



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio *in vitro* del efecto de boldina y algunos derivados en la viabilidad de células de cáncer colorrectal”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

KARLA ELIZABETH VILLALOBOS NOVA

Director del Seminario de Título:
Prof. Julio Tapia Pineda

Patrocinante:
Prof. Christian González-Billault

Noviembre 2022
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por la **Srta. Karla Elizabeth Villalobos Nova**

“ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE BOLDINA Y ALGUNOS DERIVADOS EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER COLORRECTAL”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título:

Prof. Dr. Julio Tapia Pineda _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Dra. Verónica Palma _____

Evaluador:

Dr. Francisco Aguayo _____

Santiago de Chile,2023

BIOGRAFÍA



Karla nació el 29 de diciembre de 1994 en Santiago y desde entonces ha crecido junto a sus padres en un caluroso hogar de Maipú. La mayor parte de su educación escolar la realizó en un pequeño colegio de esta misma comuna, donde desarrolló su inclinación por el área científica-matemática.

En el año 2015 entró a la Universidad de Chile y fue oficialmente estudiante de Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2020. Entre los años 2018 y 2019 tuvo sus primeros acercamientos a la investigación científica con sus unidades de investigación en el área de ecología microbiana. Durante este periodo, su curiosidad la llevó a ser partícipe de su primera reunión científica como voluntaria en el Congreso ALAM.

En medio de la pandemia del año 2020, postuló a un intercambio nacional virtual, paralelo a su semestre, cursando así el *Minor* de Asuntos Antárticos de la Universidad de Magallanes. A mediados del año 2021 realizó una pasantía para comenzar a retomar la presencialidad al laboratorio, esta vez acercándose más al área biomédica, experiencia que culminó con su primera publicación científica en la revista *Current Medicinal Chemistry*. A finales de ese año, Karla obtuvo su licenciatura.

En el transcurso de su carrera, Karla fue ayudante de varios ramos, donde el último año se dedicó especialmente al curso de Biología Celular, llenando así una parte de su vida con la enseñanza de ciencia a los nuevos jóvenes. En sus tiempos libres fue parte del Núcleo de Extensión de Ciencias (NEC), apoyando durante tres años a la divulgación científica. Además, fue socia de la Asociación Nacional de Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología (ANEIB), donde en el año 2021 apoyó en la realización del IX CONEIB

como Relacionadora Pública y a mediados de 2022 se integró a la directiva como Creación de Contenidos.

En este último año, Karla se incorporó al Laboratorio de Transformación Celular de la Facultad de Medicina, dirigido por el profesor Julio Tapia. Durante este periodo dio a conocer parte de sus resultados en su primera exposición oral en el XXXVIII Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica y en su primer poster como autora principal en el XLV congreso de la SBBM. Y finalmente, el ciclo de pregrado de Karla culmina aquí, con la entrega del presente Seminario de Título.

Dedicado a mis padres

*Que con su paciencia, sacrificio y eterno amor,
me han convertido en gran parte de lo que soy hoy*

Los amo

AGRADECIMIENTOS

Creo que ser agradecida en la vida es una de las cosas más importantes y podría escribir muchas páginas de ello, pero intentaré ser acotada.

Agradezco al profe Julio que no solo me brindó un espacio donde trabajar, también me enseñó de su propia mano técnicas nuevas para mí, me orientó y me brindó una infinidad de discusiones nutritivas, tanto académicas como personales. Gracias por ser más que solo el director de este seminario, por ser un científico integral y por creer en mí.

Agradezco a todos los miembros del LTC, sobre todo por aguantarme día a día cuando tengo hambre. A Jorge, mi compañero de carrera que nunca pensé toparme en el laboratorio, gracias por toda la compañía brindada estos meses, incluso en los momentos de frustración (tecnológica, sobre todo). A Marcelo y Mari, si bien se integraron hace poco, les agradezco por todas sus palabras de apoyo en estas semanas de caos y estrés. Cada uno desde su propia personalidad han aportado en formar un laboratorio más cálido. A Matías y Sarai gracias por esas pequeñas y gratas conversaciones.

Al laboratorio de la profesora Julieta y al profesor Mario, por tener siempre tan buena disposición en ayudar. Especialmente gracias a mis queridas vecinas de lab, Paty e Isabel.

A Javi, Andrea y David, mis biólogos favoritos por siempre, gracias por acompañarme en los primeros años de mi carrera y entregarme tantos buenos momentos.

A un grupo muy loco y multidisciplinar que conocí en estos años: Barbi, Nico, Peko, Menina y Babs, gracias por todo el cariño y las risas brindadas... solo me pregunto, ¿y la tercera patita cuándo?

A Cami y Carlos que los conocí siendo aún bióloga. Jamás pensé que llegaría a ser su compañera de carrera y menos que fueran mis amigos. Gracias por ser mi equipo de estudio en todas esas pruebas, trabajos llorados y trasnochados. Doy gracias a la vida por conocerlos y ustedes saben todo lo que significan para mí, pero aun así les escribo estas pequeñas líneas. A Cami le doy gracias por escucharme, aconsejarme y mandarme sus

audios eternos retándome o buscando que yo la rete. Eres una persona cariñosa y maravillosa, no cambies nunca. A Carlos, gracias por ser un apoyo esencial en estos años, por aguantar y comprender toda mi forma de ser, incluso en los momentos difíciles. Pero, sobre todo, gracias por darme esos pequeños empujones que me hacían falta para seguir el camino que de verdad quería, ya que sin ti no estaría egresando de esta carrera. Y recuerda, tienes un corazón noble y puro, cuídalo siempre.

A mis amigas de vida Coni, Cami, Belén y Vale, que, aunque hablemos cada un siglo, sé que están ahí para mí.

A mi núcleo familiar, mis padres, quienes no solo me dieron la vida, me han brindado todo su amor y educación. Gracias por enseñarme el camino del respeto y por entregarme las herramientas necesarias para construir mi propio camino. Gracias por siempre estar ahí para mí y especialmente gracias por siempre tenerme un plato de comida, ya que “guatita llena, corazón contento”. Y no puedo dejar de lado a los otros dos integrantes de mi familia: a Jami, mi pato blanco maravilloso, por hacerme regañar con sus travesuras, pero también por alegrarme cada día y a Franklin, mi tortuga preciosa, por recordarme que a veces debemos tener un segundo de pausa para contemplar el sol y recargar las energías.

Finalmente, agradezco a Janara, Cristian, Joaco y a todas aquellas personas maravillosas que me dieron alguna palabra de aliento o un consejo en este periodo de seminario. Y también a todos aquellos que en algún momento compartieron conmigo a lo largo de estos años en la universidad.

Muchas gracias

Este seminario de título fue realizado bajo los proyectos VID-UAPOYA 570346, Puente-ICBM 570335 y los proyectos ANID-Fondecyt 3220509, 1211619, 1220353.

INDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE DE CONTENIDOS	vii
INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Cáncer Colorrectal	2
1.2.1 Epidemiología y etiopatogenia.....	2
1.2.2 Diagnóstico y etapas del CCR.....	4
1.2.3 Tratamientos del CCR.....	5
1.3 Búsqueda de nuevos fármacos para el CCR	6
1.3.1 Criterios generales de búsqueda de un anticancerígeno.....	6
1.3.2 Alcaloides de <i>Peumus boldus</i> como nueva aproximación farmacológica.....	8
1.3.3 Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de boldina.....	9
1.3.4 Boldina como anticancerígeno.....	10

2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo General:.....	11
2.2 Objetivos Específicos:	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Compuestos Químicos.....	12
3.2 Cultivo Celular	12
3.3 Viabilidad Celular	13
3.4 Citotoxicidad Celular.....	13
3.5 Apoptosis Celular	14
3.6 Citometría de Flujo para medir la proliferación celular	15
3.7 Análisis de resultados.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1 OE 1: Analizar si boldina y sus derivados disminuyen la proliferación celular	16
4.1.1 Viabilidad de la línea celular de cáncer colorrectal DLD-1	16
4.1.2 Viabilidad de la línea no-tumoral CHO-K1 frente a boldina y sus derivados	19
4.2 OE 2: Estudiar si boldina y sus derivados promueven la necrosis celular ..	20
4.3 OE 3: Evaluar si boldina y sus derivados gatillan la apoptosis celular y definir la vía específica	22
4.3.1 Activación de caspasas efectoras en la línea celular DLD-1	22
4.3.2 Citometría de flujo para la línea celular DLD-1	24

4.3.3 Activación de caspasas iniciadoras	26
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXO	48

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Valores IC_{50} para los distintos derivados de boldina en la línea celular DLD-1.</i>	<i>18</i>
--	-----------

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Número de muertes de cáncer en el año 2020.</i>	2
<i>Figura 2. Distribución de los tipos de cáncer colorrectal.</i>	3
<i>Figura 3. Etapas del cáncer colorrectal y sus tratamientos.</i>	4
<i>Figura 4. Esquema de las hojas de Peumus boldus Molina, junto con la estructura química del alcaloide boldina.</i>	8
<i>Figura 5. Viabilidad de la línea celular DLD-1 frente a boldina y otros compuestos.</i>	16
<i>Figura 6. Viabilidad de la línea celular DLD-1 frente a los derivados de boldina.</i>	17
<i>Figura 7. Ensayo de estandarización de tiempos para medir LDH en la línea celular DLD-1.</i>	21
<i>Figura 8. Citotoxicidad celular en la línea celular DLD-1 en presencia de boldina y de los distintos derivados.</i>	22
<i>Figura 9. Detección de caspasas efectoras 3/7 en células DLD-1 en presencia de boldina y algunos derivados químicos.</i>	24
<i>Figura 10. Citometría de flujo de la línea celular DLD-1 frente a derivados de boldina por 24 h.</i>	25
<i>Figura 11. Porcentajes poblacionales tras el tratamiento con boldina (Bol) y cuatro derivados en células DLD-1.</i>	26
<i>Figura 12. Detección de caspasas iniciadoras 8 y 9 en células DLD-1, en presencia de boldina y tres de sus derivados.</i>	27
<i>Figura 13. Detección temporal de las caspasas iniciadoras en células DLD-1, en presencia de boldina y tres derivados.</i>	29
<i>Figura A. 1. Viabilidad celular para la línea celular CHO-K1 en presencia de boldina y dos compuestos control.</i>	48
<i>Figura A. 2. Viabilidad celular para la línea celular CHO-K1 en presencia de los derivados de boldina.</i>	49
<i>Figura A. 3. Curvas de luminiscencia para distintas diluciones del anticuerpo α-mIgGK BP-HR.</i>	50

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
CCR	Cáncer colorrectal
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary K1
DMSO	Dimetilsulfóxido
dTTP	Timidina Trifosfato
ECE-1c	Enzima convertidora de endotelina 1c
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HSP27	Small Heat Shock Protein
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MMR	DNA Mismatch Repair
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RLU	Unidades relativas de luminiscencia
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
5-FU	5-fluorouracilo

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo tipo de cáncer más mortal en el mundo, estimándose que su incidencia aumentará en un 56% para 2040. El tratamiento tradicional en etapas 2 y 3 involucra quimioterapia con 5-fluorouracilo, el cual es moderadamente efectivo, concomitante con sus efectos secundarios asociados a su alta toxicidad. Por lo tanto, son necesarias nuevas drogas para el tratamiento del CCR, donde una línea activa de investigación se basa en los compuestos de origen natural como la boldina. Este alcaloide es extraído del árbol chileno *Peumus boldus* Molina y es conocido por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, además de sus propiedades antitumorales reportadas en otros cánceres. Esto probablemente estaría mediado por la inhibición de CK2, una proteína Ser/Thr kinasa que fosforila varios blancos implicados en la proliferación celular y que se encuentra inducida en varios tipos de cáncer, incluido el CCR. Dado que no existen estudios de boldina como anticancerígeno en CCR es interesante evaluar su efecto. Además, dado que no tiene un buen efecto farmacocinético y que se busca mejorar su efecto inhibitorio sobre CK2, se sintetizaron 27 compuestos derivados de boldina. Así, el objetivo general de este seminario de título fue definir *in vitro* en la línea celular DLD-1 de CCR si boldina y sus derivados tendrían un efecto sobre la viabilidad celular. Del mismo modo, se llevaron a cabo los objetivos específicos: el análisis de los compuestos sobre la disminución en la proliferación a través de un ensayo MTS; el estudio de necrosis con la detección de la enzima lactato deshidrogenada liberada; y finalmente, se analizó si los compuestos gatillaban la apoptosis y por qué vía, mediante la actividad de caspasas iniciadoras y efectoras. A 100 μ M de boldina se observó un 58,98% de viabilidad, bajó un 20% de citotoxicidad y se detectó una actividad marginal de caspasas. Por otro lado, los derivados de boldina tuvieron un efecto diferencial sobre la viabilidad celular, donde la

mayoría mostró un gran potencial inhibitorio y una baja citotoxicidad. Se realizó el análisis en profundidad de 4 compuestos. Los compuestos 3 y 21 gatillaron una citotoxicidad superior al 100% y, sorprendentemente, una actividad muy importante de caspasas iniciadoras y efectoras, lo cual es altamente sugerente de un proceso de necrosis secundaria. Los compuestos 11 y 23 resultaron en un porcentaje $\leq 20\%$ de citotoxicidad, donde el compuesto 11 condujo a una baja actividad de caspasas efectoras, contrario a la alta actividad de caspasas efectoras e iniciadoras detectadas en presencia del compuesto 23. Sin embargo, este último compuesto muestra mayor población de células necróticas por citometría de flujo, lo cual lleva a pensar en que la apoptosis puede cambiar a necroptosis.

Estos resultados contribuyen al conocimiento del mecanismo de acción de boldina en células de CCR. Además, permiten concluir que la gran mayoría de los derivados de boldina son más efectivos que boldina al disminuir la viabilidad de células DLD-1. Finalmente, es necesario realizar nuevos estudios sobre los candidatos estudiados a fondo, a fin de corroborar los posibles procesos de muerte involucrados, siendo el compuesto 23 es el más prometedor de todos los analizados para ahondar en su estudio.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the second most lethal type of cancer worldwide, with its incidence estimated to increase by 56% by 2040. Traditionally, treatment of stages 2 and 3 CRC involves chemotherapy with 5-fluorouracil, which is moderately effective, and concomitant with its side effects associated with its high toxicity. Therefore, new drugs are needed for the treatment of CRC, where an active line of research is based on naturally occurring compounds such as boldine. This alkaloid, known for its antioxidant and anti-inflammatory properties, is extracted from the Chilean tree *Peumus boldus* Molina. In addition, to its anticancer properties reported in other cancers. This would likely be mediated by inhibition of CK2, a Ser/Thr kinase protein that phosphorylates several targets involved in cell proliferation and is induced in several types of cancer, including CRC. Since there are no studies of boldine as an anticancer drug in CRC it is interesting to evaluate its effect. In addition, since it does not have a good pharmacokinetic effect and that it seeks to improve its inhibitory effect on CK2, twenty-seven compounds derived from boldine were synthesized. Thus, the general objective of this seminar was to define *in vitro* in the DLD-1 cell line of CCR whether boldine and its derivatives would have an effect on cell viability. In the same way, the specific objectives were carried out: the analysis of the compounds on the decrease in proliferation through an MTS assay; the study of necrosis with the detection of the released dehydrogenated lactate enzyme; and finally, it was analyzed if the compounds triggered apoptosis and by what route, through the activity of initiating and effector caspases. At 100 μ M boldine, 58,98% viability was observed, under 20% cytotoxicity and marginal caspase activity. On the other hand, the derivatives had a differential effect on cell viability, where most showed great inhibitory potential and low cytotoxicity. In-depth analysis of four compounds was performed.

Compounds 3 and 21 triggered a cytotoxicity greater than 100% and surprisingly a very important activity of initiating and effector caspases, which was highly suggestive of a secondary necrosis process. Compounds 11 and 23 led to a $\leq 20\%$ cytotoxicity, where compound 11 led to a low activity of effector caspases, contrary to the high activity of effector and initiator caspases detected in the presence of compound 23. However, the latter compound shows a larger population of necrotic cells by flow cytometry, which suggests that apoptosis may change to necroptosis.

These results contribute to the knowledge of the mechanism of action of boldine in CRC cells. In addition, they allow us to conclude that the vast majority of boldine derivatives are more effective than boldine in decreasing the viability of DLD-1 cells. Finally, it is necessary to carry out new studies on the candidates studied in depth, in order to corroborate the possible death processes involved, where compound 23 is the most promising of all those analyzed to deepen its study.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad de preocupación mundial, con aproximadamente 10 millones de fallecimientos atribuidos a esta patología en el año 2020 (World Health Organization, 2020). Si bien no hay una única causa que explique el inicio de la enfermedad, es sabido que hay varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que aparezca un cáncer, desde genéticos hereditarios hasta el estilo de vida de las personas, con una nutrición inadecuada, la exposición a agentes químicos contaminantes o el consumo de agentes nocivos como el alcohol y el tabaco (Williams, 2019).

A nivel celular el cáncer está caracterizado por la rápida proliferación y crecimiento celular; las células tumorales tienen el potencial de emigrar e invadir otros tejidos (Alberts et al., 2008). Se ha propuesto que en el cáncer hay ocho funciones fisiológicas esenciales alteradas: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune (Hanahan & Weinberg, 2011). Además, se han propuesto dos características habilitadoras de la enfermedad: inflamación promotora de tumores e inestabilidad y mutación del genoma. Esta última característica es clave a nivel molecular, donde ocurren mutaciones que generan la ganancia de función de oncogenes, o bien, la pérdida de función de supresores de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Cáncer Colorrectal

1.2.1 Epidemiología y etiopatogenia

Después del cáncer pulmón, el cáncer colorrectal (CCR) es el segundo tipo de cáncer más mortal en el mundo, donde en el año 2020 se estimaron casi un millón de muertes (Figura 1) (GLOBOCAN, 2020). En Chile esta patología ocupa el tercer lugar, registrándose 3.179 muertes en el año 2020 (GLOBOCAN, 2020).

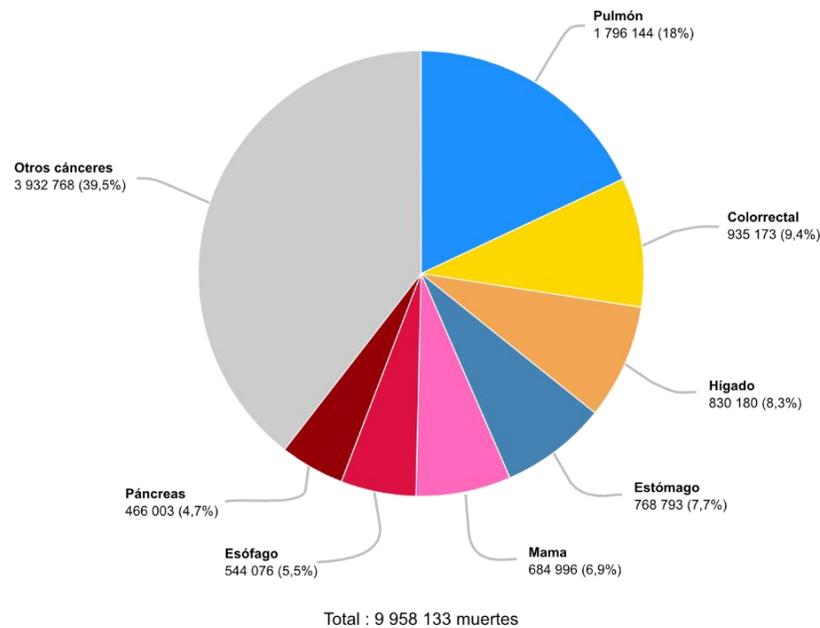


Figura 1. Número de muertes de cáncer en el año 2020. El registro incluye ambos sexos y todas las edades. Imagen modificada de (GLOBOCAN, 2020).

El CCR se clasifica principalmente en tres tipos: el más frecuente, con un 65% de incidencia, es el CCR esporádico que es producto de mutaciones espontáneas, seguido del CCR familiar sin patrones específicos de las mutaciones genéticas y finalmente, el CCR hereditario con genes bien identificados (Figura 2) (Giglia & Chu, 2016). Dentro del CCR de tipo hereditario se han identificado los genes supresores de tumores *p53*, *APC*, *SMAD4*, *PTEN*, entre otros, como los responsables de la predisposición a desarrollar la enfermedad; del mismo modo se han identificado mutaciones en los genes del sistema de reparación *MMR* (Giglia & Chu, 2016; Stoffel & Yurgelun, 2016).

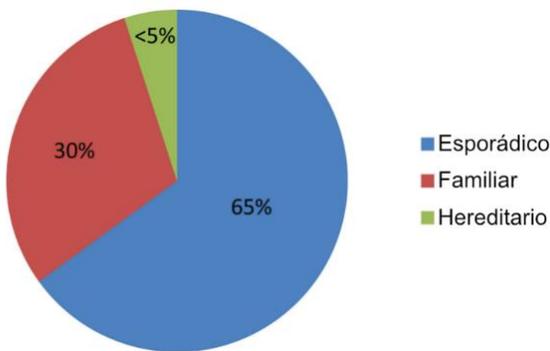


Figura 2. Distribución de los tipos de cáncer colorrectal. Imagen modificada de (Giglia & Chu, 2016).

Por otra parte, en el CCR se han reportado proteínas implicadas en la mayor progresión de la enfermedad. Una de ellas es la chaperona HSP27, cuya expresión en células de adenocarcinoma de colón aumenta significativamente la tumorigenicidad (Garrido et al., 1998). Del mismo modo, la chaperona HSP70 previene la muerte de células tumorales, por lo que se han realizado estudios disminuyendo su expresión, resultando en la promoción de la inmunogenicidad que promueve la muerte celular *in vivo* (Gurbuxani et al., 2001).

Otra proteína implicada en varios tipos de cáncer, incluido el CCR, es la proteína serina/treonina quinasa CK2, la cual es un heterotetrámero conformado por subunidades catalíticas (α o α') y reguladoras (β) (Litchfield, 2003; Ruzzene & Pinna, 2010). Nuestro grupo ha reportado que esta proteína favorece la migración e invasión celular en CCR mediante la fosforilación a la enzima convertidora de endotelina 1C (ECE-1c), logrando su estabilización. Por el contrario, cuando se ensayó en presencia de CX-4945, un compuesto inhibidor de CK2, los niveles de ECE-1c bajaron de manera dosis dependiente (Niechi et al., 2015).

1.2.2 Diagnóstico y etapas del CCR

Es sabido que un diagnóstico temprano es clave para disminuir las tasas de mortalidad, razón por la cual se han ido estudiando y perfeccionando distintos métodos de detección en el CCR para avanzar en una mayor sensibilidad y especificidad de diagnóstico. Actualmente se emplean métodos no invasivos como las pruebas de sangre en heces, o métodos invasivos, como sigmoidoscopia flexible, colonoscopia, entre otros (Levin et al., 2008). Para determinar la etapa de avance del CCR se emplea el sistema TNM de estadificación del *American Joint Committee on Cancer*, el cual clasifica la etapa más temprana de esta patología como 0 y como etapas I a la IV cuando el cáncer comienza a crecer, siendo la última etapa la que indica el mayor grado de propagación o metástasis del cáncer (Figura 3) (American Joint Committee on Cancer, 2017). Este grado es importante para decidir sobre el tratamiento más adecuado para cada paciente.

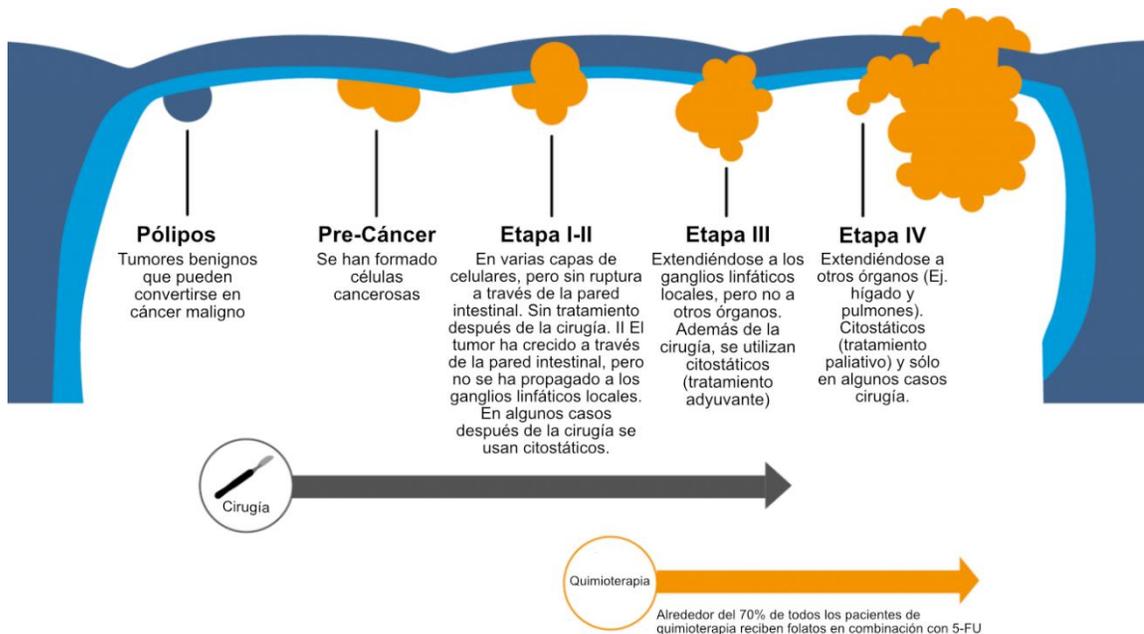


Figura 3. Etapas del cáncer colorrectal y sus tratamientos. Se indica el desarrollo del CCR desde la formación de pólipos benignos, siguiendo con el estadio 0 que se indica como “pre-cáncer” y luego, avanzando por las 4 fases de progresión del CCR. En el extremo inferior se indican los tratamientos del CCR según su fase de progresión. Imagen modificada de (ISOFOL, 2022).

1.2.3 Tratamientos del CCR

En la fase inicial del CCR los pólipos pueden ser extirpados a través de una colonoscopia (Dumoulin et al., 2014). Sin embargo, cuando el CCR está en etapas más avanzadas, es necesario realizar una intervención quirúrgica llamada colectomía, donde el grado de extirpación del colon variará según el grado de avance del cáncer (Figura 3) (Simpson & Scholefield, 2008).

Posterior a la cirugía se utilizan tratamientos adyuvantes para aumentar la esperanza de vida del paciente, conocidos como quimioterapia, los cuales ayudan a destruir las células cancerosas que pudieron quedar tras la operación (Simpson & Scholefield, 2008). El fármaco más usado para estos tratamientos en el CCR es el 5-fluorouracilo (5-FU), el cual fue reportado a fines de la década de los 50 como un nuevo derivado con una importante actividad inhibitoria de tumores (Heidelberger et al., 1957). Es considerado un antimetabolito, ya que inhibe a la enzima timidilato sintasa, impidiendo la formación del nucleótido dTTP y consecuentemente afectando al proceso de replicación del ADN (Heidelberger et al., 1957; Wolpin & Mayer, 2008). La eficacia de 5-FU aumenta de manera intravenosa y es capaz de aumentar de 10 a 12 meses la esperanza de vida del paciente (Wolpin & Mayer, 2008). Estudios clínicos posteriores demostraron que la actividad de 5-FU se potencia al administrarse junto con leucovorina, una forma de ácido fólico que favorece la unión del 5-FU a la enzima timidilato sintasa (Piedbois et al., 1992; Wolmark et al., 1993). Con este tratamiento han sobrevivido entre 51 a 61% de los pacientes, tras 5 años de realizar la cirugía (Wolpin & Mayer, 2008). Posteriormente se agregó a este último tratamiento de CCR el compuesto oxaliplatino, el cual es capaz de formar un aducto de ADN, es decir, se une covalentemente al ADN y conlleva a la apoptosis celular; esta última combinación de fármacos (5-FU más leucovorina más

oxaliplatino) ha demostrado un aumento significativo en la esperanza de vida postquirúrgica de los pacientes (André et al., 2004; Wolpin & Mayer, 2008).

Por otra parte, existen terapias dirigidas que ya se han aprobado como tratamientos de primera línea, como por ejemplo los anticuerpos cetuximab y panitumumab que están dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual es responsable de activar varias vías de señalización que favorecen la metástasis. También se han aprobado tratamientos de segunda línea con los anticuerpos bevacizumab, ziv-aflibercept y ramucirumab dirigidos contra el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis tumoral (Piawah & Venook, 2019).

Sin embargo, aún se necesitan más estudios que permitan mejorar o crear nuevos tratamientos, no solo con el fin de aumentar la esperanza de vida del paciente, sino también para disminuir los efectos secundarios nocivos asociados a la quimioterapia.

1.3 Búsqueda de nuevos fármacos para el CCR

1.3.1 Criterios generales de búsqueda de un anticancerígeno

Los fármacos anticancerígenos están diseñados para ocasionar un daño a nivel celular, donde una de las ventajas surge a raíz del ciclo celular acelerado que tienen las células cancerígenas, ya que cualquier daño que ocurra sobre la célula lo traspasaran rápidamente a la siguiente generación. Es por ello que, en el proceso de descubrimiento de estos nuevos fármacos anticancerígenos, la detección de la apoptosis juega un papel crucial (Carneiro & El-Deiry, 2020). La apoptosis es un proceso de muerte celular programado que es regulado por proteasas llamadas caspasas y puede ocurrir mediante dos vías: la vía extrínseca, a través de receptores de la membrana celular que detectan a ligandos específicos, que gatillan a su vez la activación de las caspasas iniciadoras como la caspasa 8; o bien, mediante la vía intrínseca, la cual se gatilla por un daño a la membrana mitocondrial que induce la liberación de citocromo C que activa a su vez a la

caspasa iniciadora, caspasa 9 (Ashkenazi & Salvesen, 2014; Hengartner, 2000). Ambas vías llevan a la activación de las caspasas ejecutoras o efectoras (caspasa 3, 6 y 7), las cuales finalmente se encargan de inactivar a su blanco mediante la escisión proteica en un sitio de Asp-X (Hengartner, 2000). Este proceso está bien caracterizado morfológicamente, donde se ha visto que la célula comienza a contraerse y en su etapa final se empaqueta en un cuerpo apoptótico para su posterior degradación por fagocitos, causando una mínima respuesta inflamatoria (Ashkenazi & Salvesen, 2014).

Otro proceso de muerte celular bien estudiado, pero menos deseado en un fármaco anticancerígeno, es la necrosis. Este proceso no programado tiene como característica más distintiva la ruptura de la membrana plasmática, provocando una lisis celular que libera el contenido intracelular al medio extracelular (Ashkenazi & Salvesen, 2014). A causa de ello, se liberan patrones moleculares asociados al daño que activan al sistema inmune y producen una respuesta inflamatoria (Kono & Rock, 2008).

Por otra parte, hay otros mecanismos celulares de muerte menos conocidos, pero que actualmente están tomando más fuerza en la investigación del cáncer: la piroptosis, que es una muerte celular programada como la apoptosis, dependiente de la caspasa 1, pero que conlleva un proceso inflamatorio (Yu et al., 2021); la metuosis que desplaza el contenido citoplasmático en vacuolas, mientras la célula desestabiliza la membrana plasmática como en la necrosis (Maltese & Overmeyer, 2014); la necroptosis que es un proceso regulado como la apoptosis, pero morfológicamente se comporta como la necrosis (Ashkenazi & Salvesen, 2014); entre otros procesos de muerte.

En esta búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticancerígena en CCR hay una línea atractiva que está basada en el uso de compuestos naturales. Por ejemplo, se ha reportado que el ácido maslínico (un lípido presente en la piel de aceitunas) puede inhibir el crecimiento *in vitro* en las líneas celulares HT-29 y HCT 116 de CCR, causando

un proceso de apoptosis en esta última línea (Ooi et al., 2021). También se ha estudiado a un aminoácido derivado que es altamente abundante en hongos, la ergotioneína, el cual es muy probable que induzca un proceso de necroptosis en las células de CCR HT-29, LoVo y SW620 (D'Onofrio et al., 2022).

1.3.2 Alcaloides de *Peumus boldus* como nueva aproximación farmacológica

Peumus boldus Molina, más conocido como boldo, es un árbol endémico de Chile que se encuentra distribuido abundantemente entre Curicó y Bío-Bío. Este árbol tiene un amplio follaje de hojas perennes, las cuales históricamente han sido empleadas para distintas afecciones, principalmente en infusiones para tratar problemas digestivos y hepáticos (Figura 4) (Hoffmann et al., 1992). Con el tiempo se realizaron estudios con los extractos metanólicos de las hojas, exhibiendo una protección del ADN tras la exposición a radicales libres y radiación UV, así como una inhibición del crecimiento *in vitro* de células de melanoma (Russo et al., 2011).

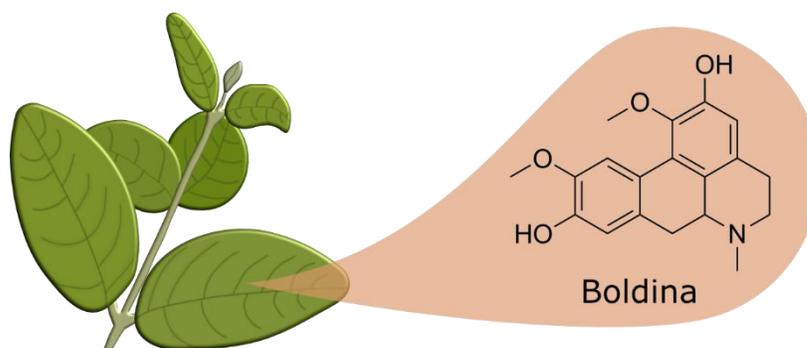


Figura 4. Esquema de las hojas de *Peumus boldus* Molina, junto con la estructura química del alcaloide boldina.

Actualmente se sabe que *P. boldus* presenta variados metabolitos secundarios, como catequinas, epicatequinas, procianidinas y compuestos fenólicos presentes en su aceite esencial (Cassels et al., 2018). Así mismo, se han reportado alrededor de 22 alcaloides presentes en diversos órganos de *P. boldus*, donde sus cantidades varían según el sexo,

edad y órgano del árbol (Cassels et al., 2018; Fuentes-Barros et al., 2018). Específicamente en las hojas se ha indicado que predominan fuertemente los alcaloides N-metillaurotetanina y laurotetanina, mientras que el alcaloide boldina está en muy bajas concentraciones en este órgano (Cassels & Cassels, 2021; Fuentes-Barros et al., 2018). Sin embargo, dada la creencia popular de que boldina es uno de los principales compuestos de las hojas de *P. boldus* -y el responsable de sus efectos beneficiosos- es que ha sido un compuesto ampliamente estudiado.

1.3.3 Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de boldina

La boldina ((S)-2,9-Dihydroxy-1,10-dimethoxy-aporphine) es un alcaloide aporfina que se encuentra de forma abundante en la corteza y madera del árbol *P. boldus* (Figura 4) (Fuentes-Barros et al., 2018). Varios estudios con este compuesto lo han catalogado como un buen antioxidante, teniendo un 35,6% de actividad antioxidante en la fracción de alcaloides extraída de *P. boldus*, siendo el principal compuesto responsable de esta actividad (Quezada et al., 2004). Además, tiene eficacia para eliminar los radicales libres de hidroxilo e incluso inhibir la autooxidación espontánea de los lípidos en la membrana, sin embargo, no puede eliminar los radicales superóxidos (O'Brien et al., 2006).

Adicional a su poder antioxidante, un estudio demostró que la boldina tiene una actividad antiinflamatoria significativa al ser administrado oralmente en cobaya y, más aún, este alcaloide resultó ser tan solo un orden de magnitud menos potente que el naproxeno, un antiinflamatorio comercial. En este mismo estudio se indicó que boldina tiene un efecto antipirético al prevenir el aumento de la temperatura en un modelo de conejos, aunque su efecto fue de corta duración en comparación con la actividad antiinflamatoria del mismo compuesto (Backhouse et al., 1994). A partir de estas propiedades beneficiosas de la boldina, es que el camino natural fue seguir indagando en otras características, como lo es su posible actividad como anticancerígeno.

1.3.4 Boldina como anticancerígeno

Estudios *in vitro* con boldina han reportado que este alcaloide es capaz de disminuir la viabilidad en células de cáncer de próstata, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de mama y carcinoma urotelial de vejiga (Garbarino et al., 2008; Gerhardt et al., 2014; Paydar et al., 2014; Venera et al., 2019). También se ha evidenciado en estudios *in vivo* que boldina reduce el tamaño de los tumores en un modelo de glioma en rata, sin causar daños a nivel hepático, y en cáncer de mama (Gerhardt et al., 2013; Paydar et al., 2014). Por otra parte, pese a que no hay muchos estudios farmacocinéticos de boldina, se sabe que tanto *in vitro* como *in vivo* este compuesto desaparece rápidamente (Jiménez & Speisky, 2000). Por lo tanto, se requieren nuevas estrategias para mejorar su potencial uso clínico.

Específicamente en CCR aún no se han reportado estudios sobre el efecto de este alcaloide, pero dado los antecedentes descritos, nos sugieren que también podría tener una actividad anticancerígena. Adicionalmente, hay antecedentes que vinculan a boldina con una actividad inhibitoria sobre la proteína CK2 implicada en el CCR, con una concentración media inhibitoria (IC₅₀) de 700 nM (Ahmed et al., 2015). Esto se ve respaldado por la reciente cristalización de la subunidad α de CK2 interactuando directamente con boldina, observándose que el alcaloide ocupa un espacio importante en el bolsillo de unión a ATP de la proteína, por lo que los autores sugirieron que es un compuesto interesante de estudiar para intentar provocar la ocupación total de este sitio (Battistutta & Lolli, 2019). Estos antecedentes llevaron a diseñar diferentes sustituciones moleculares para boldina, con el fin de que la nueva estructura pueda encajar de mejor forma con el bolsillo de unión a ATP de CK2. De esta forma se sintetizaron nuevos derivados de boldina, que en conjunto con boldina, se evaluarán en cuanto a sus efectos *in vitro* como potenciales anticancerígenos del CCR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Definir *in vitro* en la línea celular de cáncer colorrectal DLD-1 si boldina y algunos de sus derivados tienen un efecto en la proliferación y viabilidad celular.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Analizar si boldina y sus derivados disminuyen la proliferación celular.
2. Estudiar si boldina y sus derivados promueven la necrosis celular.
3. Evaluar si boldina y sus derivados gatillan la apoptosis celular y definir la vía de señalización específica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Compuestos Químicos

La boldina, el análisis de modificación estructural y síntesis química de los 27 derivados fue realizado por los colaboradores del Laboratorio de Transformación Celular, Dr. Cristián Suárez-Rozas, Dr. Edwin Pérez y Dr. Bruce K. Cassels. Boldina fue modificada en uno de sus grupos hidroxilo con grupos arilo que tienen distintos sustituyentes, los cuales a su vez se posicionaron en meta, para u orto respecto del grupo químico principal para aumentar la variabilidad estructural. Todos estos compuestos fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración stock de 100 mM y se mantuvieron almacenados a 4°C.

Los compuestos CX-4945 (ApexBio Technology, CAS 1009820-21-6) y 5-FU (Sigma, CAS 51-21-8) fueron disueltos en DMSO a una concentración stock de 100 y 300 mM, respectivamente. Ambas diluciones se almacenaron a -20°C.

Los compuestos fueron diluidos el mismo día de experimentación a las concentraciones requeridas para cada experimento. Esto se realizó a partir de la solución stock en medio completo: medio RPMI-1640 ATCCMod (Gibco™), suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina y estreptomina).

3.2 Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma colorrectal DLD-1 (ATCC CCL-221), proporcionada por J. Silvio Gutkind (*Department of Pharmacology, UC San Diego Moores Cancer Center*) y la línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1, por sus siglas en inglés (ATCC CCL-61) donadas por M. Molina (Universidad de Chile). Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1640 ATCCMod (Gibco™) suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina y estreptomina) a 37°C y 5% de

CO₂. Para el pasaje celular se lavaron las células con buffer fosfato salino 1X y posteriormente se añadió Tripsina-EDTA (0,05%, Gibco™). Se incubó en la estufa a 37°C, 5% CO₂, durante 3 a 5 minutos y se detuvo la tripsinización con medio completo. El conteo celular se realizó manualmente con una cámara de Neubauer, utilizando un volumen de azul de tripán 0,4% y un volumen de dilución de células.

3.3 Viabilidad Celular

Tanto las células de la línea DLD-1 como la línea CHO-K1 fueron cultivadas en placas transparentes de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo. Al día siguiente se cambió el medio de estas placas por diferentes diluciones de boldina y sus derivados a concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 µM, así como diluciones del fármaco 5-FU (0, 25, 50, 75 y 100 µM) y CX-4945 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µM). Se dejó incubar por 24 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se realizó un ensayo MTS con *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor y dejando incubar las células con el reactivo durante 3 h a 37°C y 5% CO₂. La viabilidad celular fue cuantificada a 490 nm en el lector de placas *Tecan's NanoQuant Plate*.

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se utilizó la siguiente relación:

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{Absorbancia\ experimental\ 490\ nm * 100}{Absorbancia\ control\ negativo\ 490\ nm} \quad (1)$$

3.4 Citotoxicidad Celular

Las células DLD-1 se cultivaron en placas transparentes de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo. Posterior a la adhesión celular, se cambió el medio de estas placas por diluciones de boldina y sus derivados a una concentración IC₅₀. Se incubó a diferentes tiempos según el experimento (1, 3, 5, 7 o 24 h) a 37°C y 5% CO₂.

Tras la incubación se recuperó el medio de cultivo y se transfirió a una nueva placa. Se siguieron las indicaciones del proveedor del ensayo *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega) para cuantificar la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La absorbancia fue medida a 490 nm en el lector *Tecan's NanoQuant Plate*. Para calcular el porcentaje de citotoxicidad celular se utilizó la siguiente relación:

$$\% \text{Citotoxicidad celular} = \frac{\text{Absorbancia experimental 490 nm} * 100}{\text{Absorbancia control positivo 490 nm}} \quad (2)$$

3.5 Apoptosis Celular

Para la medición de la actividad de las caspasas efectoras se cultivaron células DLD-1 en placas blancas de 96 pocillos a una densidad de 15.000 células por pocillo. Posterior a la adhesión celular, se cambió el medio de estas placas por diluciones de boldina y sus derivados a una concentración IC_{50} . Se incubó por 24 h, a 37°C y 5% CO_2 y se realizó el ensayo *Caspase-Glo® 3/7 Assay* (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor. La luminiscencia fue medida en el luminómetro *Synergy 2*.

Para reconocer las vías específicas de la apoptosis, se cultivaron células DLD-1 en placas blancas de 96 pocillos a una densidad de 25.000 células por pocillo. Al día siguiente, se cambió el medio de estas placas por diluciones de boldina y sus derivados a una concentración IC_{50} . Se incubó por 2, 4, 6, 8, 20 y 24h, a 37°C y 5% CO_2 . Para la vía extrínseca se realizó el ensayo *Caspase-Glo® 8 Assay* (Promega), mientras que para la vía intrínseca se realizó el ensayo *Caspase-Glo® 9 Assay* (Promega). En ambos casos se siguieron las indicaciones del proveedor y se midió la luminiscencia en el luminómetro *Synergy 2*.

3.6 Citometría de Flujo para medir la proliferación celular

Las células DLD-1 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células por pocillo. Una vez adheridas las células, se cambió el medio por diluciones de boldina y sus derivados a una concentración IC₅₀. Transcurridas 24 h se recuperó el medio de cultivo junto a las células DLD-1 y se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y al pellet de células resultante se le agregó una solución de yoduro de propidio 10 µg/mL diluido en líquido envolvente para citometría BD™ FACSFlow™. Para el control positivo se agregó metanol frío a -20°C al pellet de células y se dejó incubar en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. A este pellet de células se le agregó, al igual que las muestras, la solución de yoduro de propidio 10 µg/mL. Las muestras fueron dejadas en hielo hasta la lectura en el citómetro de flujo BD FACSCanto™, donde se registraron 10.000 eventos por muestra.

3.7 Análisis de resultados

Los resultados presentados en este seminario corresponden al promedio de triplicados de un experimento ± desviación estándar (SD).

4. RESULTADOS

4.1 OE 1: Analizar si boldina y sus derivados disminuyen la proliferación celular

4.1.1 Viabilidad de la línea celular de cáncer colorrectal DLD-1

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de boldina sobre las células de CCR en la línea celular DLD-1 por 24 h. Tras la cuantificación y análisis del ensayo MTS, se observó que a mayor concentración de boldina había un menor porcentaje de viabilidad de las células DLD-1. Sin embargo, a la máxima concentración de boldina ensayada (100 μM), las células aún presentaban un alto porcentaje de viabilidad, con un 58,98% (Figura 5). Como comparativa a este resultado, se ensayó la viabilidad celular con CX-4945, un inhibidor de CK2, el cual presentó un descenso más notorio, llegando a 37,76% de viabilidad celular a la misma concentración máxima ensayada. Adicionalmente, el fármaco 5-FU tuvo una viabilidad de 64,59% a 100 μM , un efecto poco pronunciado a como se esperaba dado que es el actual fármaco empleado en quimioterapia.

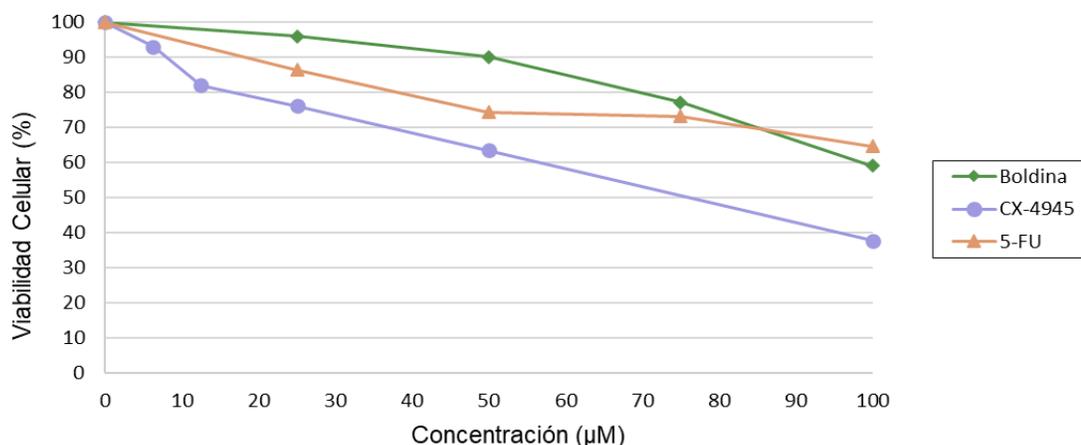


Figura 5. Viabilidad de la línea celular DLD-1 frente a boldina y otros compuestos. Para boldina y 5-FU (actual quimioterapéutico de CCR) se ensayaron 5 concentraciones diferentes (0, 25, 50, 75 y 100 μM), mientras que para CX-4945 (inhibidor de CK2) se ensayaron 6 concentraciones (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 μM). Se incubaron las células en presencia de estos compuestos por 24 h y posteriormente se cuantificó la viabilidad celular con un ensayo MTS.

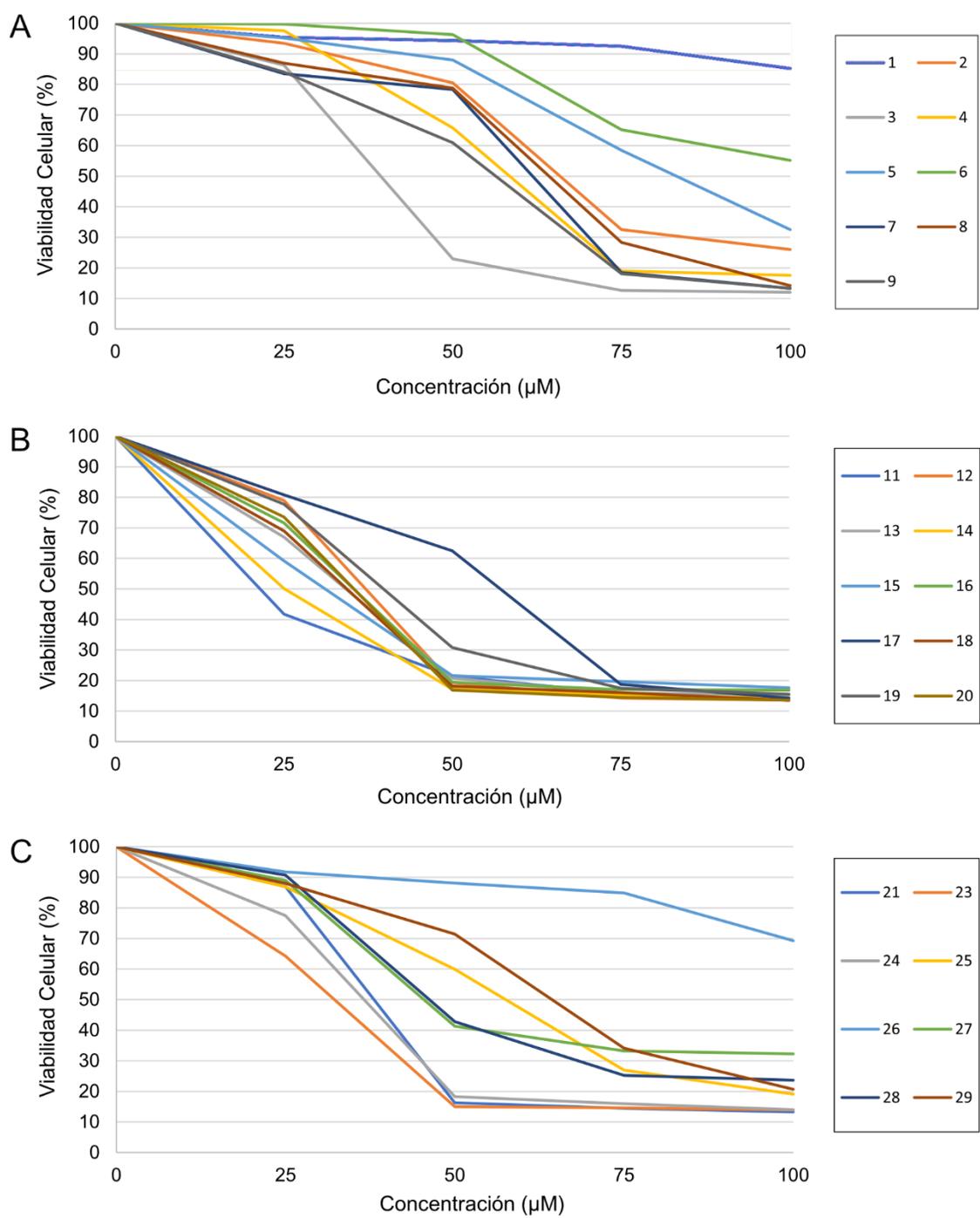


Figura 6. Viabilidad de la línea celular DLD-1 frente a los derivados de boldina. Los derivados se ensayaron a 5 concentraciones diferentes (0, 25, 50, 75 y 100 µM) y fueron incubados por 24 h. La viabilidad celular fue cuantificada tras realizar un ensayo MTS. **A.** Derivados 1 al 9. **B.** Derivados 11 al 20. **C.** Derivados 21 al 29.

Luego, se evaluó el efecto sobre la viabilidad de las células DLD-1 de los 27 derivados de boldina que lograron ser sintetizados, observando que ocurría una disminución diferencial sobre este parámetro dependiendo del compuesto utilizado (Figura 6). Los derivados 1 y 26 llamaron la atención por no causar un efecto notorio sobre la viabilidad, siendo incluso menos nocivos que boldina, alcanzando un 85,24 y 69,29% de viabilidad celular, respectivamente. En cambio, varios otros compuestos tuvieron un efecto más pronunciado, donde los compuestos 3, 11 y 23 destacaron por estar bajo el 20% de viabilidad celular.

El IC₅₀ es la concentración donde ocurre el 50% de viabilidad celular, el cual fue determinado para los diferentes derivados de boldina (Tabla 1). Los compuestos 11 y 14 exhibieron una mayor potencia inhibitoria, con 21,78 µM y 25,10 µM, respectivamente, seguido de los compuestos 15 y 23 con 31,02 y 33 µM, respectivamente.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ para los derivados de boldina en la línea celular DLD-1. Las concentraciones de IC₅₀ fueron obtenidas a partir del ensayo de viabilidad celular (Figura 6). N.S indica que el compuesto no ha sido sintetizado para este estudio.

N° Compuesto	IC ₅₀ (µM)	N° Compuesto	IC ₅₀ (µM)	N° Compuesto	IC ₅₀ (µM)
1	100,00	11	21,78	21	38,28
2	54,00	12	37,62	22	N.S.
3	43,00	13	34,32	23	33,00
4	46,50	14	25,10	24	37,62
5	68,75	15	31,02	25	58,74
6	100,00	16	35,64	26	100,00
7	62,04	17	57,42	27	46,2
8	64,02	18	34,32	28	46,86
9	56,76	19	40,26	29	65,34
10	N.S.	20	35,64		

En el caso de boldina y los derivados 1, 6 y 26, se registró en la (Tabla 1) un IC_{50} de 100 μ M, el cual no corresponde a la concentración donde ocurre el 50% de viabilidad celular, sin embargo, es la máxima concentración ensayada en este estudio y se tomó como concentración base para los estudios que vienen posteriormente.

4.1.2 Viabilidad de la línea no-tumoral CHO-K1 frente a boldina y sus derivados

A modo de complementar el objetivo 1 e ir más allá en la investigación, nos preguntamos si el comportamiento de boldina y sus derivados sería diferencial en una línea celular no tumoral, ya que se espera que un buen compuesto candidato a quimioterapia afecte en mayor medida a las células cancerosas y no a las sanas. Para esto se ensayaron las mismas condiciones de viabilidad celular empleadas en la línea DLD-1, esta vez sobre la línea no tumoral CHO-K1 (Figura A. 1).

Se observó en el caso de boldina que la viabilidad celular se mantuvo sobre el 70% a todas las concentraciones ensayadas, un porcentaje mayor que en las células de CCR. Así mismo, el fármaco 5-FU mostró un efecto bajo sobre la viabilidad en comparación con la línea DLD-1, llegando a un 88,98% a los 100 μ M. Finalmente, CX-4945 fue el compuesto que mostró un efecto más notorio sobre la viabilidad de CHO-K1, alcanzando un 48,82% a la concentración máxima de ensayo.

En cuanto a los derivados de boldina, al igual que con las células DLD-1, se observó un comportamiento diferencial para cada compuesto (Figura A. 2). En esta línea celular nuevamente el compuesto 26 tuvo una tendencia similar a boldina, así como los compuestos 3 y 23 nuevamente mostraron una gran potencia inhibitoria sobre las células normales al estar bajo el 20% de viabilidad celular. Por lo tanto, estos compuestos mencionados no estarían gatillando un efecto diferencial entre la línea tumoral DLD-1 y la línea no tumoral CHOK-1.

4.2 OE 2: Estudiar si boldina y sus derivados promueven la necrosis celular

Conocido el efecto de todos los compuestos sobre la viabilidad celular, quisimos determinar el mecanismo general de daño celular, partiendo por la pregunta de si los compuestos estarían causando muerte por necrosis. Dado que la necrosis se caracteriza por liberar el contenido citoplasmático al medio extracelular, es ampliamente utilizada la técnica de detección de la enzima citoplasmática LDH como indicativo del daño a la membrana plasmática (Chan et al., 2013). Por lo tanto, para cumplir este objetivo se realizó un experimento de detección de LDH en las células expuestas a los distintos tratamientos, utilizando la concentración IC_{50} calculada con anterioridad (Tabla 1).

En primer lugar, fue necesario estandarizar los tiempos de medición del ensayo, ya que el fabricante únicamente recomendaba no exceder las 9 h de medición, tiempo correspondiente a la vida media de la LDH. Entonces, se realizó un ensayo con boldina y el derivado 23, uno de los que mostró mayor potencia inhibitoria de la viabilidad en la línea DLD-1. La medición de LDH se realizó tras la incubación de las células en presencia de estos compuestos por 1, 3, 5 y 7 h. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad y se observó que este disminuyó después de la primera medición (1 h) y se mantuvo relativamente constante desde las 3 h hasta las 7 h, incluido el control negativo (Figura 7). En consecuencia, hay una estabilidad para la detección de LDH en la línea DLD-1 a partir de las 3 h, por lo que se seleccionó este tiempo para el ensayo de citotoxicidad posterior.

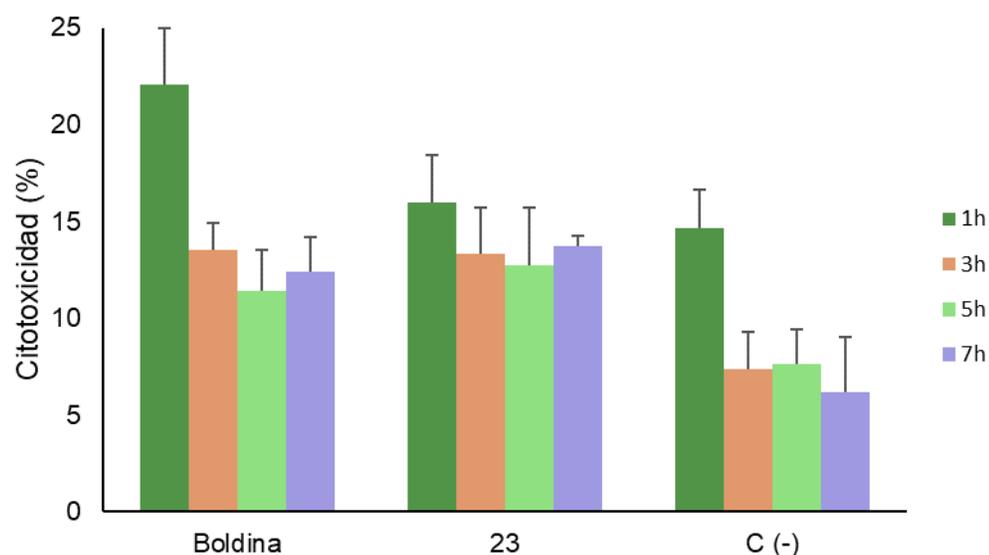


Figura 7. Ensayo de estandarización de tiempos para medir LDH en la línea celular DLD-1. El ensayo de citotoxicidad fue realizado a cuatro tiempos (1, 3, 5 y 7 h) con células incubadas en presencia de boldina o del derivado 23, ambos a una concentración de IC_{50} . Para el control negativo se emplearon células DLD-1 sin tratamiento. Datos representan el promedio \pm SD.

Una vez estandarizado el ensayo, se procedió a cuantificar la liberación de LDH para boldina y cada uno de los derivados en estudio. La gran mayoría de los compuestos presentó un porcentaje de citotoxicidad similar al control negativo, ya que rondaban el 20%, por lo cual no estarían gatillando necrosis (Figura 8). Sin embargo, destacan claramente los derivados 3 y 21 por superar el 100% de citotoxicidad, es decir, estos compuestos son más citotóxicos que el control positivo propio del kit comercial y, por lo tanto, presentan una elevada actividad necrótica en células DLD-1.

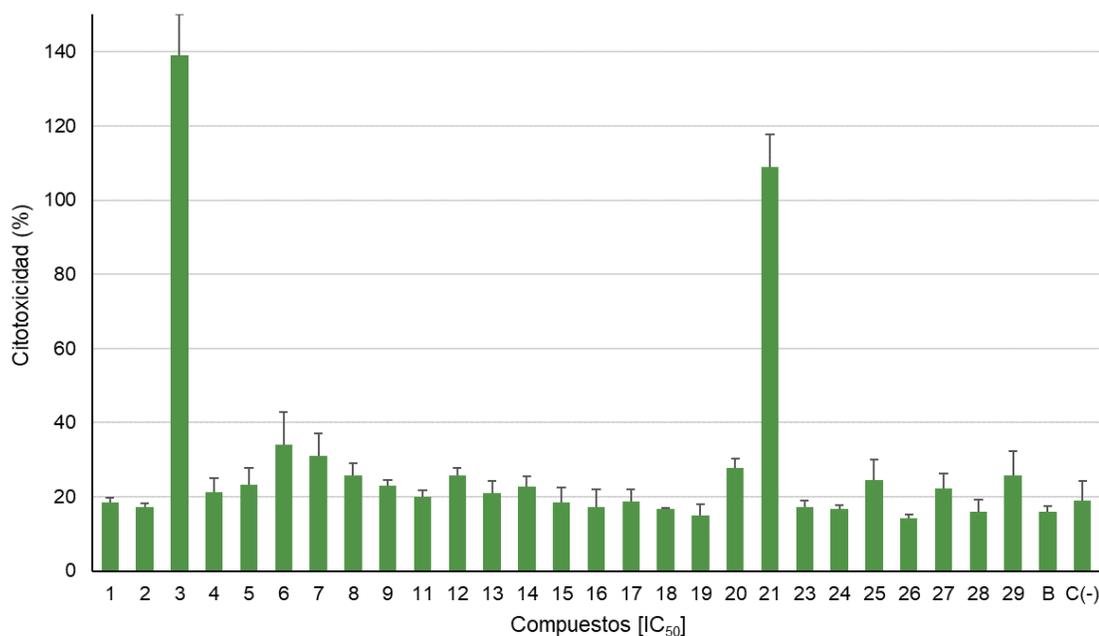


Figura 8. Citotoxicidad celular en la línea celular DLD-1 en presencia de boldina y de los distintos derivados. Las células DLD-1 se incubaron en presencia de boldina (B) y sus derivados a una concentración de IC_{50} durante 3 h. Para el control negativo se emplearon células DLD-1 sin tratamiento. Datos representan el promedio \pm SD.

4.3 OE 3: Evaluar si boldina y sus derivados gatillan la apoptosis celular y definir la vía específica

4.3.1 Activación de caspasas efectoras en la línea celular DLD-1

Antes de evaluar si se estaba gatillando el segundo proceso probable de muerte celular, es decir, la apoptosis en las células de CCR en presencia de los compuestos, fue necesario generar un protocolo de uso del equipo de luminiscencia y, en simultáneo, corroborar su funcionamiento. Para ello se utilizaron diferentes diluciones del anticuerpo m-IgGk BP-HRP en presencia del reactivo luminol, el cual es catalizado por la subunidad HRP del anticuerpo. Los resultados se asemejan a una curva gaussiana y mostraron la pérdida de luminiscencia al aumentar los tiempos de medición, comportamiento característico del reactivo (Figura A. 3). Por lo tanto, estos resultados permitieron verificar la correcta funcionalidad del equipo.

Para evaluar si los compuestos estaban gatillando la activación de las caspasas efectoras, es decir, aquellas responsables de ejecutar el proceso final de la cascada de apoptosis, se seleccionaron dos derivados como buenos candidatos anticancerígenos de CCR: 11 y 23. Estos fueron elegidos por presentar una de las mayores potencias inhibitorias de viabilidad en la línea celular DLD-1, junto con un bajo porcentaje de citotoxicidad celular ($\leq 20\%$) (Figura 6.B, Figura 6.C, Figura 8). Por otra parte, se seleccionaron dos compuestos altamente citotóxicos, 3 y 21, que, en conjunto con su buena potencia inhibitoria de viabilidad, son interesantes de estudiar para comparar con nuestros potenciales candidatos (Figura 6.A, Figura 6.C, Figura 8).

La boldina presentó un bajo número de unidades relativas de luminiscencia (RLU) y, al igual que en otros experimentos, exhibió un comportamiento similar al control negativo (Figura 9). De igual modo, el compuesto 11 presentó una baja luminiscencia, siendo relativamente más alto que el control negativo. Por lo tanto, boldina y el compuesto 11 no estarían gatillaron una activación de las caspasas efectoras y, por ende, no estarían activando el proceso de apoptosis a las concentraciones ensayadas. Por otra parte, el segundo de los potenciales buenos candidatos, el compuesto 23, sí mostró una alta actividad inductora de caspasas efectoras, alcanzando la máxima luminiscencia con 15.523 RLU. Por último, los compuestos 3 y 21 sorpresivamente gatillaron la apoptosis celular más de lo esperado, ya que por los resultados de citotoxicidad previos se esperaba que estos compuestos tuvieran una actividad necrótica en la célula.

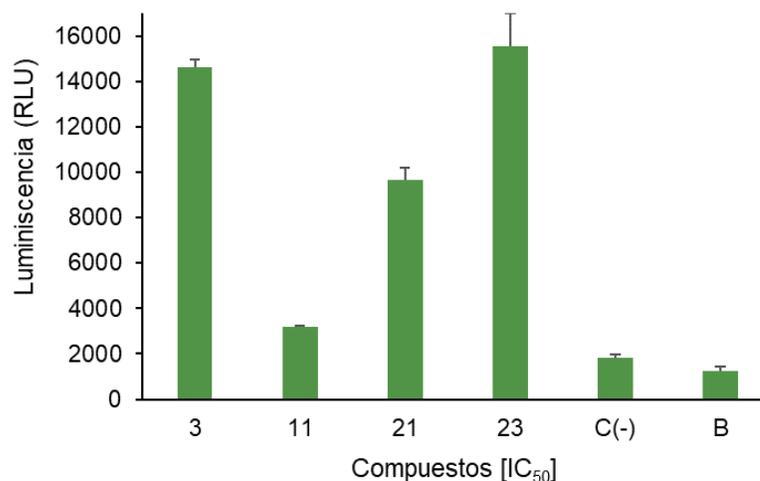


Figura 9. Detección de caspasas efectoras 3/7 en células DLD-1 en presencia de boldina y algunos derivados químicos. Se realizó una incubación de las células DLD-1 con boldina (B) y los 4 compuestos derivados a una concentración de IC₅₀ durante 24 h. Para el control negativo se emplearon células DLD-1 sin tratamiento. Datos representan el promedio ± SD.

4.3.2 Citometría de flujo para la línea celular DLD-1

Para comparar y corroborar los distintos resultados obtenidos hasta el momento, se realizó una citometría de flujo de las células DLD-1 en presencia de boldina y específicamente los 4 derivados que se estudiaron más a fondo, tras una incubación de 24 h. Para esta técnica se empleó yoduro de propidio como agente intercalante del ADN y para el análisis se definieron tres *gates* o poblaciones celulares: viables, apoptóticas y necróticas. Los controles del experimento mostraron coherencia con lo esperado para cada *gate*, tanto control positivo de necrosis con metanol frío, así como el control negativo de células sin tratamiento, donde se esperaba el mayor porcentaje de células viables (Figura 10).

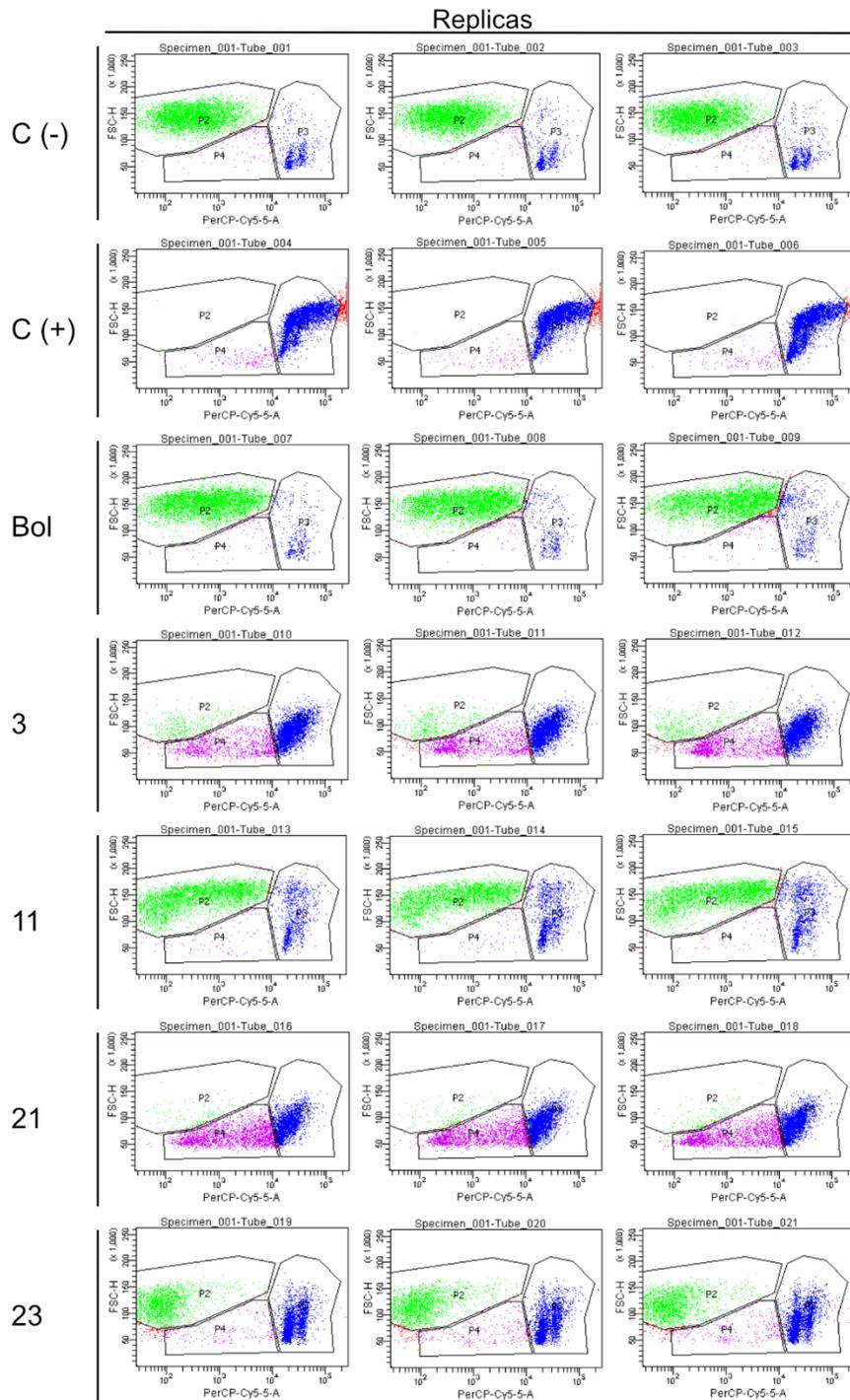


Figura 10. Citometría de flujo de la línea celular DLD-1 frente a derivados de boldina por 24 h. Se utilizó yoduro de propidio a 10 µg/ml. Población P2 (verde): células viables; población P3 (azul): células necróticas; población P4 (morado): células apoptóticas. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento. Como control positivo se utilizaron células tratadas con metanol a -20°C.

A modo de comparar de mejor forma estos resultados, se graficaron los porcentajes obtenidos para cada población celular (Figura 11). Los resultados de células viables son concordantes con los resultados previos, donde boldina exhibió un alto porcentaje de células viables, comparables con el control negativo, seguido de los derivados 11 y 23, y finalmente los derivados 3 y 21, que nuevamente mostraron un porcentaje de células viables muy bajo. Para el proceso de necrosis, 3 y 21 siguen la tendencia observada con anterioridad, aunque se observó un porcentaje importante de células apoptóticas. Por otra parte, llamó la atención la predominancia de células necróticas para el compuesto 23, que contrasta con los resultados previos.

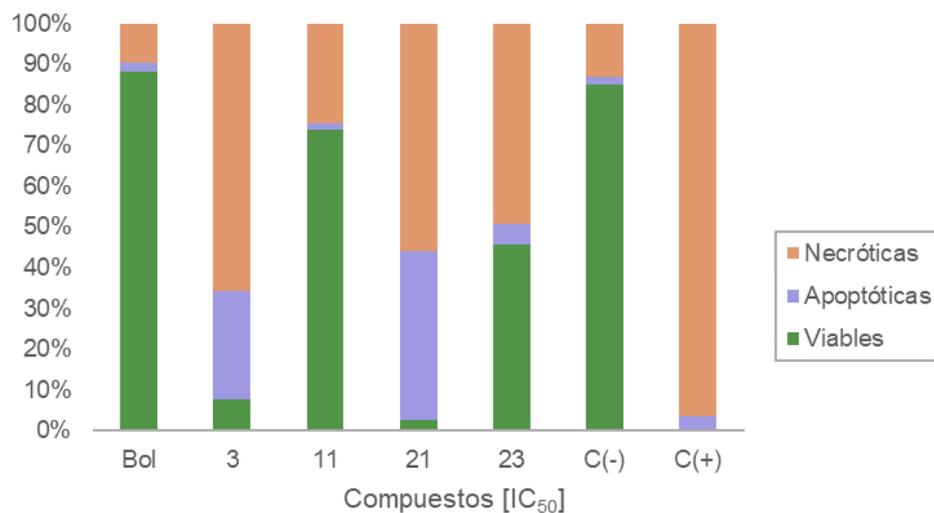


Figura 11. Porcentajes poblacionales tras el tratamiento con boldina (Bol) y cuatro derivados en células DLD-1 por 24 h. Los porcentajes se obtuvieron automáticamente en la citometría de flujo (Figura 10), a partir del número de eventos de cada *gate* respecto a los 10.000 eventos totales cuantificados.

4.3.3 Activación de caspasas iniciadoras

A modo de esclarecer los resultados obtenidos con el proceso de apoptosis y concluir la segunda parte del objetivo específico 3, es decir, evaluar la vía específica de este proceso, se detectaron las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca mediante la actividad de la caspasa 8 y de la vía intrínseca mediante la detección de la caspasa 9.

Para este experimento se descartó el derivado 11, ya que como se indicó anteriormente, presentó una baja actividad de caspasas efectoras y células apoptóticas por citometría de flujo.

El experimento arrojó que tanto el control negativo y la boldina gatillaron una baja actividad de las caspasas iniciadoras, lo cual es consistente con la baja actividad de caspasas efectoras analizadas anteriormente (Figura 9). Del mismo modo, se demostró una alta actividad para los derivados de boldina (Figura 12.A y Figura 12.B).

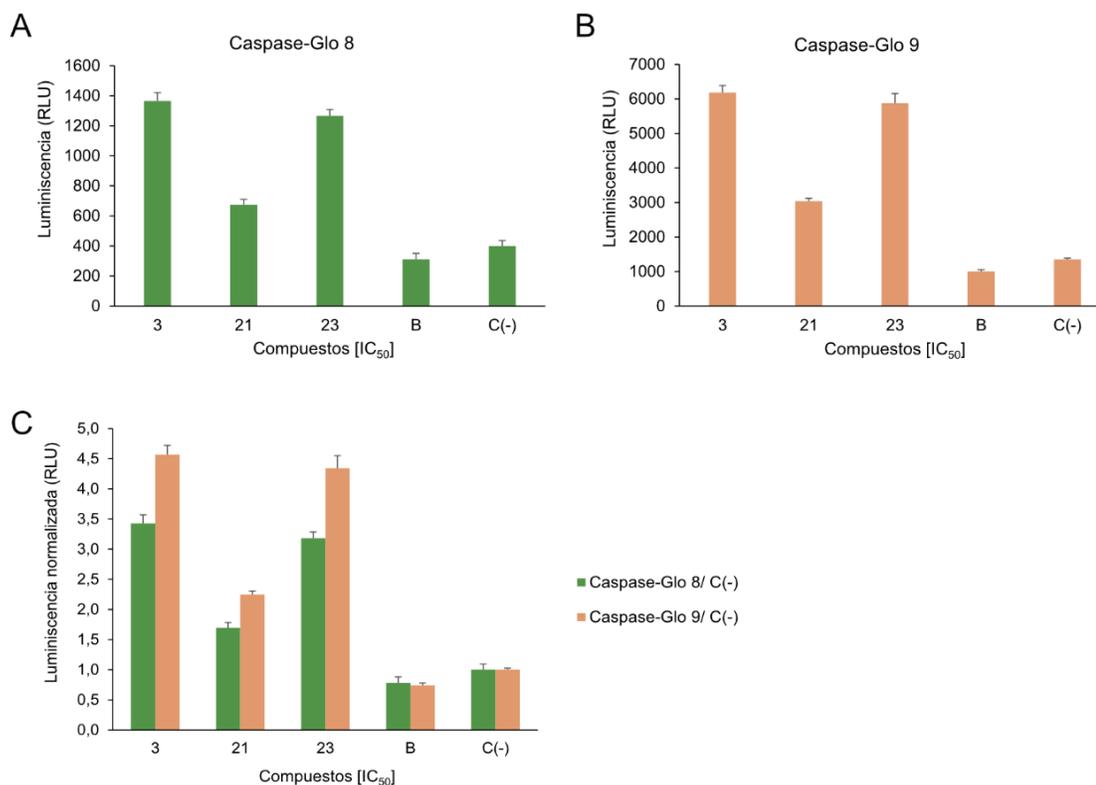


Figura 12. Detección de caspasas iniciadoras 8 y 9 en células DLD-1, en presencia de boldina y tres de sus derivados. Se realizó una incubación de las células DLD-1 con boldina (B) y los 3 compuestos a una concentración de IC₅₀ durante 24 h. Para el control negativo se emplearon células DLD-1 sin tratamiento. A. Actividad para la vía extrínseca B. Actividad de la vía intrínseca C. Actividad normalizada de las caspasas para comparar su actividad. Datos representan el promedio ± SD.

Con el objetivo de establecer que vía fue la predominante en este proceso, se normalizó la actividad de las caspasas iniciadoras en base a su control negativo, observándose para nuestra sorpresa que ambas vías se encuentran gatilladas en simultáneo a las 24 h, y en primera instancia se podría indicar que la vía intrínseca está predominando (Figura 12.C). Sin embargo, actualmente se sabe que la caspasa 8 es capaz de disociar a la proteína Bid, la que a su vez activa a la vía intrínseca (Ashkenazi & Salvesen, 2014), por lo que es natural preguntarse si la actividad observada es debido únicamente al compuesto que gatilla directamente la vía intrínseca, o bien, es un efecto retardado de la activación de la vía extrínseca que activó a la vía intrínseca debido al tiempo de incubación de las células.

Entonces, para poder dilucidar que vía se activa primero, se realizó la incubación de los compuestos a distintos tiempos hasta llegar a las 20 h. Para el compuesto 3 y 21 se observó desde las 2 h una elevada y estable activación de la actividad de ambas caspasas, que al cabo de las 8 h comienza a descender (Figura 13.A y Figura 13.B). Sin embargo, no se puede determinar qué vía es gatillada primero, ya que la diferencia de luminiscencia entre ambas caspasas es muy pequeña. Por otra parte, el compuesto 23 presentó un ascenso gradual de la actividad de ambas caspasas, donde al cabo de 8 h comenzaron a diferenciarse, siendo la caspasa 9 la que comienza a activarse en mayor cantidad (Figura 13.C).

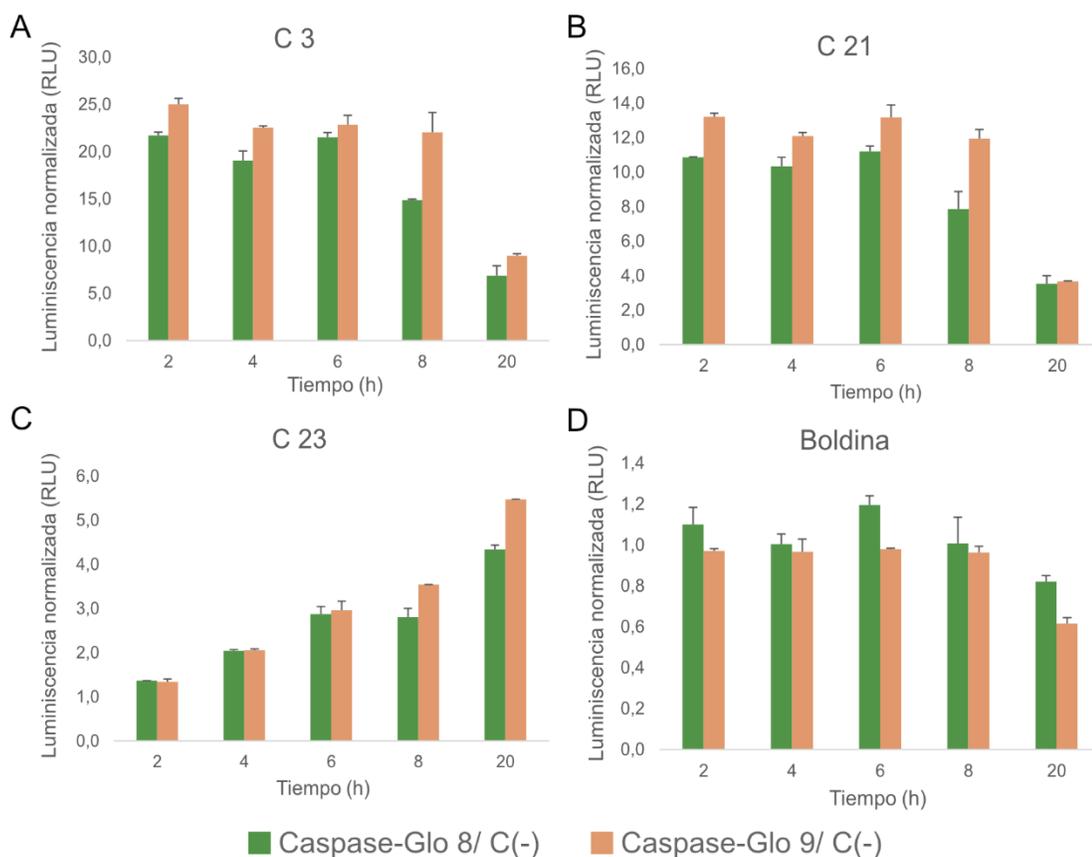


Figura 13. Detección temporal de las caspasas iniciadoras en células DLD-1, en presencia de boldina y tres derivados. Se realizó una incubación de las células DLD-1 con boldina y los 3 compuestos derivados a una concentración de IC_{50} durante un gradiente de tiempo. La luminiscencia se encuentra normalizada en base al control negativo de cada experimento. Datos representan el promedio \pm SD.

Finalmente, la boldina gatilló la activación estable de ambas caspasas hasta las 8 h, decayendo a las 20 h (Figura 13.D). En este caso la cantidad de luminiscencia fue bastante baja, como ya se había indicado previamente, y no se observó una diferencia temporal de activación de caspasas. Por lo tanto, lamentablemente estos datos dejan abierta la interrogante de cuál es la vía predominante o causante del proceso apoptótico.

5. DISCUSIÓN

La preocupación por el número creciente de pacientes diagnosticados con CCR ha causado una búsqueda activa de potenciales fármacos anticancerígenos que ayuden a tratar de mejor forma esta patología. Dentro de los compuestos derivados de productos naturales, el alcaloide boldina ha comenzado a ser estudiado como posible anticancerígeno en varios tipos de cáncer (Garbarino et al., 2008; Gerhardt et al., 2013, 2014; Paydar et al., 2014; Venera et al., 2019). A nuestro saber, no se han reportado estudios del efecto de boldina sobre el CCR y sumado a los antecedentes que lo involucran con la posible inhibición de la proteína CK2 (Ahmed et al., 2015; Battistutta & Lolli, 2019), lo hacen un buen candidato de estudio.

Los resultados aquí presentados indicaron que a la máxima concentración estudiada de boldina (100 μ M), este compuesto no fue tan nocivo sobre la viabilidad celular para la línea tumoral DLD-1 en comparación con la mayor parte de los derivados sintetizados. El ensayo MTS arrojó un 58,98% de viabilidad celular, mientras que la citometría de flujo dio un 86,6% de células viables (Figura 5, Figura 10). Si bien ambos experimentos fueron realizados a 24 h de incubación, las diferencias obtenidas pueden ser producto de la técnica empleada. Esta tendencia a disminuir la viabilidad celular podría ser causa de un posible arresto del ciclo celular en G2/M que ha sido reportado en una línea de cáncer de vejiga (Gerhardt et al., 2014). En este sentido el alcaloide podría incidir sobre la proliferación celular; sin embargo, se requieren experimentos como una citometría de flujo con Anexina V/yoduro de propidio para demostrar esta hipótesis. Además, es importante tener presente que se deben realizar curvas a mayores concentraciones de boldina a fin de encontrar su potencia inhibitoria. En este sentido, el estudio mencionado anteriormente reportó que boldina disminuye la viabilidad celular en concentraciones que

van en un rango entre 200 a 500 μM (Gerhardt et al., 2014), por lo que es bueno considerar estos valores como referencia, junto con la extrapolación de nuestros resultados.

Para comparar el efecto de boldina sobre la viabilidad celular en una línea no cancerígena, se realizó un ensayo MTS en la línea CHOK-1 (descrita para experimentos toxicológicos). Se observó que ocurría un efecto menor sobre la viabilidad celular, ya que la viabilidad alcanzó un 76,73% a 100 μM (en comparación con el 58,98% alcanzado en DLD-1), y además se observó que la curva decaía con menor pendiente (Figura A. 1). Esto indica que posiblemente se necesiten mayores concentraciones del alcaloide en esta línea celular que las necesarias en DLD-1 para llegar al 50% de viabilidad celular, lo cual es alentador, ya que idealmente un buen anticancerígeno debería causar un menor daño sobre células normales.

Al estudiar los mecanismos por los cuales comienza a bajar la viabilidad de las células DLD-1 en presencia de boldina, los resultados del ensayo de citotoxicidad mostraron un 15,98% comparable con las células sin tratamiento que alcanzaron un 19%, por lo que este compuesto no tendría actividad necrótica (Figura 8). La baja citotoxicidad puede ser a causa de que boldina puede actuar como un citoprotector, lo cual ha sido comprobado en membranas inducidas con hidróperóxido de terc-butilo donde boldina inhibe la peroxidación lipídica (Bannach et al., 1996). Por lo tanto, este alcaloide estaría produciendo un daño mínimo o nulo sobre la membrana celular, lo cual incide en la baja cantidad de LDH detectada.

En cuanto a la acción apoptótica de la boldina, está fue mínima para las concentraciones ensayadas, tanto en la activación de las caspasas iniciadoras (Figura 13) como efectoras (Figura 9). Sin embargo, otros estudios en células de cáncer de próstata han indicado que boldina tendría un efecto sobre la vía intrínseca (Venera et al., 2019), por lo cual es

importante analizar si esto es propio de otra línea cancerígena, o bien, una falta de concentración del compuesto.

Dado que los antecedentes indicaban a boldina como un inhibidor de CK2, se analizó a modo de comparación el efecto del actual inhibidor de esta proteína, CX-4945. Previamente nuestro grupo había reportado que las células DLD-1 incubadas con 25 μM de CX-4945 por 48 h, bajan su viabilidad entre 60-70%, lo cual fue correlacionado con la disminución en la proliferación (Silva-Pavez et al., 2019). Aquí se realizó el ensayo a la mitad de tiempo, donde a la misma concentración había un 76,13% de viabilidad celular (Figura 5), lo que sugiere que podría tener un mejor efecto a tiempos mayores. Asimismo, nuestro grupo reportó que CX-4945 causó menores efectos sobre una línea celular normal CoN, cuya viabilidad disminuyó tan solo un 30% (Silva-Pavez et al., 2019); en este estudio evidenciamos que las células normales CHO-K1 estabilizan su viabilidad celular alrededor de un 50%, un porcentaje mayor que en la línea DLD-1 (Figura A. 1). En cuanto a los resultados con 5-FU, esperábamos un mayor efecto sobre la línea DLD-1 dado su uso habitual en quimioterapia (Figura 5). Sin embargo, un estudio reciente con la misma línea celular reportó que 5-FU afectó poco a la viabilidad, donde a 38,43 μM la viabilidad fue cercana al 90% (Kirlangiç et al., 2022) y nuestros resultados a esa concentración son de aproximadamente un 80%. Posiblemente este fármaco tenga un mejor comportamiento en otras líneas celulares, ya que dependerá de las distintas características y/o mutaciones propias de la línea. Otro factor para considerar es la posible resistencia de las células DLD-1 frente a 5-FU, la cual reduce los niveles intracelulares de los metabolitos activos de este fármaco, FUTP y FdUMP (Inaba et al., 1998). Esta resistencia cambia el perfil lipídico y disminuye los mensajeros intracelulares de las células DLD-1, como las ceramidas que están estrechamente involucradas en varios procesos anticancerígenos (Jung et al., 2020). Asimismo, se debe tener presente

que las células podrían presentar resistencia al fármaco mediante el aumento de los transportadores de membrana tipo ABC (Glavinas et al., 2005; Pérez-Moreno et al., 2020).

A modo de mejorar el accionar de boldina como posible anticancerígeno de CCR, sumado a generar una mejor inhibición sobre la proteína CK2, se diseñaron nuevos derivados sintéticos con sustituciones de grupo arilo. Se trabajó con los 27 derivados que lograron ser sintetizados, donde a modo general, todos los compuestos presentaron un efecto distinto sobre la viabilidad de las células de CCR (Figura 6) y se observaron un número importante de compuestos con una gran potencia inhibitoria (Tabla 1). Esta variabilidad de resultados es esperable a causa de las distintas modificaciones químicas de los compuestos, de hecho, radicales iguales que están en distinta posición podrían tener efectos distintos. Este es el caso del compuesto 6 que tiene su radical en posición para y no fue posible calcular su IC_{50} a las concentraciones máximas de ensayo, mientras que el compuesto 25, que tiene el mismo radical posicionado en meta, si tuvo un efecto mayor sobre la viabilidad de las células DLD-1, obteniendo su correspondiente IC_{50} de 58,74 μ M.

En cuanto al estudio de citotoxicidad celular, los resultados fueron alentadores, ya que la mayoría de los derivados presentó una liberación de LDH en rangos semejantes al control negativo. Por lo tanto, la mayoría de estos compuestos no estarían gatillando necrosis celular y dejan abierta la posibilidad de que los resultados de la caída en la viabilidad sean debido a una muerte celular controlada como la apoptosis. En contraposición, los compuestos 3 y 21 fueron altamente necróticos, superando el umbral del 100% de citotoxicidad.

Para evaluar si efectivamente la apoptosis es el proceso responsable de la muerte celular en presencia de los compuestos, se continuó con un análisis más detallado donde

solo se utilizaron cuatro derivados. Los dos primeros compuestos corresponden al 11 y 23, catalogados como buenos candidatos anticancerígenos contra CCR por presentar la mayor potencia inhibitoria en la línea celular DLD-1 (Tabla 1), junto con un porcentaje $\leq 20\%$ de citotoxicidad celular (Figura 8).

El compuesto 11 mostró una actividad de caspasas efectoras de 3201 RLU, tan solo 1377 RLU más altas que el control negativo (Figura 9). Al analizar los resultados de citometría de flujo (Figura 10) estos también indicaron un bajo porcentaje de células apoptóticas, correspondiente a un 1,7%, en comparación con el 24,1% de células necróticas. Por lo tanto, estos resultados nos estarían indicando que este compuesto comienza a ejercer más bien un daño necrótico a las células DLD-1, lo cual contrasta con el bajo porcentaje de citotoxicidad que ya fue analizado.

El segundo de los buenos candidatos es el compuesto 23, que al contrario del compuesto 11, mostró la mayor actividad de caspasas efectoras con 15.523 RLU (Figura 9), así como una de las más altas actividades de caspasas iniciadoras (Figura 12). Estos resultados son alentadores, pues este compuesto sería un buen candidato para continuar los estudios, sin embargo, al comparar estos resultados con la citometría de flujo (Figura 10), nuevamente encontramos resultados contrastantes, ya que el mayor porcentaje de muerte indicado aquí es debido a necrosis y no a la apoptosis.

El segundo par de compuestos son el 3 y 21, los cuales tuvieron una gran potencia inhibitoria (Tabla 1), junto con un porcentaje de citotoxicidad superior al 100% (Figura 8), por lo que se esperaba una actividad de apoptosis mínima. Sorpresivamente ambos compuestos mostraron una actividad muy importante de las caspasas iniciadoras y efectoras, incluso a tiempos tempranos (Figura 9, Figura 13). Estos resultados fueron corroborados en la citometría de flujo, donde se observó claramente ambas poblaciones celulares (Figura 10).

Adicionalmente, al estudiar que vía era la responsable del proceso de apoptosis, en ninguno de los derivados estudiados que gatillaban previamente la apoptosis se logró dilucidar esto, ya que tanto la caspasa 8 como la caspasa 9 se encontraban activas desde el inicio (Figura 13). Por este motivo estos resultados de apoptosis, más los resultados contrastantes de los compuestos 3 y 11 descritos anteriormente, en conjunto con el sorprendente registro de ambas poblaciones celulares en los candidatos 3 y 21, llevan a generar una serie de interrogantes.

Una de ellas es cuestionarse si el ensayo de citotoxicidad está indicando realmente el proceso de liberación de LDH, ya que no se puede descartar el hecho de que estos compuestos estén interactuando con la enzima LDH. De ocurrir esto, se afectaría la reacción acoplada que genera la detección final y causaría los bajos porcentajes de citotoxicidad detectados en los compuestos 11 y 23, contrario a los porcentajes más altos registrados por citometría. Por lo tanto, sería bueno aplicar a futuro otra forma de medición de citotoxicidad a modo de comparar y corroborar los resultados del proceso de necrosis. Por ejemplo, se podría utilizar como marcador a la proteína box-1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), la cual solo se libera en un proceso necrótico y no apoptótico (Scaffidi et al., 2002). Así mismo, dado que morfológicamente la necrosis está bien caracterizada, se puede realizar una microscopía electrónica para ver el daño sobre la membrana plasmática.

En cuanto a los ensayos de apoptosis en la detección de caspasas, es necesario tomar nuevos enfoques para detectar esta actividad. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos contra la caspasa 8 o caspasa 9, a fin de comparar con los resultados obtenidos por el kit. Así mismo se puede medir la actividad de caspasas intrínsecas indirectamente con la liberación de citocromo c de la mitocondria, o incluso, viendo si este organelo presenta diferencias de potencial de membrana.

Por otra parte se debe tener en cuenta que los procesos de muerte celular no son estrictos, donde en los últimos años se ha evidenciado que una célula que está comprometida con un proceso de apoptosis puede sufrir un bloqueo apoptótico y dirigirse hacia un proceso de necroptosis (Chen et al., 2018). Este último proceso es controlado como la apoptosis y conlleva el daño a la membrana plasmática como la necrosis; sin embargo, es independiente de la activación de caspasas (Ashkenazi & Salvesen, 2014). Pero, dado que originalmente podría derivar de un proceso de apoptosis, esto justificaría por qué en el caso del compuesto 23 hay alta detección de caspasas aún cuando la citometría detecta más células con características necróticas. Por lo tanto, no hay que descartar que esté ocurriendo un proceso de necroptosis sin repetir los ensayos de apoptosis y además, apoyándose de experimentos que utilicen marcadores propios de la necroptosis como las enzimas RIP, RIP3 y MLKN, así como la utilización de necrostatina-1 como inhibidor de este receptor clave en la vía de necroptosis.

Otra hipótesis que cobra fuerza si se corrobora que están presentes ambos procesos de muerte celular en los compuestos 3 y 21, es que se ha descrito la existencia de un proceso de muerte llamado necrosis secundaria, donde las células comienzan normalmente su proceso apoptótico, pero cuando este se extiende temporalmente, termina progresando a una necrosis con la desintegración de la membrana plasmática; esto se ha visto en condiciones *in vitro* donde hay ausencia de elementos fagocitarios (Silva, 2010). Por lo tanto, esto podría relacionarse a los resultados obtenidos en la citometría de flujo con ambas poblaciones celulares, donde si bien en un inicio las células vecinas pueden fagocitar elementos de una célula apoptótica, en el cultivo *in vitro* hay ausencia de macrófagos que ayuden al proceso.

Por último, es necesario tener en cuenta la realización de réplicas experimentales a fin de aplicar los ensayos estadísticos correspondientes para lograr un cálculo de

significancia de los resultados, así como utilizar las nuevas técnicas propuestas para reforzar o refutar los resultados vistos. Además, es necesario realizar un estudio de los derivados de boldina sobre otras líneas celulares, tanto de CCR como normales, ya que esto nos ayudará a dilucidar su potencial como anticancerígeno. Finalmente, a futuro se proyectan realizar estudios de inhibición de estos derivados sobre la proteína kinasa CK2, a fin de analizar si las modificaciones estructurales realizadas generan una mayor ocupación sobre el bolsillo de ATP de la proteína.

6. CONCLUSIONES

Boldina a 100 μM no causó un daño importante sobre la viabilidad y la muerte celular asociada no sería por necrosis ni apoptosis, dejando abierta la interrogante de si ocurre un proceso de arresto del ciclo celular.

Los 27 derivados de boldina presentaron un efecto diferencial sobre la viabilidad celular y la gran mayoría parece no gatillar necrosis.

Los compuestos 3 y 21 tuvieron una gran potencia inhibitoria de la viabilidad, un porcentaje de citotoxicidad superior al 100% y ejercen una activación importante de caspasas iniciadoras y efectoras. Es interesante evaluar en estos compuestos si ocurre una necrosis secundaria.

Los compuestos 11 y 23 presentaron gran potencia inhibitoria de la viabilidad, junto con un porcentaje $\leq 20\%$ sobre la citotoxicidad celular: el compuesto 11 mostró una baja activación de caspasas efectoras y la citometría de flujo muestra un mayor porcentaje de células con características necróticas que apoptóticas. Por otro lado, el compuesto 23 llevó a una alta activación de caspasas efectoras e iniciadoras, lo que se contrasta con la baja población de células apoptóticas detectadas por citometría de flujo. Se propone estudiar si un proceso de apoptosis pasa a necroptosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, K., Issinger, O. G., & Szyszka, R. (2015). Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States. In K. Ahmed, O.-G. Issinger, & R. Szyszka (Eds.), *Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14544-0>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed., pp. 1205–1268).
- American Joint Committee on Cancer. (2017). *AJCC Cancer Staging Manual* (Springer, Ed.; 8th ed.).
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A., & Hôpital Tenon, F. (2004). Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *https://Doi.Org/10.1056/NEJMoa032709*, 350(23), 2343–2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA032709>
- Ashkenazi, A., & Salvesen, G. (2014). Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 337–356. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100913-013226>
- Backhouse, N., Delporte, C., Givernau, M., Cassels, B. K., Valenzuela, A., & Speisky, H. (1994). Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. *Agents and Actions* 1994 42:3, 42(3), 114–117. <https://doi.org/10.1007/BF01983475>
- Bannach, R., Valenzuela, A., Cassels, B. K., Núñez-Vergara, L. J., & Speisky, H. (1996). Cytoprotective and antioxidant effects of boldine on tert-butyl hydroperoxide—induced damage to isolated hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology* 1996 12:2, 12(2), 89–100. <https://doi.org/10.1007/BF00143359>

- Battistutta, R., & Lolli, G. (2019). Inhibitory Properties of ATP-Competitive Coumestrol and Boldine Are Correlated to Different Modulations of CK2 Flexibility. *Journal of Natural Products*, 82(4), 1014–1018. https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.8B00889/ASSET/IMAGES/ACS.JNATPROD.8B00889.SOCIAL.JPEG_V03
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020 17:7, 17(7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Cassels, B. K., & Cassels, B. K. (2021). Peumus boldus Mol. *Medicinal and Aromatic Plants of the World*, 2, 429–438. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62818-5_33
- Cassels, B. K., Fuentes-Barros, G., & Castro-Saavedra, S. (2018). Boldo, Its Secondary Metabolites and their Derivatives. *Current Traditional Medicine*, 5(1), 31–65. <https://doi.org/10.2174/2215083804666181113112928>
- Chan, F. K. M., Moriwaki, K., & de Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in Molecular Biology*, 979, 65–70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7/COVER
- D’Onofrio, N., Martino, E., Balestrieri, A., Mele, L., Cautela, D., Castaldo, D., & Balestrieri, M. L. (2022). Diet-derived ergothioneine induces necroptosis in colorectal cancer cells by activating the SIRT3/MLKL pathway. *FEBS Letters*, 596(10), 1313–1329. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14310>
- Dumoulin, F. L., Sido, B., Bollmann, R., & Sauer, M. (2014). Endoscopic Submucosal Dissection (ESD) in Colorectal Tumors. *Visceral Medicine*, 30(1), 39–44. <https://doi.org/10.1159/000358529>
- Fuentes-Barros, G., Castro-Saavedra, S., Liberona, L., Acevedo-Fuentes, W., Tirapegui, C., Mattar, C., & Cassels, B. K. (2018). Variation of the alkaloid content of Peumus

- boldus (boldo). *Fitoterapia*, 127, 179–185.
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2018.02.020>
- Garbarino, J., Troncoso, N., Frasca, G., Cardile, V., & Russo, A. (2008). Potential Anticancer Activity against Human Epithelial Cancer Cells of Peumus Boldus Leaf Extract: *Natural Product Communications*, 3(12), 2095–2098.
<https://doi.org/10.1177/1934578X0800301229>
- Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A., Mehlen, P., & Solary, E. (1998). Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Undefined*.
- Gerhardt, D., Bertola, G., Bernardi, A., Simões Pires, E. N., Frozza, R. L., Edelweiss, M. I., Battastini, A. M., & Salbego, C. (2013). Boldine Attenuates Cancer Cell Growth in an Experimental Model of Glioma In vivo. *J Cancer Sci Ther*, 5(5), 194–199.
<https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000206>
- Gerhardt, D., Bertola, G., Dietrich, F., Figueiró, F., Zanotto-Filho, A., Moreira Fonseca, J. C., Morrone, F. B., Barrios, C. H., Battastini, A. M. O., & Salbego, C. G. (2014). Boldine induces cell cycle arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cell line via regulation of ERK, AKT, and GSK-3 β . *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32(1), 36.e1-36.e9.
<https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2013.02.012>
- Giglia, M. D., & Chu, D. I. (2016). Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 29(3), 185–195.
<https://doi.org/10.1055/S-0036-1584290/ID/JR00746-61>
- Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., & Sarkadi, B. (2005). The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Delivery*, 1(1), 27–42. <https://doi.org/10.2174/1567201043480036>

- GLOBOCAN. (2020). *Cancer Today*. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- Gurbuxani, S., Bruey, J. M., Fromentin, A., Larmonier, N., Parcellier, A., Jäättelä, M., Martin, F., Solary, E., & Garrido, C. (2001). Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene* 2001 20:51, 20(51), 7478–7485. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204948>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., & Scheiner, J. (1957). Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* 1957 179:4561, 179(4561), 663–666. <https://doi.org/10.1038/179663a0>
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000 407:6805, 407(6805), 770–776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- Hoffmann, A., Farga, C., & Lastra, J. (1992). *Plantas medicinales de uso común en Chile*. <http://bibliografias.uchile.cl/1210>
- Inaba, M., Naoe, Y., & Mitsuhashi, J. (1998). Mechanisms for 5-Fluorouracil Resistance in Human Colon Cancer DLD-1 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(6), 569–573. <https://doi.org/10.1248/BPB.21.569>
- ISOFOL. (2022). *Treatment of colorectal cancer | Isofol*. <https://isofolmedical.com/about-kolorektalcancer/treatment/#>
- Jiménez, I., & Speisky, H. (2000). Biological disposition of Boldine:in vitro and in vivo studies. *Phytotherapy Research*, 14(4), 254–260. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200006\)14:4<254::AID-PTR582>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200006)14:4<254::AID-PTR582>3.0.CO;2-M)
- Jung, J. H., Taniguchi, K., Lee, H. M., Lee, M. Y., Bandu, R., Komura, K., Lee, K. Y., Akao, Y., & Kim, K. P. (2020). Comparative lipidomics of 5-Fluorouracil-sensitive

and –resistant colorectal cancer cells reveals altered sphingomyelin and ceramide controlled by acid sphingomyelinase (SMPD1). *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62823-0>

Kırlangıç, Ö. F., KAYA-SEZGİNER, E., ÖREN, S., GÜR, S., YAVUZ, Ö., & ÖZGÜRTAŞ, T. (2022). Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Combination of Borax (Sodium Tetraborate) and 5-Fluorouracil on DLD-1 Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 371–376. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.29726>

Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology* 2008 8:4, 8(4), 279–289. <https://doi.org/10.1038/nri2215>

Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Smith, R. A., Brooks, D., Andrews, K. S., Dash, C., Giardiello, F. M., Glick, S., Levin, T. R., Pickhardt, P., Rex, D. K., Thorson, A., & Winawer, S. J. (2008). Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology*†. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(3), 130–160. <https://doi.org/10.3322/CA.2007.0018>

Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochemical Journal*, 369(1), 1–15. <https://doi.org/10.1042/BJ20021469>

Maltese, W. A., & Overmeyer, J. H. (2014). Methuosis: Nonapoptotic Cell Death Associated with Vacuolization of Macropinosome and Endosome Compartments. *The American Journal of Pathology*, 184(6), 1630–1642. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2014.02.028>

- Niechi, I., Silva, E., Cabello, P., Huerta, H., Carrasco, V., Villar, P., Cataldo, L. R., Marcelain, K., Armisen, R., Varas-Godoy, M., Fernandez, C., & Tapia, J. C. (2015). Colon cancer cell invasion is promoted by protein kinase CK2 through increase of endothelin-converting enzyme-1c protein stability. *Oncotarget*, *6*(40), 42749–42760. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5722>
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., & Speisky, H. (2006). Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, *159*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2005.09.002>
- Ooi, K. X., Subramaniam, M., Fong, L. Y., Goh, H. H., Khoo, S. B. A., & Lim, Y. M. (2021). Apoptotic and cytostatic actions of maslinic acid in colorectal cancer cells through possible IKK- β inhibition. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *11*(3), 122. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.306692>
- Paydar, M., Kamalidehghan, B., Wong, Y. L., Wong, W. F., Looi, C. Y., & Mustafa, M. R. (2014). Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 719. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S58178>
- Pérez-Moreno, P., Quezada-Meza, C., Chavez-Almarza, C., Niechi, I., Silva-Pavez, E., Trigo-Hidalgo, C., Aguayo, F., Jara, L., Cáceres-Verschae, A., Varas-Godoy, M., Díaz, V. M., García de Herreros, A., Burzio, V. A., & Tapia, J. C. (2020). Phosphorylation of Endothelin-Converting Enzyme-1c at Serines 18 and 20 by CK2 Promotes Aggressiveness Traits in Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, *10*, 1004. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01004/BIBTEX>
- Piawah, S., & Venook, A. P. (2019). Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor

- biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 125(23), 4139–4147. <https://doi.org/10.1002/CNCR.32163>
- Piedbois, P., Buyse, M., Rustum, Y., Machover, D., Erlichman, C., Carlson, R. W., Valone, F., Labianca, R., Doroshow, J. H., & Petrelli, N. (1992). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. *Journal of Clinical Oncology*, 10(6), 896–903. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.6.896>
- Quezada, N., Asencio, M., del Valle, J. M., Aguilera, J. M., & Gómez, B. (2004). Antioxidant Activity of Crude Extract, Alkaloid Fraction, and Flavonoid Fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) Leaves. *Journal of Food Science*, 69(5), C371–C376. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2004.TB10700.X>
- Russo, A., Cardile, V., Caggia, S., Gunther, G., Troncoso, N., & Garbarino, J. (2011). Boldo prevents UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and reduces the expression of Hsp70 protein in melanoma cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(9), 1219–1229. <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.2011.01320.X>
- Ruzzene, M., & Pinna, L. A. (2010). Addiction to protein kinase CK2: A common denominator of diverse cancer cells? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 499–504. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2009.07.018>
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002 418:6894, 418(6894), 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature00858>

- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters*, *584*(22), 4491–4499. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.10.046>
- Silva-Pavez, E., Villar, P., Trigo, C., Caamaño, E., Niechi, I., Pérez, P., Muñoz, J. P., Aguayo, F., Burzio, V. A., Varas-Godoy, M., Castro, A. F., Colombo, M. I., & Tapia, J. C. (2019). CK2 inhibition with silmitasertib promotes methuosis-like cell death associated to catastrophic massive vacuolization of colorectal cancer cells. *Cell Death & Disease* *2019 10:2*, *10*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1306-x>
- Simpson, J., & Scholefield, J. H. (2008). Treatment of colorectal cancer: surgery, chemotherapy and radiotherapy. *Surgery*, *26*(8), 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2008.06.003>
- Stoffel, E. M., & Yurgelun, M. B. (2016). Genetic predisposition to colorectal cancer: Implications for treatment and prevention. *Seminars in Oncology*, *43*(5), 536–542. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2016.08.002>
- Venera, C., Rosanna, A., Adriana, C. E. G., Alejandro, M., & Alessandra, R. (2019). Boldine Activates Intrinsic Apoptotic Pathway in DU-145 Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Line. *Journal of Analytical Oncology*, *8*, 10–17. <https://doi.org/10.30683/1927-7229.2019.08.03>
- Williams, C. K. O. (2019). Risk Factors for Cancer. *Cancer and AIDS*, 115–178. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99235-8_5
- Wolmark, N., Rockette, H., Fisher, B., Wickerham, D. L., Redmond, C., Fisher, E. R., Jones, J., Mamounas, E. P., Ore, L., Petrelli, N. J., Spurr, C. L., Dimitrov, N., Romond, E. H., Sutherland, C. M., Kardinal, C. G., DeFusco, P. A., & Jochimsen, P. (1993). The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative

adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03.

<https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.10.1879>, 11(10), 1879–1887.

<https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.10.1879>

Wolpin, B. M., & Mayer, R. J. (2008). Systemic Treatment of Colorectal Cancer.

Gastroenterology, 134(5), 1296-1310.e1.

<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.02.098>

World Health Organization. (2020). *Cancer Today*. <https://gco.iarc.fr/today/home>

Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C., & Chen, X. (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1, 6(1), 1–21.

<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>

ANEXO

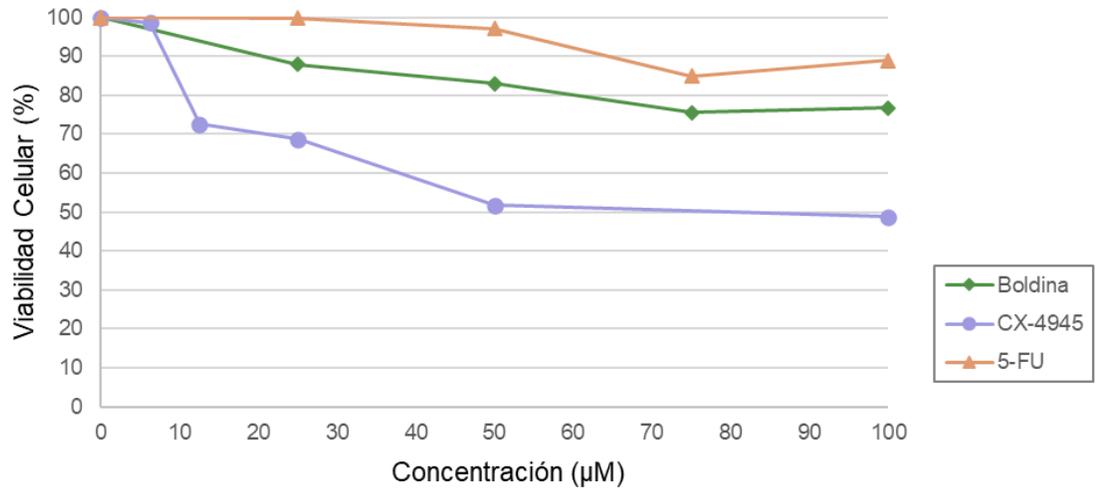


Figura A. 1. Viabilidad celular para la línea celular CHO-K1 en presencia de boldina y dos compuestos control. Los compuestos fueron incubados por 24 h y los valores de viabilidad fueron cuantificados tras realizar un ensayo MTS. Para boldina y 5-FU se ensayaron 5 concentraciones diferentes (0, 25, 50, 75 y 100 µM), mientras que CX-4945 se ensayó a 6 concentraciones (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µM).

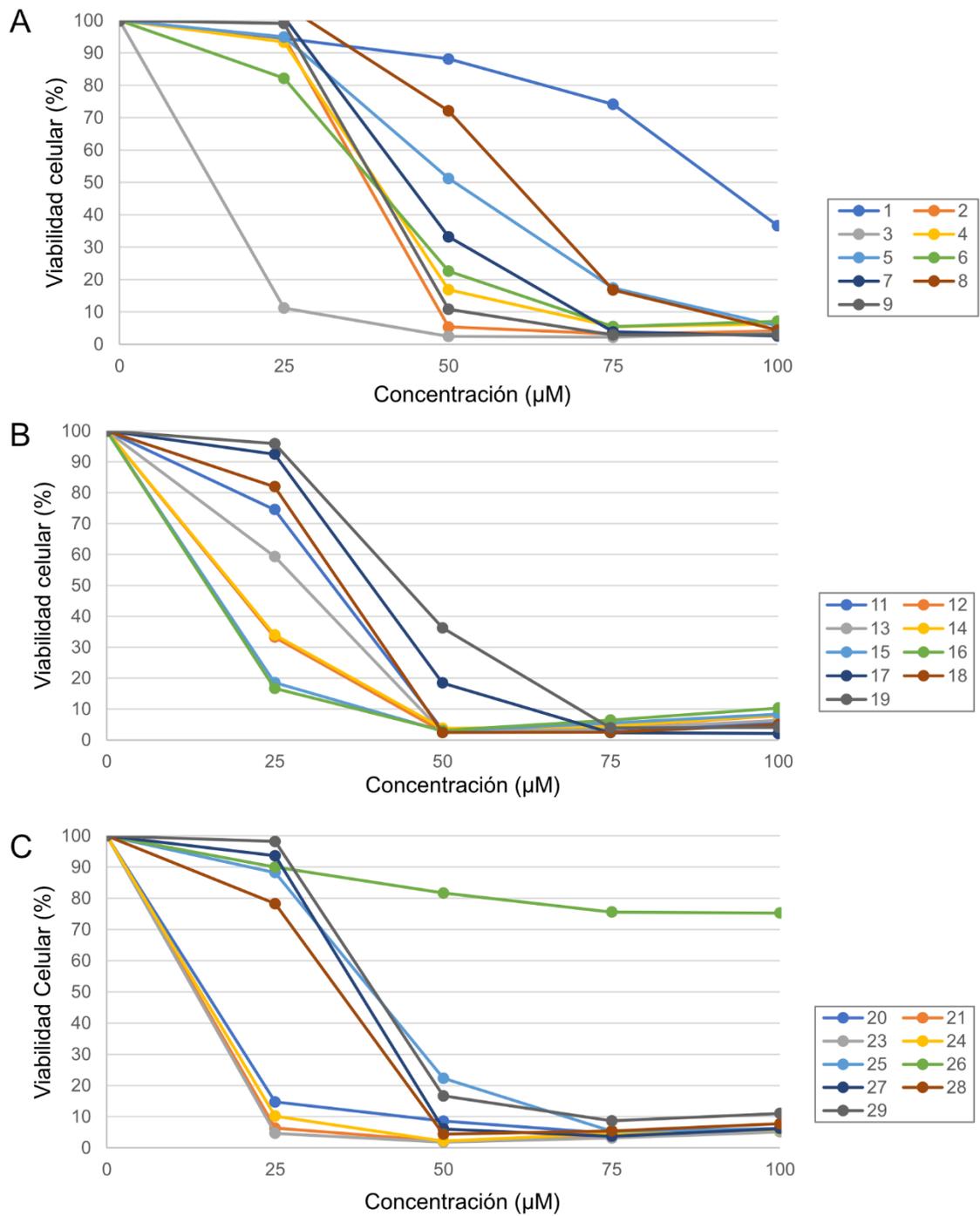


Figura A. 2. Viabilidad celular para la línea celular CHO-K1 en presencia de los derivados de boldina. Los derivados fueron incubados por 24 h y los valores de viabilidad fueron cuantificados tras realizar un ensayo MTS. Se ensayaron 5 concentraciones diferentes (0, 25, 50, 75 y 100 µM). A. Modificaciones químicas de boldina de la 1 a la 9. B. Modificaciones químicas de boldina de la 11 a la 20. C. Modificaciones químicas de boldina de la 21 a la 29.

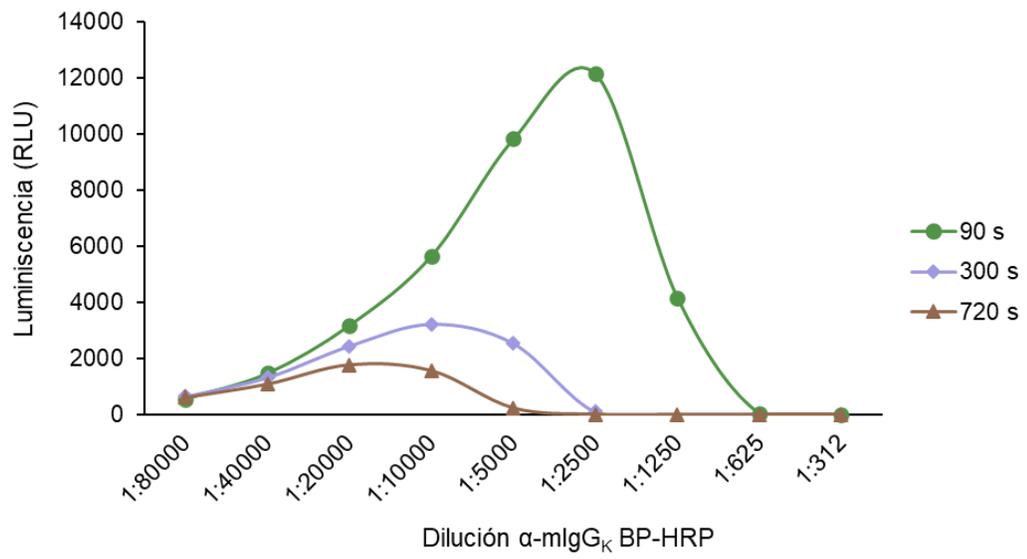


Figura A. 3. Curvas de luminiscencia para distintas diluciones del anticuerpo α -mIgG_K BP-HRP. La luminiscencia del anticuerpo fue medida en presencia de una solución de peróxido y luminol.