytotoxic 3, 4, 5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 63, 501-510.
129. Steven, A., Fisher, S. A., & Robinson, B. W. (2016). Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*, 21(5), 821-833.
130. Tsang, O., & Wong, J. W. (2021). Proteogenomic interrogation of cancer cell lines: an overview of the field. *Expert Review of Proteomics*, 18(3), 221-232.
131. Tabudravu, J. N., & Jaspars, M. (2005). Anticancer activities of constituents of kava (*Piper methysticum*). *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 23(1), 26-29.
132. Tsukiyama, R. I., Katsura, H., Tokuriki, N., & Kobayashi, M. (2002). Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5), 1226-1230.
133. Travis, W. D. (2011). Pathology of lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 669-692.
134. Takac, P., Kello, M., Pilatova, M. B., Kudlickova, Z., Vilkova, M., Slepčikova, P., ... & Mojzis, J. (2018). New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-

- mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. *Chemico-biological interactions*, 292, 37-49.
135. Téllez Martínez, J., Mucha Macías, J. D., Pérez Vega, E., Váldez Ruiz, M., & González Diddi, M. (1988). MRC-5 línea celular diploide como un modelo para el estudio fármacos con potencialidad carcinogénica. *Arch. invest. méd*, 13-22.
 136. Takac, P., Kello, M., Pilatova, M. B., Kudlickova, Z., Vilkova, M., Slepčikova, P., ... & Mojzis, J. (2018). New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. *Chemico-biological interactions*, 292, 37-49.
 137. Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Bonesi, M., Colica, C., & Menichini, F. (2011). In vitro cytotoxic activity of extracts and isolated constituents of *Salvia leriifolia* Benth. against a panel of human cancer cell lines. *Chemistry & biodiversity*, 8(6), 1152-1162.
 138. Vayalil, P. K. (2002). Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. Arecaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 610-617.
 139. Van Staveren, W. C. G., Solís, D. W., Hebrant, A., Detours, V., Dumont, J. E., & Maenhaut, C. (2009). Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1795(2), 92-103.
 140. Valverde, R. M. (1996). Farmacología y farmacognosia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica. *Monografías del Real Jardín Botánico de Córdoba*, (3), 93-98.
 141. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*, 29(1), 235-271.
 142. Widakowich, C., de Castro Jr, G., De Azambuja, E., Dinh, P., & Awada, A. (2007). Side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *The oncologist*, 12(12), 1443-1455.
 143. Westaby, D., Jimenez-Vacas, J. M., Padilha, A., Varkaris, A., Balk, S. P., de Bono, J. S., & Sharp, A. (2021). Targeting the Intrinsic Apoptosis Pathway: A Window of Opportunity for Prostate Cancer. *Cancers*, 14(1), 51.
 144. Weber, S. U., Schewe, J. C., Lehmann, L. E., Müller, S., Book, M., Klaschik, S., ... & Stüber, F. (2008). Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Critical care*, 12(5), 1-10.
 145. Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12815-12819.
 146. Wang, Y. T., Yang, C. H., Huang, T. Y., Tai, M. H., Sie, R. H., & Shaw, J. F. (2019). Cytotoxic effects of chlorophyllides in ethanol crude extracts from plant leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019

147. Warmka, J. K., Solberg, E. L., Zeliadt, N. A., Srinivasan, B., Charlson, A. T., Xing, C., & Wattenberg, E. V. (2012). Inhibition of mitogen activated protein kinases increases the sensitivity of A549 lung cancer cells to the cytotoxicity induced by a kava chalcone analog. *Biochemical and biophysical research communications*, 424(3), 488-492.
148. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1).
149. Wang, P., Yuan, X., Wang, Y., Zhao, H., Sun, X., & Zheng, Q. (2015). Licochalcone C induces apoptosis via B-cell lymphoma 2 family proteins in T24 cells. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7623-7628.
150. Wu, C. P., Lusvardi, S., Hsiao, S. H., Liu, T. C., Li, Y. Q., Huang, Y. H., ... & Ambudkar, S. V. (2020). Licochalcone A selectively resensitizes ABCG2-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to chemotherapeutic drugs. *Journal of natural products*, 83(5), 1461-1472.
151. Wu, C., Hu, Z., Yu, D., Huang, L., Jin, G., Liang, J., ... & Shen, H. (2009). Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations. *Cancer research*, 69(12), 5065-5072.
152. Xiao, X. Y., Hao, M., Yang, X. Y., Ba, Q., Li, M., Ni, S. J., ... & Du, X. (2011). Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer letters*, 302(1), 69-75.
153. Yanagawa, N., Shiono, S., Abiko, M., Ogata, S. Y., Sato, T., & Tamura, G. (2014). The correlation of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)/American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) classification with prognosis and EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *The Annals of thoracic surgery*, 98(2), 453-458.
154. Yang, H. H., Zhang, C., Lai, S. H., Zeng, C. C., Liu, Y. J., & Wang, X. Z. (2017). Isoliquiritigenin induces cytotoxicity in PC-12 cells in vitro. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(4), 1173-1190.
155. You, J. S., & Jones, P. A. (2012). Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?. *Cancer cell*, 22(1), 9-20.
156. Yu, S. P., Canzoniero, L. M., & Choi, D. W. (2001). Ion homeostasis and apoptosis. *Current opinion in cell biology*, 13(4), 405-411.
157. Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology*, 19(3), 124-128., P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology*, 19(3), 124-128.

6. ANEXOS

% VC CS4 MRC5			% VC CS1 MRC5			% VC CS12 MRC5		
29,94	27,12	29,94	32,2	34,46	31,64	47,86	50,71	54,7
35,03	42,94	35,59	38,98	28,81	31,64	34,19	31,91	47,29
40,11	41,24	64,41	40,68	40,11	46,33	98,86	92,31	96,87
92,09	93,79	90,96	105,08	98,31	97,74	94,02	92,31	94,02

96,61	99,44	94,35	93,79	94,92	104,52	93,45	100,85	103,13
100	100	100	100	100	100	100	100	100

Anexo 1. Porcentajes de viabilidad celular Células MR5 después de la exposición de los 3 compuestos.

% VC CS4 A549			% VC CS1 A549			% VC CS12 A549		
36,87	37,53	39,74	37,53	40,51	40,73	49,12	40,84	36,87
36,87	47,9	31,35	48,79	41,72	40,51	55,63	55,85	54,97
50,33	49,67	51,88	54,97	64,02	53,64	74,17	69,54	89,62
77,26	83,44	82,12	66	84,33	83,89	81,02	80,13	79,47
107,95	107,95	88,3	93,16	96,03	98,23	85,43	88,08	96,69
100	100	100	100	100	100	100	100	100

Anexo 2. Porcentajes de viabilidad celular Células A549 después de la exposición de los 3 compuestos.

Muestra	TARGET	Promedio Cq	Housekeeping	promedio Cq	ΔCq		$\Delta \Delta Cq$	$2\Delta \Delta Cq$	FOLD CHANGE
UT	P53	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			
CS1-1	P53	21,08	ACTINA	17,79	3,29	$\Delta Cq1$	-1,62	3,073750363	0,325335464
UT	BIM	22,94	ACTINA	16,85	6,09	$\Delta Cq2$			
CS1-1	BIM	21,96	ACTINA	17,79	4,17	$\Delta Cq1$	-1,92	3,784230587	0,26425451
UT	BAX	21,67	ACTINA	16,85	4,82	$\Delta Cq2$			
CS1-1	BAX	21,22	ACTINA	17,79	3,43	$\Delta Cq1$	-1,39	2,620786808	0,381564802
UT	CASP	23,57	ACTINA	16,85	6,72	$\Delta Cq2$			
CS1-1	CASP	22,66	ACTINA	17,79	4,87	$\Delta Cq1$	-1,85	3,60500185	0,277392368
UT	P53	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			
CS1-2	P53	21,86	ACTINA	17,71	4,15	$\Delta Cq1$	-0,76	1,693490625	0,590496331
UT	BIM	22,94	ACTINA	16,85	6,09	$\Delta Cq2$			
CS1-2	BIM	22,56	ACTINA	17,71	4,85	$\Delta Cq1$	-1,24	2,361985323	0,423372656
UT	BAX	21,67	ACTINA	16,85	4,82	$\Delta Cq2$			
CS1-2	BAX	23,72	ACTINA	17,71	6,01	$\Delta Cq1$	1,19	0,438302861	2,281527432
UT	CASP	23,57	ACTINA	16,85	6,72	$\Delta Cq2$			
CS1-2	CASP	23	ACTINA	17,71	5,29	$\Delta Cq1$	-1,43	2,694467154	0,371130893
UT	P53	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			

CS4-1	P53	22,79	ACTINA	20,64	2,15	$\Delta Cq1$	-2,76	6,77396 2499	0,147624 083
UT	BIM	22,94	ACTINA	16,85	6,09	$\Delta Cq2$			
CS4-1	BIM	23,72	ACTINA	20,64	3,08	$\Delta Cq1$	-3,01	8,05564 44	0,124136 562
UT	BAX	21,67	ACTINA	16,85	4,82	$\Delta Cq2$			
CS4-1	BAX	22,79	ACTINA	20,64	2,15	$\Delta Cq1$	-2,67	6,36429 187	0,157126 672
UT	CASP	23,57	ACTINA	16,85	6,72	$\Delta Cq2$			
CS4-1	CASP	24,17	ACTINA	20,64	3,53	$\Delta Cq1$	-3,19	9,12610 9727	0,109575 715
UT	P53	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			
CS4-2	P53	21,2	ACTINA	17,92	3,28	$\Delta Cq1$	-1,63	3,09512 9987	0,323088 208
UT	BIM	22,94	ACTINA	16,85	6,09	$\Delta Cq2$			
CS4-2	BIM	22,27	ACTINA	17,92	4,35	$\Delta Cq1$	-1,74	3,34035 1678	0,299369 676
UT	BAX	21,67	ACTINA	16,85	4,82	$\Delta Cq2$			
CS4-2	BAX	20,96	ACTINA	17,92	3,04	$\Delta Cq1$	-1,78	3,43426 1746	0,291183 397
UT	CASP	23,57	ACTINA	16,85	6,72	$\Delta Cq2$			
CS4-2	CASP	22,68	ACTINA	17,92	4,76	$\Delta Cq1$	-1,96	3,89061 979	0,257028 457
UT	P53	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			
Tx-1	P53	22,09	ACTINA	16,8	5,29	$\Delta Cq1$	0,38	0,76843 7591	1,301341 855
UT	BIM	22,94	ACTINA	16,85	6,09	$\Delta Cq2$			
Tx-1	BIM	22,94	ACTINA	16,8	6,14	$\Delta Cq1$	0,05	0,96593 6329	1,035264 924
UT	BAX	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			
Tx-1	BAX	21,7	ACTINA	16,8	4,9	$\Delta Cq1$	-0,01	1,00695 555	0,993092 495
UT	CASP	23,57	ACTINA	16,85	6,72	$\Delta Cq2$			
Tx-1	CASP	23,4	ACTINA	16,8	6,6	$\Delta Cq1$	-0,12	1,08673 4863	0,920187 651
UT	P53	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			
TX-2	P53	20,78	ACTINA	17,18	3,6	$\Delta Cq1$	-1,31	2,47941 54	0,403320 88
UT	BIM	22,94	ACTINA	16,85	6,09	$\Delta Cq2$			
TX-2	BIM	20,65	ACTINA	17,18	3,47	$\Delta Cq1$	-2,62	6,14750 0725	0,162667 732
UT	BAX	21,76	ACTINA	16,85	4,91	$\Delta Cq2$			

TX-2	BAX	20,65	ACTINA	17,18	3,47	$\Delta Cq1$	-1,44	2,71320 8655	0,368567 304
UT	CASP	23,57	ACTINA	16,85	6,72	$\Delta Cq2$			
TX-2	CASP	22,06	ACTINA	17,18	4,88	$\Delta Cq1$	-1,84	3,58010 0284	0,279321 785

Anexo 3. Datos de qPCR para los cálculos del Fold change.