

Sara Julietta Lozano
Herrera

EFEECTO QUIMIOPROTECTOR DEL EXTRACTO DE LA FERMENTACIÓN
DE NARINGENINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON EXPUESTAS A
BISFENOL A Y SU MODULACIÓN EPIGENÉTICA

2023



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

**EFEECTO QUIMIOPROTECTOR DEL EXTRACTO DE LA
FERMENTACIÓN DE NARINGENINA EN CÉLULAS DE CÁNCER
DE COLON EXPUESTAS A BISFENOL A Y SU MODULACIÓN
EPIGENÉTICA**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

M.C. Sara Julietta Lozano Herrera

Dirigida por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Querétaro, Qro.; Abril de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto quimioprotector del extracto de la
fermentación de naringenina en células de cáncer de
colon expuestas a bisfenol A y su modulación
epigenética.

por

Sara Julietta Lozano Herrera

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: MEDCC-231219



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias en Biomedicina

“Efecto quimioprotector del extracto de la fermentación de naringenina en células de cáncer de colon expuestas a bisfenol A y su modulación epigenética”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

M.C. Sara Julietta Lozano Herrera

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda
Presidente

Dr. Andrés Cruz Hernández
Secretario

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Vocal

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Suplente

Dra. Rocio Campos Vega
Suplente

Centro Universitario,
Querétaro, Qro. Abril 2023
México

AGRADECIMIENTOS

Duración del programa de Doctorado 4 años, poderlo concretar desde el momento en que lo visualicé, 18 años. A lo largo de todo este tiempo han existido situaciones en las que pensé que el rumbo de mi vida sería diferente. Sin embargo; existieron personas que en todo este camino me ayudaron a lograr mi sueño. Dios es quien me permitió seguir en este mundo y estoy segura que me acercó a las personas indicadas en el momento indicado. Mis padres han sido pieza clave para que yo consiguiera esto tan anhelado. Mis hijos hicieron que todo esfuerzo y que cada minuto que yo sacrificaba por no poder estar con ellos y seguir con mi sueño fuera máspreciado, tratando siempre de que valiera la pena. Mis compañeros, hermanos de laboratorio fueron pilares fundamentales, no solo me permitieron compartir mi locura, mi frustración y también alegrías; Alan, Paco, Nataly, Itzely son los mejores compañeros de generación que pude tener junto a los mejores compañeros de laboratorio Karen, Pao, Fernando, Yan, Marisa, Luis, Lupita. Agradezco a todos los técnicos de laboratorio, Karen y Vane (Facultad de Química, UAQ), Adrián, Diana, July (Campus Amazcala,UAQ), Joss (Campus Juriquilla, UAQ) y a todos los integrantes de mi comité (Dr. Andrés Cruz, Dra. Jheny Rodríguez, Dra. Ana Gabriela Hernández, Dra. Rocío Campos) que contribuyeron a las mejoras de mi proyecto así como al comité que integró mi examen predoctoral. De manera muy especial quiero agradecer el apoyo de mi asesora la Dra. Haydé Vergara y de mi tutor el Dr. Pablo García ambos no solo se limitaron en dar seguimiento en la cuestión académica, fueron empáticos y sensibles ante los pequeños o grandes problemas que se suscitaron a lo largo de este tiempo, de igual manera agradezco el apoyo de la Dra. Ana Sánchez, la Dra. Gabriela Hernández y el Dr. Juan Carlos Solís, que hacen que el ambiente del laboratorio sea tu segunda familia. También quiero agradecer a todos mi amigos, quienes me alentaban a seguir, me escucharon y fueron un gran desahogo y a mis alumnos principalmente generación 2020-2023 quienes además de ser una gran terapia en pandemia, sus ocurrencias e inquietudes me alentaban.

Finalmente quisiera agradecer de manera especial a **CONACYT** por la beca otorgada y sin la cual yo no hubiera podido realizar el Doctorado y también quisiera agradecer a la **UAQ** por los dos **FOPER** que se me fueron otorgados y con los cuales pude contribuir en la parte económica de mi proyecto de Doctorado.

Este trabajo es dedicado a mis hijos, Luis David y Emma Julieta.

ÍNDICE

	PAG.
TABLA DE CONTENIDO	
ÍNDICE.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I.INTRODUCCIÓN	3
II.ANTECEDENTES	4
2.1. Flavonoides	4
2.1.1. Naringenina	5
2.2. Receptores estrogénicos (REs)	7
2.3. Disruptores estrogénicos	8
2.3.1. Bisfenol A (BPA)	9
2.4. Cáncer	10
2.4.1. Ciclo celular	11
2.4.2. Apoptosis	11
2.5. Cáncer de colon	13
2.5.1. Mecanismos epigenéticos en cáncer de colon	14
2.5.2. miRNA y cáncer de colon	15
2.5.3. Líneas celulares cáncer de colon (CC)	16
III. HIPOTESIS	17
IV. OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18
V. METODOLOGÍA.....	19
5.1. Materiales	19
5.1.1. Material biológico	19
5.1.2. Material químico	19
5.2. Metodología	19
5.2.1. Digestión y fermentación <i>in vitro</i> de la naringenina	19
5.2.1.1. Actividad antioxidante	20
5.2.1.2. Identificación de metabolitos	21
5.2.2. Cultivo Celular	21

5.2.2.1. Pruebas de viabilidad y citotoxicidad celular	22
5.2.2.2. Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)	23
5.2.2.3. Apoptosis.....	23
5.2.2.4. Actividad antioxidante.....	23
5.2.2.5. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	24
5.2.2.6. Determinación de la expresión de genes	24
5.2.2.7. Arreglo de PCR de la cascada de señalización de p53.....	25
5.2.2.8. Expresión de miRNAs.....	25
VI. RESULTADOS Y DICUSIÓN	27
6.1. Caracterización del extracto de fermentación (EF) de naringenina	27
6.2. Viabilidad celular en células tratadas con naringenina, BPA, EF, coexposición de naringenina con BPA y EF con BPA	31
6.3. Citotoxicidad en células HT-29 y SW480 tratadas con naringenina, BPA y EF.	35
6.4. Apoptosis celular	36
6.5. Actividad antioxidante.....	39
6.6. Expresión de RNAm de RE β , RE α , GPR30 Y DNMT1 en células SW480 y HT29	41
6.7. Expresión de miR-200c y miR-141 en células HT-29	46
6.8. Expresión de genes relacionados con la cascada de señalización p53 en células HT-29 tratadas con BPA y naringenina.....	47
VII. CONCLUSIONES	59
VIII. REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAG.
Figura 1. Subproductos del metabolismo microbiano de naringenina.....	5
Figura 2. Cascadas de señalización de necroptosis y apoptosis intrínseca e extrínseca mediadas por naringenina.....	6
Figura 3. Localización de REs.....	8
Figura 4. Esquema general de la cascadas de señalización de apoptosis. Intrínseca y extrínseca.....	13
Figura 5. Modelo de carcinogénesis de cáncer de colon.....	14
Figura 6. Cromatogramas representativos del UPLC.....	29
Figura 7. Curva dosis-respuesta de la naringenina en células 3T3-L1, HT-29 y SW480.....	31
Figura 8. Curva dosis-respuesta del extracto de fermentación de la naringenina en células HT-29 y SW480.....	32
Figura 9. Viabilidad celular en células SW480 y HT-29 tratadas con BPA	33
Figura 10. Coexposición naringenina con BPA y EF con BPA en células HT-29 y SW480.....	34
Figura 11. Ensayo de LDH en células HT-29 y SW480 tratadas con naringenina y BPA	35
Figura 12. Apoptosis en células HT-29 tratadas con naringenina, EF, BPA, naringenina+BPA y EF+BPA.....	37
Figura 13. Apoptosis en células SW480 tratadas con naringenina con y sin BPA....	38
Figura 14. Actividad de SOD en células HT-29 tratadas con naringenina, EF, BPA, naringenina+BPA y EF+BPA.....	39
Figura 15. Cantidad de ROS en células HT-29 tratadas con naringenina, EF, BPA, naringenina+BPA y EF+BPA.....	40
Figura 16. Glutathion reducido en células HT-29 tratadas con naringenina, EF, BPA, naringenina+BPA y EF+BPA	41
Figura 17. Expresión relativa de genes RE β , RE α , GPR30, DNMT1 en células SW480 tratadas con naringenina y BPA.....	42
Figura 18. Expresión relativa de genes RE β , RE α , GPR30, DNMT1 en células SW480 tratadas con naringenina y BPA.....	43

Figura 19. Expresión relativa de miR-200c y miR141 en células HT29 tratadas con naringenina, EF, BPA, naringenina+BPA y EF+BPA47

Figura 20. Expresión de genes en células HT-29 tratadas con naringenina, EF, BPA, naringenina+BPA y EF+BPA pertenecientes a la cascada de señalización de p53.....58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PAG.
Tabla 1. Secuencias Forward y Reverse de genes RE α , RE β , DNMT1 y GPER30.....	25
Tabla 2. Secuencias de Stem Loop e iniciador específico de miR-200c y 141, antisentido universal y secuencia Forward y Reverse de U6.....	26
Tabla 3. Cantidad de naringenina y ácido 3(4-hidroxifenil) propiónico determinados en el EF por HPLC.....	28
Tabla 4. Compuestos del EF encontrados por UPLC.....	29
Tabla 5. Capacidad de eliminación de radicales (%RSC) por las metodologías DPPH, ABTS y ORAC en naringenina y EF de naringenina.....	30
Tabla 6. Regulación de la expresión de genes de células HT-29 tratadas con naringenina, BPA, Naringenina+BPA, EF, EF+BPA con respecto a las células control empleando β -Actina y GAPDH como housekeeping.....	48

ABREVIATURAS Y SIGLAS

3HPP: 3(3-hidroxifenil) propiónico.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ARN: Ácido ribonucleico.
BPA: Bisfenol A.
CC: Cáncer de colon.
CL₅₀: Concentración letal media.
CDK: Cinasas dependientes de ciclina
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.
DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EF: Extracto de fermentación.
EPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos.
EREs: Elemento de respuesta a estrógenos.
FCA: Focos de criptas aberrantes.
GSH: Glutación reducido.
GPER30: Receptor de estrógeno acoplado a proteína G 30.
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
IDT: Ingesta Diaria Tolerable.
IC₅₀: Concentración inhibitoria media.
LDH: Lactato deshidrogenasa.
miRNAs: microRNAs.
MTT: Dimetiltilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol.
ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.
PBS: Buffer fosfato salino.
RE α : Receptore estrogénico alfa.
RE β : Receptore estrogénico beta.
REs: Receptores estrogénicos.
ROS: Especies reactivas de oxígeno.
SFB: Suero fetal bovino.
SOD: Superóxido dismutasa
TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al trolox.
Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico.
UPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (Ultra-Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés).

RESUMEN

El consumo de flavonoides se ha correlacionado inversamente con la incidencia de cáncer, un ejemplo es la naringenina, la cual durante la fermentación colónica es fraccionada obteniendo metabolitos con actividad biológica. La naringenina se une a receptores estrogénicos (REs) disminuyendo la proliferación por mecanismos genéticos y epigenéticos. Otro compuesto con actividad estrogénica es el bisfenol A (BPA), empleado para la elaboración de plásticos y reconocido por sus efectos dañinos a muy bajas dosis. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del extracto de fermentación (EF) sobre la proliferación de células de cáncer colon expuestas a BPA, así como proponer el mecanismo molecular y epigenético involucrado en dicho efecto. Para lograr dicho objetivo se realizó una simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica de naringenina, se realizaron pruebas de viabilidad con naringenina y EF con BPA y se cuantificó la expresión de genes relacionados con la vía de señalización de p53, así como ER β , ER α , miR-200c y miR-141 en la línea celular de cáncer de colon HT-29. Los resultados muestran que el mecanismo por el cual se promueve apoptosis bajo el tratamiento de naringenina y EF es dependiente de la expresión transcripcional de RE β (5,3 veces con naringenina y 13,67 veces con EF), ambos tratamientos promueven apoptosis por vía mitocondrial y extrínseca a través de la expresión de PTEN (+2,70, +1,72 veces, respectivamente). La coexposición de naringenina con BPA promueve mecanismos apoptóticos no constitutivos ya que el gen TNF promueve la expresión del ligando Fas/receptor de muerte de superficie celular Fas/Fas asociado a vía dominio de muerte (FASL/FAS/FADD). Finalmente se observó que bajo el tratamiento de BPA hay una disminución en la expresión de PTEN (-3.46 veces) mediado por miR-220c (+1.62 veces), el cual se encuentra sobre expresado bajo este tratamiento.

Palabras clave: Cáncer de colon, BPA, naringenina, receptores estrogénicos.

ABSTRACT

The consumption of flavonoids has been inversely correlated with the incidence of cancer, an example of which is naringenin, which is fermented by the colonic microbiota, obtaining metabolites with different biological activities. Naringenin binds to estrogen receptors (ERs), thus decreasing proliferation by different genetic and epigenetic mechanisms. Another compound that has estrogenic activity is bisphenol A (BPA), it is used to make plastics intended to contain food and is recognized for its harmful effects at very low doses. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of the fermentation extract (EF) on the proliferation of colon cancer cells exposed to BPA and propose the molecular and epigenetic mechanism involved in the said effect. To achieve this objective, an in vitro simulation of the gastrointestinal digestion and colonic fermentation of naringenin was carried out, viability tests were carried out with naringenin and EF with BPA, and genes related to the p53 signaling pathway were quantified, as well as ER β , ER α , miR-200c, and miR-141. It has been found that in the HT-29 cell line, the mechanism by which apoptosis is promoted under the treatment of naringenin and EF is dependent on ER β (5.3 *fold* with naringenin and 13.67 *fold* with EF), both treatments promote apoptosis both by the mitochondrial and extrinsic pathway through the expression of phosphatase and tensin homolog (PTEN) (+2.70, +1.72 *fold*, respectively); furthermore, when coexposed with BPA, the cell generates defense mechanisms promoting non-constitutive apoptotic mechanisms since the TNF gene (+32.52 times BPA with naringenin and +47.68 *fold* BPA with EF) promotes the expression of the Fas ligand/receptor of cell surface death Fas/Fas-associated pathway death domain (FASL/FAS/FADD). Finally, it was observed that under the BPA treatment there is a decrease in the expression of PTEN (-3.46 *fold*) which can be regulated by miR-220c (+1.62 *fold*), which is overexpressed under this treatment.

Key words: Colon cancer, BPA, naringenin, estrogen receptors.

I.INTRODUCCIÓN

El bisfenol A (BPA) es un compuesto con el que se elaboran polímeros empleados en varios artículos de uso cotidiano, incluidos recipientes de alimentos y recubrimientos de enlatados. Este compuesto se libera del polímero y se incorpora en el alimento a consumir, proceso que puede ser acelerado por factores como calor, pH y tiempo de exposición. El BPA es considerado como un disruptor endócrino, el cual se une a REs tanto α como β . Los RE α a nivel celular se ven involucrados en mecanismos de proliferación, diferenciación y supervivencia y los RE β con mecanismos apoptóticos. Ambos tipos de receptores los podemos encontrar en diferentes proporciones en diversos tejidos, en colon se cuenta con mayor número de RE β ; sin embargo, en condiciones de cáncer, estos receptores disminuyen considerablemente. Por otro lado, se sabe que los flavonoides también tienen la capacidad de actuar a través de REs, uniéndose con mayor afinidad a los RE β , presentando actividad proapoptótica y protectora. La naringenina es un flavonoide presente en cítricos que tiene la capacidad de unirse a RE β de manera agonista y en células de cáncer de mamá se unen de manera antagónica a RE α , inhibiendo procesos de proliferación. Tanto naringenina como BPA también pueden unirse a otros receptores sensibles a estrógenos como GPER30, el cual tiene una implicación importante en el proceso carcinogénico en cáncer de colon, mediando procesos de proliferación y muerte celular. Actualmente se desconoce el efecto en colon de la coexposición del BPA y la naringenina en coexposición; el conocimiento actual de los mecanismos moleculares por los cuales tanto BPA como naringenina por separado actúan, incluyen los mecanismos epigenéticos como metilación del ADN, remodelación de la cromatina y expresión de miRNAs. Además, considerando que la naringenina llega a colon y es metabolizada por la microbiota colónica, no se sabe si los subproductos generados en el proceso de fermentación pudieran disminuir la toxicidad causada por el BPA y el mecanismo involucrado.

II.ANTECEDENTES

2.1. Flavonoides

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes, los podemos encontrar en frutas, verduras, entre otras fuentes vegetales. Su estructura básica esta constituida de dos anillos de benceno conectados por un puente de 3 carbonos, formando un heterociclo (C6-C3-C6). Se dividen en flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas, isoflavonas y antocianinas que difieren en sus sustituyentes de anillo y grado de saturación (Amawi *et al.*, 2017). Se ha demostrado que los flavonoides presentan diversos efectos biológicos, que incluyen un alto potencial antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotector, hepatoprotector, antimicrobiano y anticanceroso por diferentes vías, dependiendo del tipo del compuesto y del órgano blanco (Ponte *et al.*, 2021).

Existe una relación entre el consumo de alimentos ricos en flavonoides con la disminución del riesgo a desarrollar cáncer de colon, y los reportes indican que el metabolismo de la microbiota colónica se ve modulado por la presencia de estos compuestos y que, a su vez, los flavonoides son metabolizados por la misma microbiota, generando metabolitos con actividad biológica. Dentro de los flavonoides podemos encontrar a la naringenina, la cual es absorbida principalmente en intestino delgado, metabolizada por enzimas de fase II en hígado y excretada vía biliar ya glucoronidada, aunque también se ha reportado que una parte alcanza el colon intacta y es metabolizada por la microbiota obteniendo diversos subproductos como ácido 3(3,4-dihidroxifenil) propiónico, ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico, proroglucinol, ácido 3(4-hidroxifenil) propiónico y p-cumárico (Figura 1) (Amawi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

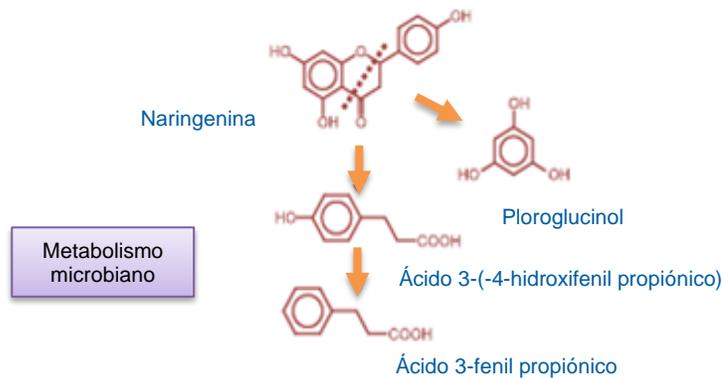


Figura 1. Subproductos del metabolismo microbiano de naringenina. Modificado de: Rechner *et al.*, (2004).

2.1.1. Naringenina

La naringenina es una flavanona, un tipo de flavonoide que se encuentra principalmente en cítricos como limón, naranja, mandarina y toronja. Dentro de los principales beneficios a la salud se ha estudiado su efecto antiinflamatorio y antioxidante, a través de la inducción en la expresión de Nrf2, un factor nuclear que induce respuestas antioxidantes y antiinflamatorias, e inhibe NFkB, disminuyendo la producción de citocinas proinflamatorias (Manchope *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2021). En células de cáncer de colon se sugiere que induce apoptosis a través de la activación de ATF3 dependiente de p38, en células de cáncer de cuello uterino se ha encontrado potencial apoptótico tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca ya que aumenta la expresión de caspasas, p53 y Bax, receptor de muerte Fas y su proteína adaptadora FADD y en tejido cardíaco se ha visto que promueve necroptosis en respuesta a estrés oxidativo (Chtourou *et al.*, 2015; Ramesh *et al.*, 2013) (Figura 2). También se ha reportado que la naringenina modula la expresión de algunos microRNAs (miRNAs) en colon, como el miR-17-3p que promueve la expresión de enzimas antioxidantes y el miR-25-5p que disminuye la expresión de genes relacionados con la producción de citocinas, sugiriendo un efecto protector, aunque hace falta más sustento científico para elucidar mecanismos epigenéticos

involucrados en su efecto protector sobre la carcinogénesis de colon (Curti *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que la naringenina disminuye la proliferación de células de cáncer de mama en presencia de BPA de una forma estrógeno-dependiente. También se ha visto en células de cáncer de mama un efecto sinérgico con el tamoxifen, disminuyendo proliferación celular por disminución en la expresión de GPR30. Se sabe que la naringenina tiene la capacidad de unirse e inhibir los receptores estrogénicos α (RE α) de manera antagónica y también se ha visto la capacidad de la naringenina de unirse a RE β por lo que mediante estas vías podría proteger contra procesos de carcinogénesis (Bulzomi *et al.*, Chimento *et al.*, 2022; 2012; Pellegrini *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018).

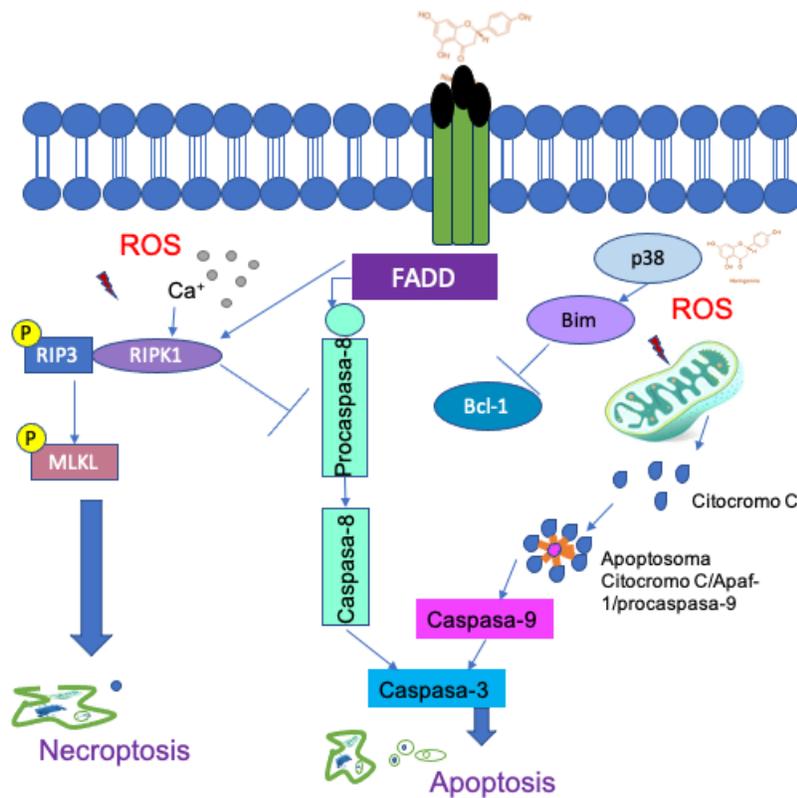


Figura 2. Cascadas de señalización de necroptosis y apoptosis intrínseca e extrínseca mediadas por naringenina. Basado en: (Alvarado-Sansininea *et al.*, 2018; Vetrivel *et al.* 2019)

2.2. Receptores estrogénicos (REs)

Los REs pertenecen a la familia de receptores nucleares, funcionan como factores de transcripción activados por ligandos, regulan genes implicados en funciones de desarrollo, diferenciación, reproducción y homeostasis. Existen dos isoformas de RE, α y los β , los cuales tienen diferentes orígenes genómicos y difieren en su estructura. RE α está constituido por 595 aminoácidos y presenta tres dominios: amino-terminal, central que se une al DNA y carboxi-terminal que se une al ligando, en cambio los RE β están constituidos por 530 aminoácidos y carecen del dominio carboxi-terminal. Ambos REs se unen a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en el DNA (Chimento *et al.*, 2022; Lecomte *et al.*, 2017). El mecanismo de acción clásico de los REs se basa en el cambio de conformación que sufren los REs ligados a estrógenos en el citoplasma, lo que le permite disociarse de las proteínas de choque térmico (Hsp90 y Hsp70) y entrar a núcleo donde se une al DNA en la zona EREs. Existen otras vías en donde se pueden unir a otros factores de transcripción como SP1, AP-1 y NF κ B (Caiazza *et al.*, 2015).

Los REs se asocian principalmente a órganos reproductores como mama, ovarios, próstata, presentando en mayor cantidad del tipo RE α en estos tejidos; sin embargo, en colon existe gran cantidad de RE β los cuales permiten la diferenciación epitelial (Figura 3), mostrando una reducción de los mismos en presencia de cáncer de colon (Caiazza *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2017). RE α y RE β tienen diferencias en sus funciones, RE α por lo general, promueve la señalización proliferativa por medio de la expresión diferencial pro y anti-apoptótica como la ciclina D1, mientras RE β reduce la expresión génica mediada por RE α , además de que RE β activa la vía de señalización p38/MAPK promoviendo la apoptosis, por lo que su papel en cáncer es evidente (Acconcia *et al.*, 2005; Caiazza *et al.*, 2015; Chimento *et al.*, 2022). Los compuestos que interactúan con los receptores estrogénicos son denominados disruptores estrogénicos (Li *et al.*, 2016).

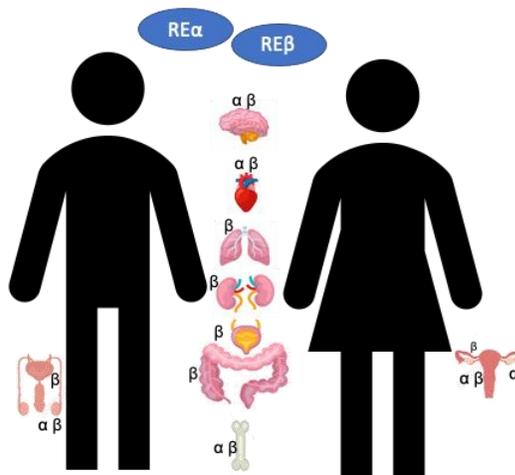


Figura 3. Localización de REs. Modificado de: Drummond *et al.*, (2010).

2.3. Disruptores estrogénicos

Los disruptores estrogénicos son compuestos que podemos encontrar en la naturaleza o productos sintéticos que son capaces de alterar el equilibrio hormonal estrogénico a dosis bajas. La variedad en cuanto a su naturaleza y estructura química dificulta el entendimiento de su actividad, dos sustancias con actividad estrógena pueden actuar de forma sinérgica o pueden funcionar como antagonistas, dependiendo de la afinidad que tengan con los REs (Chichizola *et al.*, 2009; Lecomte *et al.*, 2017). Tienen varios mecanismos de acción descritos, pueden incrementar o bloquear el metabolismo hormonal, actuar de forma antagónica o sinérgica de los receptores hormonales, afectan la actividad transcripcional de los REs, pueden inhibir la actividad de histona deacetilasa, regulan la metilación del DNA, además se les ha involucrado con el metabolismo lipídico promoviendo la obesidad (Chichizola *et al.*, 2009). Los flavonoides están considerados como disruptores estrogénicos naturales, y también podemos encontrar a disruptores de origen sintéticos, de los cuales el más estudiado es el BPA (Lecomte *et al.*, 2017).

2.3.1. Bisfenol A (BPA)

El Bisfenol A (BPA) [4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano] es un compuesto químico utilizado para la elaboración de polímeros como el policarbonato y resinas epoxi presentes en recipientes destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas. El BPA se lixivia hacia el alimento, factores como la temperatura o el pH promueven dicho efecto; por tal motivo se ha enfatizado en la exposición del BPA y su efecto metabólico (Acconcia *et al.*, 2015; García *et al.*, 2015; Kharrazian, 2014). La EPA (Agencia de protección ambiental de Estados Unidos) sugiere un valor de Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de BPA de 50 µg/kg/día. Sin embargo, se ha reportado que concentraciones bajas como 5 µg/kg/día provocan focos celulares alterados, hiperplasia de vías biliares e infiltración de células inflamatorias focales persistentes en el hígado de ratas (Kasemi *et al.*, 2017). En México, se han reportado niveles urinarios de 1.95 µg /L de orina de BPA, lo cual resulta similar a la exposición reportada en países industrializados, como en Países Bajos (1.1 µg/L de orina) y Estados Unidos (2.4 µg/L de orina) (Cantonwine., 2010). El BPA después de ser ingerido es metabolizado por el hígado, la UDP-glucuronosiltransferasa UGT2B1 lo conjuga con ácido glucurónico formando BPA-glucoronidado, compuesto soluble y de fácil excreción, que es eliminado vía biliar. Se estima que cerca del 80% del BPA ingerido es excretado por esta vía y un porcentaje dependiente de la actividad de la microbiota colónica es reabsorbido en el colon en su forma activa, ya que enzimas β-glucuronidasas bacterianas rompen el enlace permitiendo la escisión del BPA del ácido glucurónico, lo que sugiere que una exposición repetida del compuesto por la vía entero-hepática (Sakamoto *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2018). Dentro de los efectos adversos del BPA sobre la salud se puede encontrar la interferencia con hormonas tiroidea (TR) y expresión de genes relacionados con el desarrollo del cerebro afectando su morfología. En el sistema inmune activa cascadas de señalización como JNK, STAT3 y NF-kB, promoviendo la secreción de citocinas, lo que favorece los procesos proinflamatorios (Kharrazian., 2014; Valentino *et al.*, 2016). Recientemente, se ha descubierto que la exposición al BPA conduce a alteraciones en miRNAs, como la sobreexpresión

de miR-146a quien reprime el gen reparador de DNA *ARF6* y a *TP53*, lo que resulta en un aumento en la proliferación celular. Además, regula positivamente algunos miRNAs oncogénicos como miR-19a y miR-19b, y también se ha encontrado que aumenta miR-107, quien a su vez regula *SUFU* (Supresor homólogo fusionado), promoviendo un aumento en la proliferación celular en cáncer de mama (Chou *et al.*, 2017). Además, se han descrito algunos mecanismos epigenéticos en donde interfiere el BPA, uno de ellos es la promoción de histona metiltransferasa en glándula mamaria de ratón. El BPA es un disruptor estrogénico afín a REs; se ha observado que se une a RE β con efecto inhibitorio promoviendo proliferación en diferentes tipos de cáncer (Doherty *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2001; Iwamoto *et al.*, 2021).

2.4. Cáncer

El cáncer es la tercera causa de muerte a nivel mundial y según datos de la OMS, en 2020 México se reportaron 90 603 personas fallecidas a causa de este padecimiento (OMS, 2021). El cáncer tiene causas endógenas a las que se debe el 5-10%, divididas en espontáneas y heredables y exógenas o asociadas a factores que involucran estilos de vida, los cuales representan del 90-95%. Para que una célula corporal normal se transforme a maligna requiere de múltiples mutaciones a nivel somático, además de cambios epigenéticos que activan oncogenes o regulan negativamente los genes supresores de tumores que son los encargados de inhibir la proliferación celular (Herrera-Gómez *et al.*, 2010; Torroella-Kourí y Villa-Treviño, 1998; Siegel *et al.*, 2018). El proceso de carcinogénesis química empieza con la exposición a un agente mutagénico que puede causar daño a proto-oncogenes o a genes supresores de tumor, lo que promueve la etapa de iniciación, en donde hay un cambio permanente y heredable que altera el ADN y no hay diferencia morfológica. Posteriormente, existe una promoción que está caracterizada por una lesión pre-neoplásica, luego se presenta la transformación, en donde se da origen a las células cancerígenas y finalmente la progresión, cuando las células genéticamente alteradas perpetúan su crecimiento y proliferación. Por lo anterior,

las regulaciones de los procesos de apoptosis y ciclo celular importantes en la biología del cáncer (Alberts *et al.*, 2011; Herrera-Montalvo *et al.*, 2010; Klaassen, 2007; Pedraza-Fariña, 2006).

2.4.1. Ciclo celular

El ciclo celular regula la duplicación de la información genética, tiene dos etapas cruciales, fase M (mitosis) y la fase de replicación celular o fase S. Para que se den estas etapas, la célula tiene que estar preparada por lo que existen espacios de tiempo a los cuales se les denomina fases G, la G1 es el intervalo entre la mitosis y la replicación del DNA y G2 entre la fase S y la fase M. La fase M a su vez se divide en cinco estadios en donde se da la división de la célula. El control del ciclo celular reside en señales químicas que difunden entre el citoplasma y el núcleo y es ejecutado por diferentes proteínas como las proteínas dependientes de ciclinas (CDK), ciclinas y proteasas. Algunas de estas moléculas permiten la evolución del ciclo y otras frenan el mismo en respuesta a algún error. La proteína Rb hipofosforilada se une al factor de transcripción E2F evitando que se activen genes involucrados en la replicación de ADN (Pedraza-Fariña, 2006). La proteína p21 juega un papel esencial en la detención del crecimiento después del daño de ADN, su sobreexpresión conduce a un arresto celular en las fases G1, G2 y S, ya que esta inhibe complejos de ciclina/CDK esenciales en estas fases. Por su parte la proteína p53, llamada “guardián del genoma” interacciona con otra proteína, Mdm2, que actúa como ubiquitina-proteína ligasa y la marca para su destrucción en el proteosoma. Cuando existen daños en el DNA se activan proteínas quinasas CHK-1 y CHK-2 fosforilando p53, lo que evita que Mdm2 lo reconozca y p53 no sea degradada promoviendo la apoptosis (Engeland, 2022; Gartel y Tyner, 2002).

2.4.2. Apoptosis

La apoptosis es una vía de muerte celular inducida que permite mantener un número estable de células en los tejidos y prevenir la replicación de células que han sufrido daño. La célula que sufre apoptosis se caracteriza por presentar retracción

celular, condensación de la cromatina, formación de bullas citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos, y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, principalmente por macrófagos (Robbin *et al.*, 2010). El proceso de apoptosis se puede dividir en una fase de iniciación, donde las caspasas se activan a nivel catalítico y otra fase de ejecución. La iniciación de la apoptosis es gracias a la vía intrínseca o mitocondrial y a la vía extrínseca (Figura 4). La vía intrínseca es consecuencia de un aumento en la permeabilidad mitocondrial con inducción de proteínas de la familia Bcl, las cuales son pro y antiapoptóticas. Factores de crecimiento y señales de supervivencia estimulan proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-x y Mcl-1. Cuando la célula sufre algún estrés se activan sensores de lesión (Bim, Bid y Bad) que tienen un dominio de homología Bcl-2, estas proteínas a su vez activan efectores (Bax y Bak) que forman complejos que se insertan en la membrana mitocondrial interna. Las proteínas BH3 se pueden unir a las Bcl-2 y Bcl-x bloqueando su función; esto provoca que se liberen algunas proteínas mitocondriales (Smac/DIABLO) a citoplasma que inducen la cascada de las caspasas, favoreciendo la apoptosis o citocromo C que activa el apoptosoma que a su vez activa a caspasa-9. La vía extrínseca inicia por unión a receptores de muerte, miembros de la familia TNF, por ejemplo, la proteína Fas, el cual se une a su ligando (FasL) formando un sitio de unión para FADD, este a su vez se liga a caspasa 8 activándola y permitiendo cascadas de activación de caspasas, promoviendo la apoptosis. La proteína p53 induce apoptosis mediante la vía mitocondrial, ya que puede modular a través de receptores de muerte. Los fitoquímicos, pueden inhibir la activación de quinasa regulada por señal extracelular (ERK), de manera similar se ha registrado fragmentación oligonucleómica, liberación de citocromo-C y por lo tanto activación de apoptosis por la vía intrínseca activando caspasa 3 (Lin *et al.*, 2018; Panieri y Santoro, 2016). Se ha demostrado que el RE β y especies reactivas de oxígeno (ROS) puede inducir apoptosis tanto por la vía intrínseca como extrínseca (Robbin *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2016).

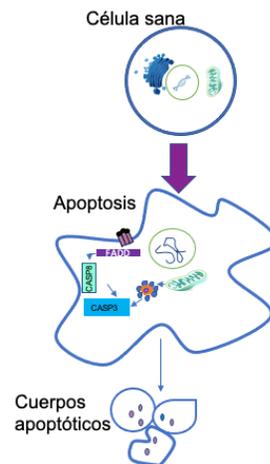


Figura 4. Esquema general de la cascadas de señalización de apoptosis intrínseca y extrínseca. Basado en: Mou *et al.* (2019).

2.5. Cáncer de colon

El cáncer colon (CC), ocupa el 3º lugar en México y el mundo y causa aproximadamente 700,000 muertes al año. Tiene una incidencia mayor en hombres (53.5%) que en mujeres (46.5%) (Burbao-Luna *et al.*, 2016; Bray *et al.*, 2018; OMS 2021), y se correlaciona con una ingesta alta de grasas y carnes rojas y una ingesta baja de alimentos ricos en fibra y antioxidantes. El alto consumo de alcohol, el tabaquismo, colitis crónica y la obesidad incrementan el riesgo de este padecimiento (Pan y Wang, 2018). El desarrollo de CRR ocurre en un proceso de cinco etapas, del 0 al IV; los cambios progresivos que va sufriendo el epitelio comienzan con lesiones en el epitelio llamadas focos de críptas aberrantes (FCA). Los genes involucrados en este cáncer incluyen aquellos que son inactivados como *apc*, *tgfrbr2*, *tp53*, *smad4* y *pten*; activados de forma constitutiva como *KRAS* o sobre expresados como *myc* (Figura 5) (Strubberg y Madison, 2017; Terzic *et al.*, 2010). Existen diversos mecanismos tanto genéticos como epigenéticos que modulan la expresión de ciertos genes, de igual manera algunas modificaciones postraduccionales que definirán si se forma o no una proteína, permitiendo que el proceso de carcinogénesis avance (Williams *et al.*, 2016). Se ha reportado que la expresión y modulación de los REs en colon son eventos que intervienen en la

carcinogénesis de colon, resultando en el aumento de RE α que promueve proliferación, y disminuyendo los RE β que disminuyen dicho proceso (Caiazza *et al.*, 2015). Por lo que se sugiere que el BPA pudiera promover la carcinogénesis a través de su interacción con RE. También se ha descrito la importancia de GPR30 en el proceso carcinogénico en cáncer de colon, este es un gen supresor de tumores, el cual se ve disminuido a medida que avanza el proceso carcinogénico esto como resultado de una mayor metilación en la zona promotora del gen, la menor cantidad del mismo se correlaciona con un peor pronóstico en el paciente. Sin embargo, se ha visto que tras el tratamiento estrogénico el aumento de GPR30 activado por estrógenos contribuye a la migración y proliferación celular (Jacenik *et al.*, 2019).

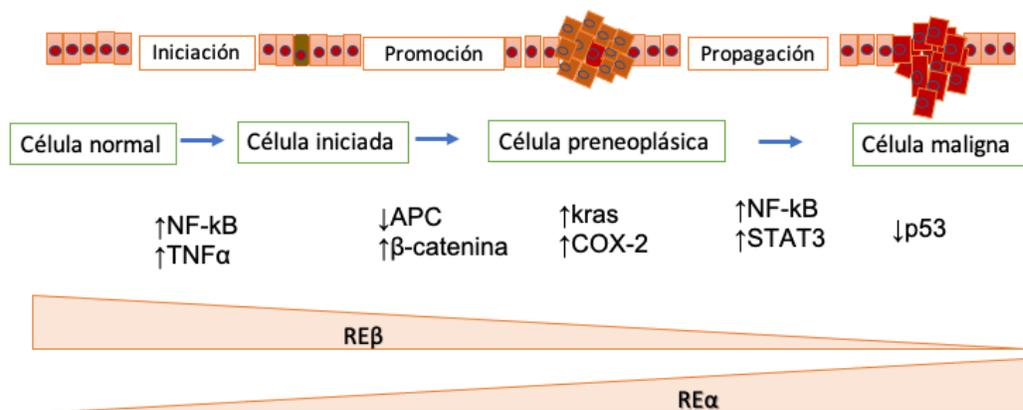


Figura 5. Modelo de carcinogénesis de cáncer de colon. Modificado de: Terzic *et al.*, (2010).

2.5.1. Mecanismos epigenéticos en cáncer de colon

El término epigenética se refiere a la regulación genética mediada por las modificaciones en la estructura de la cromatina o por aquellos cambios heredables de la expresión génica independientes de la secuencia de nucleótidos cuyos cambios pueden ser resultado de metilaciones del DNA (principalmente en dinucleótidos CpG por acción de la ADN metiltransferasas), modificación de histonas, inestabilidad de microsatélites, remodelación de cromatina y expresión de

miRNAs. Estas modificaciones epigenéticas están relacionadas con el control de la transcripción, replicación, reparación y condensación del DNA. En el DNA las secuencias CpG se encuentran metiladas 10-20 veces mayor en zonas promotoras del gen que en el resto, lo que trae como consecuencia formación de heterocromatina y silenciamiento de genes con más frecuencia; de encontrarse la metilación en otra parte del gen, posiblemente se tenga como resultado una proteína diferente (Danese y Montagnana, 2017). En cáncer de colon dentro de las modificaciones epigénéticas más estudiadas podemos encontrar la hipometilación, la cual se asocia a elementos de ADN transponibles repetitivos en el genoma, como los LINE-1, y la hipermetilación del promotor. Varios meta-análisis prueban que en cáncer de colon el gen SEPT9 se encuentra metilado, SEPT9 codifica septinas las cuales intervienen en la citocinesis y remodelación del citoesqueleto. Actualmente se usa como biomarcador de cáncer de colon en su forma metilada (Nian *et al.*, 2017). En cuanto a la hipermetilación de otros genes, depende de la vía en que se generó el pólipo, algunos genes como SLC5A8, ITGA4, SFRP2, PTCH1, CDKN2A, HLTF, MGMT y REβ se han encontrado hipermetilados jugando un papel importante en la progresión del adenoma a adenocarcinoma en colon (Danese y Montagnana, 2017).

2.5.2. miRNA y cáncer de colon

Los miRNA son transcritos generalmente por la polimerasa II de RNA en la mayoría de las ocasiones a partir de sus propios loci, están compuestos alrededor de 21-23 nucleótidos, pueden participar en la biogénesis, degradación y secuestro de ARNm; en cáncer, están relacionados con el incremento en la expresión de oncogenes o en la reducción en la expresión de genes supresores de tumores (Strubberg y Madison, 2017). En cáncer de colon se han descrito varios miRNAs que impiden que se transcriban ciertas proteínas clave en el proceso de carcinogénesis: algunos como mir-135a/b inactivan APC, lo que promueve la supervivencia de la célula; otros inhiben Tp53 como mir-125 lo que promueve la progresión del cáncer y otros como mir-130a, mir-301a y mir-454 son clave para

producir metástasis inhibiendo SMAD4. Aunque se han descrito varios miRNAs, faltan estudiar los mecanismos en los que pudieran intervenir los REs, ejemplo de ello es el cluster miR-200 que incluye miR-200a/b/c y miR-141, algunos autores han reportado que el RE α promueve la expresión de miR-200c y que la expresión de miR-200c se encuentra elevada tanto en tejido como en suero de pacientes con cáncer de colon relacionándolo con metástasis y un mal pronóstico de vida; por su parte miR-141 también se ha relacionado con promover cáncer de colon ya que inhibe MAP2K4 (Ding *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2022; Mohammadi *et al.*, 2016; Strubberg y Madison, 2017).

2.5.3. Líneas celulares cáncer de colon (CC)

Para conocer los mecanismos moleculares asociados a alguna patología específica, el modelo biológico del cultivo celular es de gran utilidad, a través de líneas celulares del órgano blanco que se pretende estudiar y la manipulación controlada de condiciones que nos permitan llegar a una respuesta acertada. Una de las líneas de CC más estudiadas son las HT-29, la cual fue aislada de un tumor primario de humano género femenino de 44 años de raza caucásica, presenta expresión de los oncogenes MYC, RAS, MYB, FOS, SIS, P53, ABL, ROS, SRC. Poseen microvellosidades, microfilamentos, mitocondrias grandes, vacuolas con gránulos oscuros, retículo endoplasmático liso y rugoso con ribosomas libres, gotitas de lípidos, pocos lisosomas primarios y varios secundarios. Otra línea de celular empleada para estudios de CC son las SW480, células epiteliales de colon humano masculino de raza caucásica, con enfermedad de Dukes tipo B, el cual tenía un adenoma en fase temprana; este tipo de línea celular presenta mutación en RAS. También existen líneas celulares sin cáncer utilizadas como control de contraparte normal, como las CCD-112CoN (ATTC, 2018). Las líneas celulares descritas se han empleado para elucidar diversos mecanismos relacionados con cáncer de colon, uno de ellos son el papel de receptores estrogénicos (RE) en el desarrollo de cáncer de colon (Arai *et al.*, 2000).

III. HIPOTESIS

El extracto de la fermentación *in vitro* de la naringenina presenta efecto quimioprotector en células de cáncer de colon expuestas a bisfenol A, a través de mecanismos epigenéticos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto quimioprotector del extracto de fermentación *in vitro* de la naringenina sobre células de cáncer de colon expuestas a bisfenol A, así como proponer el epigenético involucrado.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener un extracto de la fermentación (EF) de la naringenina a través de una simulación de la fermentación colónica y realizar su caracterización.
- Evaluar el efecto del tratamiento con naringenina o su EF sobre la proliferación de células de cáncer de colon expuestas a bisfenol A.
- Analizar el mecanismo de muerte celular en células de cáncer de colon expuestas a bisfenol A tratadas con naringenina o con EF.
- Elucidar mecanismos epigenéticos involucrados en el efecto de la naringenina y su EF sobre las células de cáncer de colon expuestas a bisfenol A.

V. METODOLOGÍA

5.1. Materiales

5.1.1. Material biológico

Línea celular HT-29, SW480 y 3T3-L1 obtenidas de la ATCC® Manassas, VA, USA.

5.1.2. Material químico

Medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM); Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA).

Naringenina (#N5893), Bisfenol A (BPA) (#239658), Bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo (MTT) (#M2128), caseína peptonada, HCl, NaCl, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂, NaOH, pepsina, pancreatina, Tween, hematina, glucosa, cristal-violeta, formaldehído, kit de análisis LDH (#MAK066), kit de análisis SOD (#19-160); Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Kit de análisis para Anexina-V (#602128), Millipore, Merk. Columnas de Silica-gel (#PP-210S) y Kit SCRIPT cDNA (#77176); Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany). Kit Radiant TM Green Hi-ROX qPCR (#QS2005); Radiant molecules, Alkali Scientific Inc. Arreglo Human RT2 Profiler Real Time PCR (PAHS-027A); Quiagen, SABiosciences, USA.

5.2. Metodología

5.2.1. Digestión y fermentación *in vitro* de la naringenina

Para la digestión y obtención del extracto de la fermentación de la naringenina se realizó una simulación del tracto gastrointestinal siguiendo la metodologías descritas por Campos-Vega *et al.*, (2015) y Campos-Vega *et al.*, (2009) . La digestión de la naringenina incluye los pasos de boca, estómago, intestino delgado y colon. Para este último se tomaron cuatro muestras de heces humanas de

pacientes aparentemente sanos sin historial de consumo de antibióticos al menos en los últimos tres meses; se tomaron 9 mL de medio de cultivo basal estéril (agua peptona, extracto de levadura, NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaHCO₃, cisteína, sales biliares, tween y hematinina diluida en NaOH 1M) en condiciones anaeróbicas (H₂, CO₂, N₂, 10:10:80 respectivamente) durante 48 h. Posteriormente el inóculo fecal (3 g de materia fresca) se homogenizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1M (pH 7.0) y se añadió 1 mL de este homogenizado al medio de cultivo adicionando 10 mL de naringenina previamente digerida.

5.2.1.1. Actividad antioxidante

Se cuantificó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox del EF y de la naringenina pura, mediante los ensayos de TEAC, DPPH y ORAC. Para la prueba de DPPH, la muestra se incubó durante 30 min en obscuridad y se midió la absorbancia a 525 nm.

Para el ensayo TEAC, se empleó el radical ABTS. Las mediciones de la absorbancia se llevaron a cabo a 734 nm durante 6 min, se empleó la siguiente fórmula para calcular los valores TEAC:

$$\Delta\text{Abs}_{\text{Trolox de la muestra}} = (\text{Abs}_{t=0 \text{ Trolox de la muestra}} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min Trolox de la muestra}}) - \Delta\text{Abs}_{\text{Solvente (0-6 min)}}$$

Para determinar la capacidad antioxidante con base en la metodología ORAC, se mide la desintegración de fluoresceína entre el blanco y la muestra. Las lecturas se realizan a una excitación λ de 493 nm y una rendija de excitación 5, una emisión λ 515 nm y una rendija de emisión 13, con un atenuador al 1%. Se prepararon soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M en PBS (75 mM) AAPH 0,6 M en PBS (75 mM). La muestra contiene 21 μL de fluoresceína, 2.899 μL de PBS, 30 μL del extracto analizado y 50 μL de AAPH.

En los diferentes ensayos, se realizó la curva estándar de Trolox (Re *et al.*, 1999; Ou *et al.*, 2001).

5.2.1.2. Identificación de metabolitos

Los metabolitos generados de la fermentación se identificaron por HPLC en una columna C18 a 35°C. La fase móvil A consiste en agua/metanol/ CH₂O₂ 5N (98.9 /1/ 0.1 v /v / v) y la fase móvil B de acetonitrilo/agua/ CH₂O₂ 5N (1 /98.9 / 0.1 v /v / v). El tiempo de ejecución es de 23 min seguido de un retraso 1 min antes de la próxima inyección. Las lecturas de naringenina, ácido 3(4-hidroxifenil) propiónico, ácido 3(2,4- Dihidroxifenil) propiónico, ácido 3,4 dihidroxifenil acético, ácido 3,4 dihidroxibenzoico, homo vanillico y 4-metilcatecol fueron a 280 nm, p-cumárico a 320 nm.

También se identificaron por cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento (UPLC) de la marca Waters UPLC Acquity I-class con detector de PDA acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo VION QtoF. La leucina encefalina se inyectó en una concentración de 200 pg/μl con un flujo de 10 μl/min. Las inyecciones se llevaron a cabo en modo MS^e. Los datos fueron analizados en el programa UNIFI 1.9.

5.2.2. Cultivo Celular

Las líneas celulares HT-29, SW480 y 3T3-L1 se obtuvieron de cultivos iniciales en placas. Se empleó el cultivo DMEM conteniendo glucosa (4.5 g/L) y L-glutamina para las líneas celulares. El medio se suplementó con suero fetal bovino (SFB) al 10% y estreptomina/penicilina al 1%. Las células se mantuvieron incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los subcultivos se realizaron en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar. Cuando las células se encontraban próximas a la confluencia (90% aproximadamente), se subcultivaron: quitando primero el medio, posteriormente se despegaron del soporte por incubación con tripsina-EDTA durante 3-5 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la tripsina con medio de cultivo suplementado con 10% SFB. Los tubos se colocaron a 3000 rpm en una centrifuga durante 5 min; el pellet de células se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo con la finalidad de contarlas

con ayuda de una cámara de Neubauer y se sembraron en diferentes placas según los ensayos a realizar.

5.2.2.1. Pruebas de viabilidad y citotoxicidad celular

Se evaluaron diferentes concentraciones de la naringenina (25-500 μM), extracto de la fermentación (25-43 %) y BPA (2.2, 4.4, 6.6 y 8.8 μM) con la finalidad de identificar la dosis en la que se pudiera presentar citotoxicidad para las líneas celulares. Posteriormente, se evaluó la naringenina (IC_{50} para cada línea celular) y BPA a una concentración de 4.4 μM (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{peso}$ que corresponde a la ingesta diaria tolerable) en coexposición. La prueba de viabilidad celular se realizó mediante el ensayo de MTT. Brevemente, las células se sembraron en microplaca estéril de 96 pozos (1×10^4 células/pozo) en medio de cultivo adicionado con SFB al 10%. A las 24 h de incubación, el medio se sustituyó por los tratamientos a diferentes concentraciones en medio con SFB al 2 %, incluyéndose controles negativo y positivo. Después de 24 h de tratamiento se adicionaron 200 μl de solución MTT a cada pozo y la incubación continuó a 37°C por 60 min. Pasado el tiempo se removió el sobrenadante y se añadió DMSO (200 μl) a cada pocillo y la incubación continuó a temperatura ambiente durante 5 min. El valor de densidad óptica de cada pozo se detecta a una longitud de onda de 540 nm. Para encontrar la concentración inhibitoria media (CL_{50}) se graficó el porcentaje de viabilidad contra concentración del tratamiento. El cálculo del porcentaje de viabilidad se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad (respecto al control negativo)} = (\text{DOt}/\text{DOc}) * 100.$$

Donde:

DOt: Densidad óptica promedio de los cultivos tratados

DOc: Densidad óptica promedio del control negativo

La CL_{50} se refiere a la concentración necesaria del tratamiento para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento.

5.2.2.2. Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad de LDH se determinó mediante un kit de citotoxicidad-LDH (MAK066, Sigma-Aldrich, USA). Brevemente, las células fueron sembradas en microplacas de 96 pozos (2×10^6 células/pozo) en medio de cultivo DMEM adicionado con SFB (10 %), antibióticos y antimicóticos (1 %). A las 24 h de incubación, el medio se sustituyó por medio DMEM al 2% de SFB, conteniendo las diferentes concentraciones de los tratamientos evaluados y se incubaron durante 24 h. Como control negativo se empleó células sin tratamientos y como control positivo células tratadas con tritón X-100, y mantenidos con medio DMEM al 2 % de SFB. Después de 24 h de incubación se recuperó el sobrenadante y se transfirió a una microplaca de 96 pozos, en donde posteriormente se añadió 100 μ l de la mezcla de reacción de acuerdo a la metodología recomendada por el proveedor, y se incubó a temperatura ambiente por 20 min, protegidos de la luz. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Multiskan Ascent 51118307, ThermoScientific, USA).

5.2.2.3. Apoptosis

Para la prueba de apoptosis se empleó el kit que detecta Anexina 5 (602128, Millipore, Merk) ya que tiene gran afinidad a la fosfatidilserina, la cual se externaliza en la membrana de células apoptóticas. Se colocó las líneas celulares (1×10^5 células/mL) incluyendo el control positivo y negativo de inducción de apoptosis. Se tomaron 100 μ L de Anexina 5, la cual será preparada bajo las condiciones del proveedor junto con 100 μ L de células suspendidas en medio suplementado con SFB 1%. Se incubaron por 20 min a temperatura ambiente y finalmente se analizaron en un Muse Cell Analyzer.

5.2.2.4. Actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se emplearon los ensayos de glutatión y superóxido dismutasa (SOD) en células tratadas con BPA (4.4 μ M), IC₅₀ de la naringenina, naringenina con 4.4 μ M de BPA, IC₅₀ del fermentado de

naringenina e IC₅₀ del fermentado con 4.4 µM de BPA. Para determinar la actividad de SOD se siguieron las especificaciones del kit, el cual se basa en la capacidad de inhibir la xantina oxidasa (19160, Sigma Aldrich), de igual manera para la determinación de glutatión reducido se siguieron las indicaciones del proveedor del kit empleado el cual provee de glutatión reductasa (CS0260, Sigma Aldrich).

5.2.2.5. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Se cultivaron 1.5×10^5 células por pocillo en placa con fondo oscuro, se expusieron bajo los diferentes tratamientos durante 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA, Sigma Aldrich) (20 µM); incubándolas a 37 ° C durante 45 minutos en la oscuridad; transcurrido esto las células se lavaron con PBS y se realizó la lectura con un lector de placas de fluorescencia a Ex / Em = 485/535 nm. Como control positivo se empleó tritón X-100.

5.2.2.6. Determinación de la expresión de genes

Para determinar la expresión de RE α , RE β , DNMT1 y GPER30 en las diferentes líneas celulares tratadas con naringenina y BPA, primero se extrajo el ARN total de las células empleando membranas de silica-gel de la marca Jena Bioscience GmbH (PP-210S, Jena, Germany), posteriormenete se realizó la síntesis de cDNA empleando cebadores Oligo dT y el kit SCRIPT cDNA de la marca ena Bioscience GmbH (PCR-511XS, Jena, Germany) bajo las siguientes condiciones: 50°C por 40 min, 70°C por 10 min y se estandarizaron condiciones de amplificación en PCR punto final empleando GoTaq Flexi DNA Polymerase de Thermo Scientific.

Finalmente se hicieron pruebas de qPCR empleando QS2005, RadiantTM Green Hi-ROX qPCR Kit (Radiant molecules. Alkali Scientific) empleando β -actina como gen constitutivo para la normalización. Los oligos empleados son los siguientes:

Tabla 1. Secuencias Foward y Reverse de genes RE α , RE β , DNMT1 y GPER30

Gen	Fwd-primer	Rev-primer	Alineación
β-Actina	ACGGGGTCACCCCACTGTGC	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG	62°C
ERβ	TCCCACTTCGTAACACTTCCG	ACATTCTATAGCCCTGCTGTGA	64°C
ERα	TGCTGGCTACATCATCTCGG	CAGGAACCTATCCCTCATATAG	60°C
GPR30	AGTCGGATGTGAGGTTTCCAG	TCTGTGTGAGGAGTGCAAG	60°C
DNMT1	CGACTACATCAAAGGCAGCAACCTG	TGGAGTGGACTTGTGGGTGTTCTC	60°C

5.2.2.7. Arreglo de PCR de la cascada de señalización de p53

Una vez que se extrajo el ARN de las células HT-29 tratadas con naringenina y BPA, se llevó a cabo la síntesis de cDNA por la metodología ya descrita empleando el kit SCRIPT cDNA (Jena Bioscience GmbH; Jena, Alemania). Se tomó 80 ng/ μ l de cDNA y se añadió RT2 SYBR Green Mastermix (330529, Quigen N.V.) para posteriormente alicuotarlo dentro del arreglo RT2 profiler PCR Array (PAHS-027SZ, Quiagen N.V.) y ser leído dentro del termociclador Applied Biosystem de Bio-Rad.

Finalmente, los datos fueron analizados dentro del programa de Quiagen, localizado en la siguiente liga: <https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>.

5.2.2.8. Expresión de miRNAs

Para la expresión de mir-200c y mir-141 se tomaron 2 μ l de ARN (100 ng/ μ l) de la línea celular HT-29 tratada con naringenina y BPA y se sintetizó el cDNA usando como iniciador el Stem Loop respectivo y el Kit SCRIPT cDNA Synthesis (77176, Jena Bioscience GmbH; Jena, Alemania) bajo las siguientes condiciones: 50°C por 40 min, 70°C por 10 min; posteriormente se llevó a cabo el qPCR empleado el antisentido universal y el iniciador sentido específico para cada miRNA, se tomó como gen constitutivo el U6, sintetizado a través del cebador Oligo dT y para qPCR cebadores FWD y REV correspondientes. Las condiciones de qPCR para ambos fueron las siguientes: 95°C por 2 min, 95°C por 0.05 s, 60°C por 20 s, y 65°C por 10

s empleando el kit Radiant™ Green Hi-ROX qPCR (QS2005, Radiant molecules. Alkali Scientific Inc.).

Tabla 2. Secuencias de Stem Loop e iniciador específico de miR-200c y 141, antisentido universal y secuencia Forward y Reverse de U6.

Stem Loop miR-200c	5'- GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TCCA TC - 3'
Stem Loop miR-141	5' – GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC CC ATCT - 3'
Antisentido universal	5' - GTGCAGGGTCCGAGGT - 3'
Iniciador específico miR-200c	5' - TGGGTTAATACTGCCGGGTAAT - 3'
Iniciador específico miR-141	5' - GGGGGTAACACTGTCTGGTAA - 3'
REV U6	5'- AAAATATGGAACGCTTCACGAAT – 3'
FWD U6	5'- CGCTTCGGCAGCACATATACTA – 3'

VI. RESULTADOS Y DICUSIÓN

6.1. Caracterización del extracto de fermentación (EF) de naringenina

Para la determinación de subproductos obtenidos durante el proceso de fermentación (6, 12 y 24 h) bajo la metodología de HPLC se emplearon los siguientes estándares: naringenina, ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico, ácido 3(2,4-Dihidroxifenil) propiónico, ácido 3,4 dihidroxifenil acético, ácido 3,4 dihidroxibenzoico, homo vanillico, 4-metilcatecol y *p*-cumárico. De éstos únicamente se detectaron naringenina y ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico a una absorbancia de 280 nm. En la Tabla 1 se observa una disminución de los mismos compuestos a medida que transcurre el tiempo de fermentación, teniendo una concentración de naringenina a las 6h de 148.19 ng/μl y disminuyendo a 113.43 ng/μl a las 24h; la misma tendencia se observa con el ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico, donde a las 6h de fermentación se obtiene una concentración de 42.52 ng/μl y finalmente a las 24h se obtiene una concentración de 8.19 ng/μl; posiblemente resultado del metabolismo microbiano en el cual se generan otros subproductos a medida que transcurre el tiempo.

Rechner *et al.*, (2004) reportaron tras condiciones similares de fermentación de la naringenina una disminución de la misma de 600-800 mg/l a 100-200 mg/l en menos de 10 horas y al mismo tiempo la generación de otros subproductos a medida que pasaba el tiempo como proroglucinol (50 mg/l a partir de las 25-30 h) ácido 3(3,4-dihidroxifenil) propiónico (100-300 mg/l a partir de las 10 h de fermentación) 3(3-hidroxifenil) (100-1500 mg/l a partir de las 24 h de fermentación) estos analizados por HPLC y por Gases-Masas.

Tabla 3. Cantidad de naringenina y ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico (ng/μl) determinados en el EF (6,12 y 24 h) por HPLC.

Cantidad de compuesto (ng/μl)

<i>Tiempo de fermentación</i>	Naringenina	3(3-hidroxifenil) propiónico
6h	148.19 ± 2.6 ^a	42.52 ± 4.38 ^b
12h	136.41 ± 8.6 ^a	29.08 ± 3.09 ^b
24h	113.43 ± 1.49 ^a	8.19 ± 3.41 ^b

Los resultados son expresados ± EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes con 4 réplicas. Diferente letra expresa diferencia estadística por la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Los compuestos identificados en el extracto fermentado (EF) de 24 h por la metodología de UPLC además de la naringenina y el ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico ya identificados por HPLC, incluyeron la apigenina, el ácido fenilacético y el secoisolariciresinol (Tabla 4, Figura 6), sin embargo; únicamente la apigenina pudiéramos considerarla subproducto ya que los otros dos compuestos también fueron identificados en el medio empleado para la fermentación (Blanco). Cabe mencionar que, bajo la metodología de HPLC, solo se encontró un pico más que no correspondía a la a los estándares empleados el cual corresponde a la apigenina identificada por UPLC. Algunos autores han reportado en ensayos con modelos animales, la formación de apigenina derivada de una dehidrogenación de la naringenina causada por el metabolismo de la microbiota colónica, si bien se han reportado algunos otros compuestos generados por el metabolismo microbiano, en el presente proyecto únicamente se identificaron el 3(3-hidroxifenil) propiónico y la apigenina como subproductos de la naringenina a las 24 h de fermentación (Zeng *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020).

Tabla 4. Compuestos del EF encontrados por UPLC

UPLC				
Tratamiento	Compuesto	Tiempo de retención	Masa molar g/mol	Estructura
BF	Ácido fenilacético	6.5 ±0.0	135.04	
	Secoisolariciresinol	11 ±0.0	361.16	
EF	Naringenina	8.63 ±0.01	271.06	
	3HPP	4.93 ±0.03	167.03	
	Apigenina	8.63 ±0.01	271.06	
	Secoisolariciresinol	11.6 ±0.0	361.16	
	Ácido fenilacético	6.43 ±0.01	135.94	
Naringenina	Naringenina	8.63 ±0.0	271.06	

Los resultados son expresados ± DE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes con 3 réplicas. TR (Tiempo de retención), EF (extracto fermentado de naringenina), BF (blanco de fermentación).

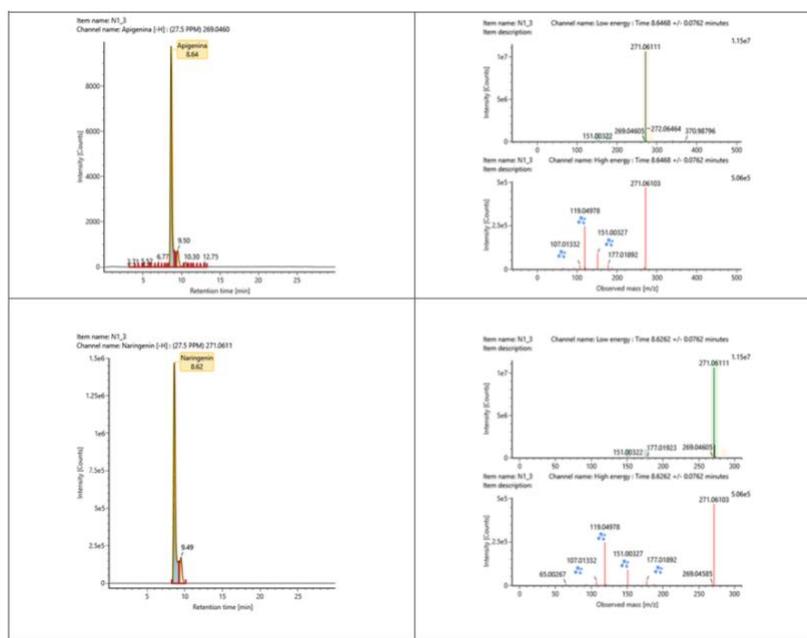


Figura 6. Cromatogramas representativos del UPLC

En cuanto a la actividad antioxidante de EF y naringenina determinada por las técnicas DPPH, ABTS y ORAC, se encontró que dependiendo de la técnica empleada el EF era capaz de reducir el compuesto oxidado de manera diferencial.

La técnica ABTS mide la capacidad de donar electrones al radical y la técnica de DPPH y ORAC, electrones y protones (átomos de hidrógenos), por lo que EF muestra capacidad de donar tanto electrones como protones, potenciando su capacidad reductora. Además, se encontró que los resultados de actividad antioxidante con respecto a la naringenina (5% de RSC que equivale a 52.97 μM eq.Trolox) concuerdan con lo reportado con algunos otros autores quienes han encontrado un 7% de RSC en el caso de la técnica DPPH (Teng *et al.*, 2018).

Aunado a lo anterior es importante señalar que la capacidad antioxidante de la naringenina disminuye una vez que es metabolizada, encontrando que en el EF por la metodología de DPPH existe una menor capacidad antioxidante, esto pudiera ser por que los subproductos generados difieren en cantidad y posición de grupos hidroxilos con respecto a la naringenina. Además se ha visto que cuando se encuentran más de un subproductos existe alguna interacción intermolecular que interviene en la capacidad de donar electrones. Sin embargo, los resultados encontrados por la metodología ORAC muestran que no hay diferencia entre EF y naringenina; ORAC a diferencia de DPPH emplea peróxido como radical, de manera similar que un sistema biológico por lo que a nivel fisiológico podríamos inferir que ambos tratamientos tendrán la misma capacidad antioxidante (Surco-Laos *et al.*, 2016).

Tabla 5. Capacidad antioxidante equivalente de Trolox por las metodologías DPPH, ABTS y ORAC en naringenina y EF de naringenina (24h).

	DPPH μM eq.Trolox	ABTS μM eq.Trolox	ORAC μM eq.Trolox
BF	35.27 \pm 0.7 ^a	5.14 \pm 0.02 ^a	2.02 \pm 0.1 ^a
EF 24 h	52.97 \pm 1.4 ^b	5.17 \pm 0.02 ^a	22.12 \pm 6.7 ^b
Naringenina	92.37 \pm 1.1 ^c	4.69 \pm 0.1 ^a	22.31 \pm 6.8 ^b

Los resultados son expresados \pm EE, y representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Diferente letra expresa diferencia estadística por la prueba de Tukey $p < 0.05$.

6.2. Viabilidad celular en células tratadas con naringenina, BPA, EF, coexposición de naringenina con BPA y EF con BPA

El efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular se determinó a través de la prueba de MTT. La línea celular 3T3-L1 se empleó como control de tejido normal (no transformado). Como se observa en la Figura 7, la viabilidad de las tres líneas celulares disminuye con el tratamiento de naringenina de forma dosis-dependiente, encontrando una IC_{50} de 250 μ M en células HT-29 y una IC_{50} de 150 μ M en células SW480 en un tiempo de exposición de 24 h. Es importante destacar que la IC_{50} encontrada en las células SW480 (150 μ M) es menor a la encontrada en células HT-29 (250 μ M) y esto podría explicarse a la diferencia en estadios del proceso carcinogénico que cursan ambas líneas celulares, ya que las células SW480 presentan un estadio menos avanzado que las HT-29. Las células SW480 además de presentar menor cantidad de genes mutados también tienen un menor estrés oxidativo y mayor expresión de receptores estrogénicos del tipo β , por lo que esto pudiera permitir un mejor efecto de la naringenina (Arai *et al.*, 2000).

En cuanto a la viabilidad celular en células 3T3-L1 se puede apreciar que incluso a concentraciones muy elevadas (500 μ M) se obtiene un 74% de viabilidad celular, por lo que el compuesto en células no cancerosas no presenta un peligro citotóxico.

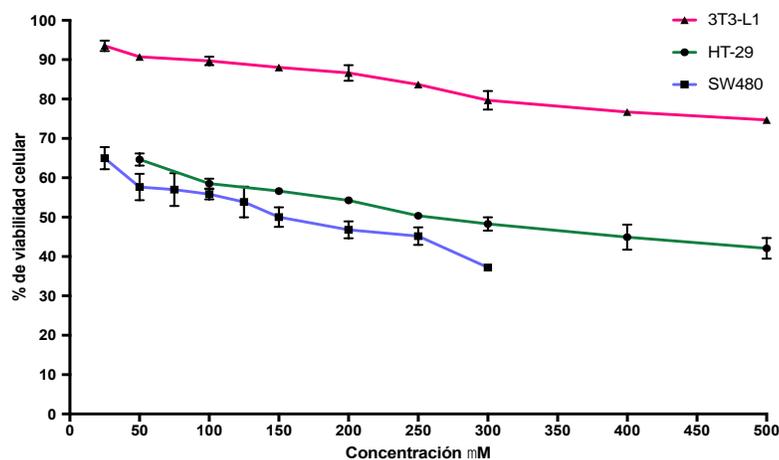


Figura 7. Curva dosis-respuesta de la naringenina a 24 h de exposición [25-500 μ M] en 3T3-L1, [50-500 μ M] en HT-29 y [25-300 μ M] en SW480. Los resultados son expresados \pm EE, y representan el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas.

Respecto a la viabilidad de células HT-29 y SW480 tratadas con EF (25-43%) como se observa en la Figura 8, a medida que aumenta la concentración del mismo, disminuye la viabilidad de las células, obteniendo una IC₅₀ de 37% (153 μM de naringenina y 18.20 μM de ácido 3(4-hidroxifenil) propiónico) en células HT-29 y una IC₅₀ menor, de 34% (141 μM de naringenina y 16.72 μM de ácido 3(4-hidroxifenil) propiónico) en SW480, tendencia que se presenta de manera similar cuando las células son tratadas únicamente con naringenina. El efecto del extracto de la naringenina se observa más potente en ambas líneas celulares, lo que sugiere que los subproductos que se generan de la naringenina están contribuyendo al efecto inhibitorio en líneas de cáncer de colon (Hester *et al.*, 2015).

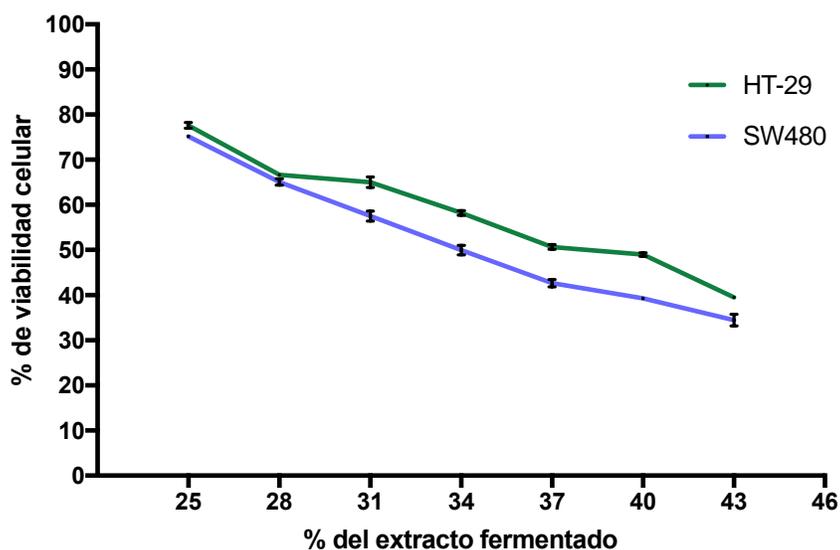


Figura 8. Curva dosis-respuesta del extracto de fermentación de la naringenina [25-43%] a 24h de exposición en células HT-29 y SW480. Los resultados son expresados \pm EE, y representan el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas.

Los resultados encontrados del efecto del BPA con un tiempo de exposición de 24 h sobre la viabilidad de células SW480 y HT-29 se pueden apreciar en la Figura 9, encontrando que no existe diferencia significativa en los grupos tratados, por lo que el BPA no tiene un efecto citotóxico ni proliferativo a concentraciones de 2.2- 8.8 μM en estas líneas celulares. Posiblemente a nivel molecular puede ser que

se estén modulando algunas proteínas que intervienen en proliferación celular como lo reportado por Chen *et al.*, (2015) en células de Leyding (células localizadas en testículos) quienes a pesar de no observar efecto en la viabilidad celular reportaron la expresión de proteínas de migración celular como E-cadherina y Vimentina. Otros autores como Huang *et al.*, (2017) han evaluado diferentes concentraciones de BPA (0.1-1000 nM) en células epiteliales de próstata, reportando un efecto parecido al encontrado en nuestros resultados, en el que con una viabilidad del 98% existe un aumento en la expresión de receptores estrogénicos tanto α como β (10 % más aproximadamente).

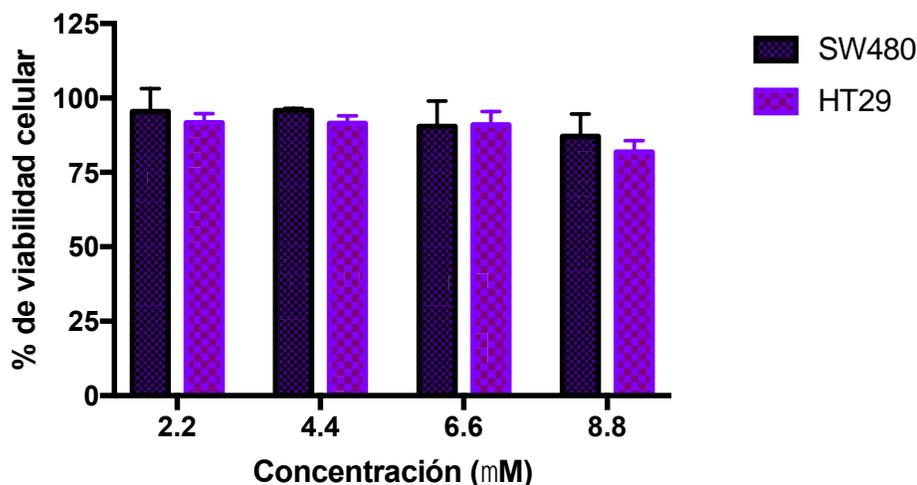


Figura 9. Viabilidad celular con en células SW480 y HT-29 [2.2, 4.4, 6.6, 8.8 μ M] con exposición de 24 h. Los resultados son expresados \pm EE, representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Diferente letra expresa diferencia estadística por la prueba de Tukey $p < 0.05$

Los efectos de la coexposición de BPA (4.4 μ M) la cual corresponde a 50 μ g/kg/peso (Ribeiro-Varandas *et al.*, 2014) y naringenina (250 μ M para HT-29 y 150 μ M para SW480) al igual que la coexposición del EF de naringenina (37% para HT-29 y 34% para SW480) y BPA en las dos líneas de cáncer de colon empleadas se pueden apreciar en la Figura 10, donde el efecto antiproliferativo de la naringenina y su extracto fermentado se conserva aún cuando las células fueron expuestas a BPA en ambas líneas celulares, lo cual permite sugiere que la naringenina y su EF

tienen un efecto protector e inhibitorio del posible efecto citotóxico del BPA. Bulzomi *et al.*, (2012), encontró una inhibición de RE α en células de cáncer de mama tratadas con naringenina y expuestas a BPA, por lo que se puede sugerir un mecanismo similar, recordando que RE α promueve cascadas de señalización proliferativas antagónicas al RE β , quien promueve apoptosis (Lecomte *et al.*, 2017). Además, algunos autores han descrito la actividad agonista de la naringenina en RE β quien a su vez inhibe la expresión de RE α (Caiazza *et al.*, 2015). Arai *et al.*, (2000) evaluaron por qPCR la expresión de RE en diferentes líneas celulares, encontrando una menor expresión RE β en HT-29 que en SW480, lo que sugiere que la naringenina pudiera estar actuando de forma agonista con el RE β promoviendo cascadas de señalización apoptóticas. En cuanto al EF, recordemos que el efecto observado es resultado de la intervención de diferentes subproductos de la naringenina generados durante el proceso fermentativo, uno de ellos es el ácido 3(3-hidroxifenil) propiónico, el cual algunos autores reportan que promueve procesos de apoptosis, además de tener actividad antioxidante y antiinflamatoria (Kang *et al.*, 2014).

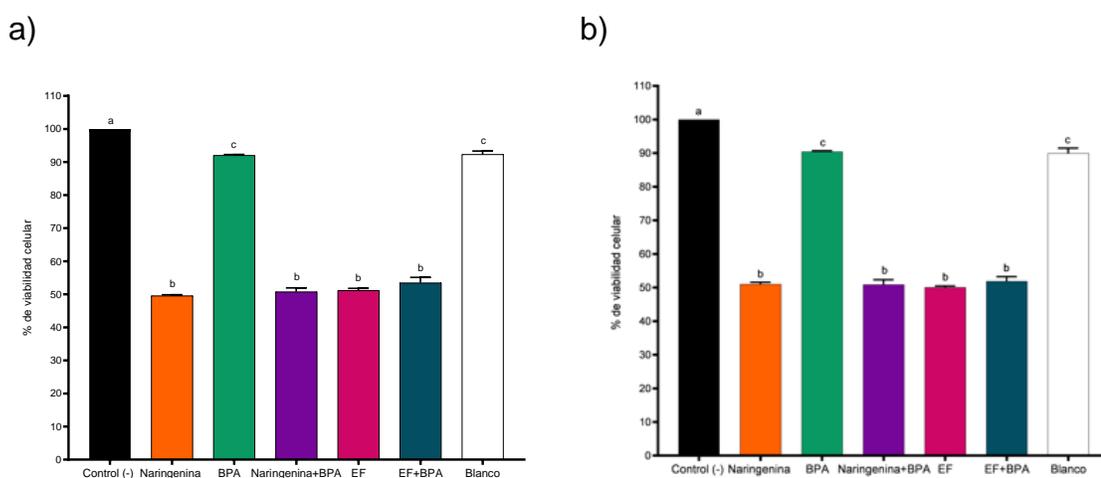


Figura 10. Coexposición. a) Células HT-29, b) Células SW480. Tratamientos: naringenina (250 μ M para HT-29, 150 μ M para SW480), EF (37% para HT-29, 34% para SW480) con y sin BPA (4.4 μ M) y el blanco de fermentación 10% con exposición de 24 horas. Los resultados son expresados \pm EE, y representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Diferente letra expresa diferencia estadística por la prueba de Tukey $p < 0.05$.

6.3. Citotoxicidad en células HT-29 y SW480 tratadas con naringenina, BPA y EF.

Además de las pruebas de viabilidad, se realizó la detección de lactato deshidrogenasa (LDH). La enzima LDH se emplea como reportera cuando la célula ha muerto por necrosis, que es un tipo de muerte celular que provoca inflamación y estallido de organelos celulares lo que posteriormente conlleva a un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que el contenido de la célula se exponga, incluyendo la LDH (Kumar *et al.*, 2018).

En la Figura 11 se muestra que las células sometidas a los diferentes tratamientos presentan diferencia en la citotoxicidad con respecto al control tanto en la línea celular HT-29 como SW480, en estas últimas las células fueron tratadas tanto con naringenina como con su EF.

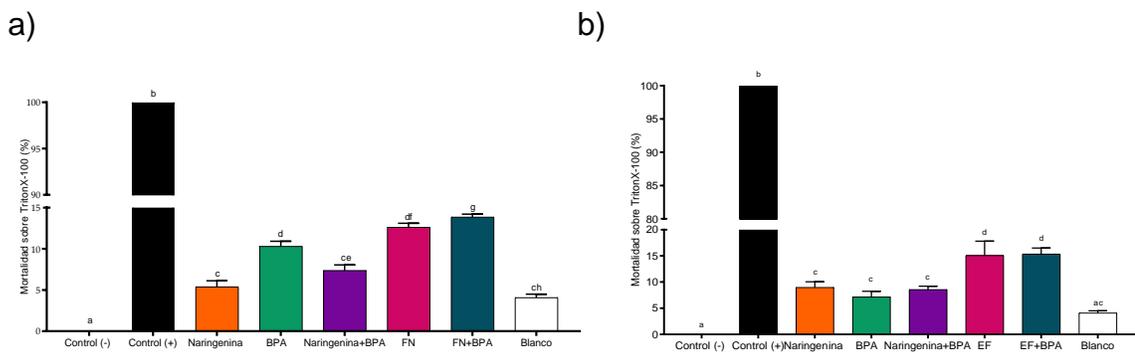


Figura 11. Ensayo de LDH. a) Células HT-29 (250 μ M de naringenina con y sin 4.4 μ M de BPA; 37% de EF con y sin 4.4 μ M de BPA), b) Células SW480 (150 μ M de Naringenina con y sin 4.4 μ M de BPA, 34% de EF con y sin 4.4 μ M de BPA) y su blanco de fermentación al 10%, con una exposición de 24 horas. Los resultados son expresados \pm EE, y representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Diferencia letra indica diferencia estadística de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En ambas líneas celulares las células tratadas con naringenina con o sin coexposición presentan un porcentaje de LDH menor al 10%, de igual manera que las que fueron tratadas únicamente con BPA. En cuanto a las células tratadas con EF con o sin BPA presentan un ligero incremento en citotoxicidad, cercano al 15%. Si ponemos atención en el porcentaje que presenta el blanco de fermentación (5%), la diferencia que presenta el EF y la naringenina pudiera deberse a éste.

Los mecanismos de muerte celular por los cuales actúan los flavonoides suelen ser diversos. Alvarado-Sansininea *et al.* (2018) reportó un efecto necrótico del 15-30% inducido por algunos flavonoides como quercetina y patuletina, explicando que los mecanismos de muerte celular de los mismos pueden ser combinados como apoptosis y necrosis, lo que sugiere que en el presente ensayo podría estar ocurriendo un efecto similar.

6.4. Apoptosis celular

Los resultados obtenidos del ensayo de Anexina 5 para determinar apoptosis mediante citometría de flujo tanto en la línea celular HT-29 (Figura 12a) como en la línea celular SW480 (Figura 12b) muestran que las células tratadas con naringenina y EF con y sin BPA presentan un mayor número de células en apoptosis en comparación a las células control, esto es importante ya que el mecanismo de apoptosis es un evento de muerte celular empleado para promover la homeostasis y mantener un estado de salud. En células cancerosas este proceso se encuentra inhibido, por lo que los resultados al emplear naringenina como tratamiento se muestran satisfactorios como tratamiento, no importando que la célula se encuentre expuesta al BPA. Además, integrando los resultados de necrosis y apoptosis, se puede mencionar que el porcentaje de células muertas que se presentan en el gráfico coincide con los porcentajes de citotoxicidad, por lo que las células tratadas con BPA que mueren son por mecanismos citotóxicos (10%) a diferencia de las células tratadas con naringenina, las cuales del 50% que mueren cerca del 40% lo hacen por mecanismos apoptóticos y cerca del 10% por necrosis. Resultados similares reportaron Bulzomi *et al.*, (2012) quienes determinaron en células de cáncer de mama que el BPA (10 μ M) en coexposición con naringenina (100 μ M) presentan un efecto apoptótico ya que existe una disminución de las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, mecanismo que podría verse implicado en nuestros modelos celulares.

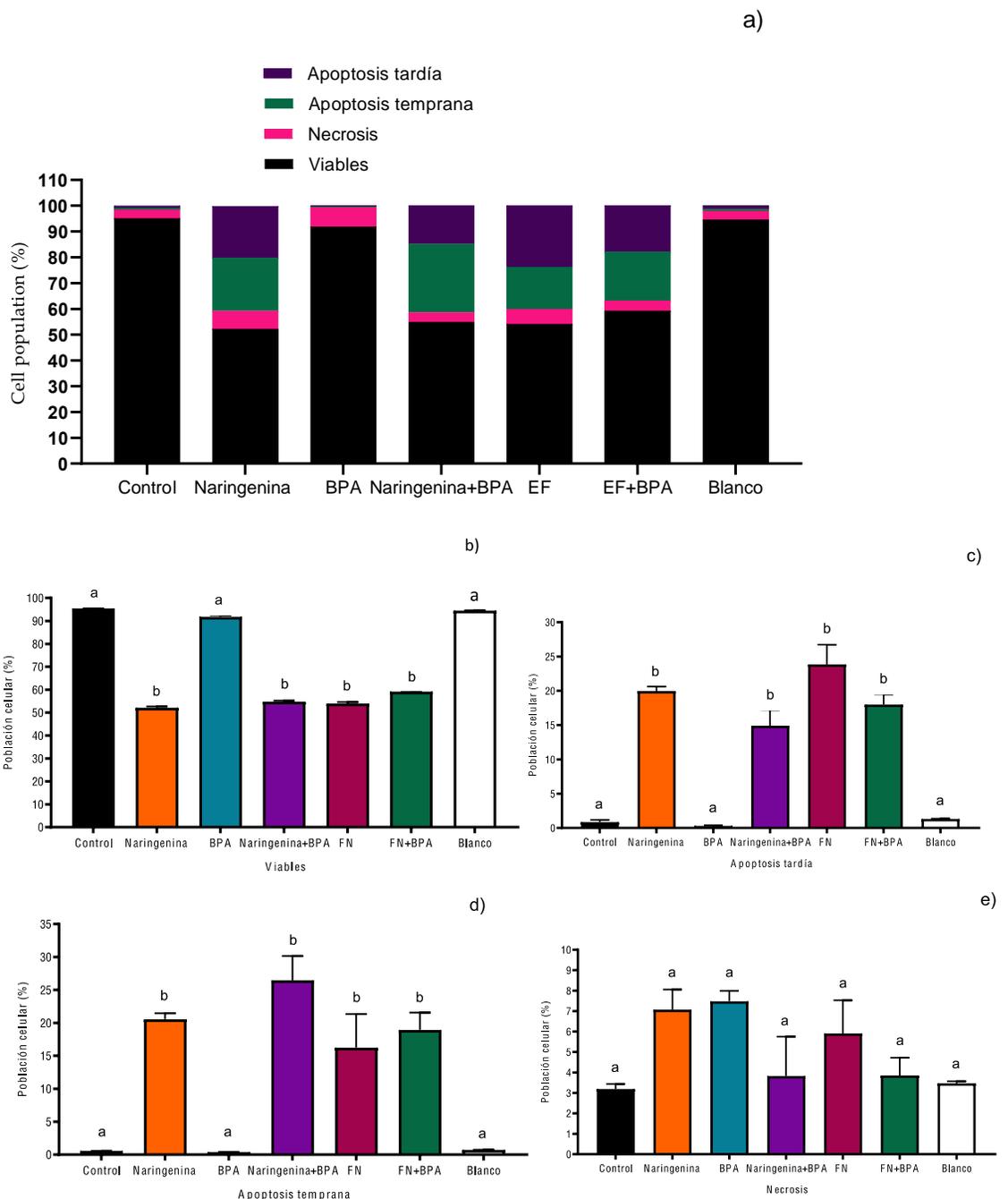


Figura 12. Efecto de la coexposición de naringenina (IC_{50} 250 μ M) y FN (IC_{50} 37%) con y sin BPA (4.4 μ M) en células HT-29 a 24 horas y su blanco de fermentación al 10%. a) Población celular total b) Células viables, c) Células en apoptosis tardía, d) Células en apoptosis temprana, e) Células con necrosis. Los resultados son expresados como porcentaje de población celular (%) \pm EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes con 2 réplicas. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

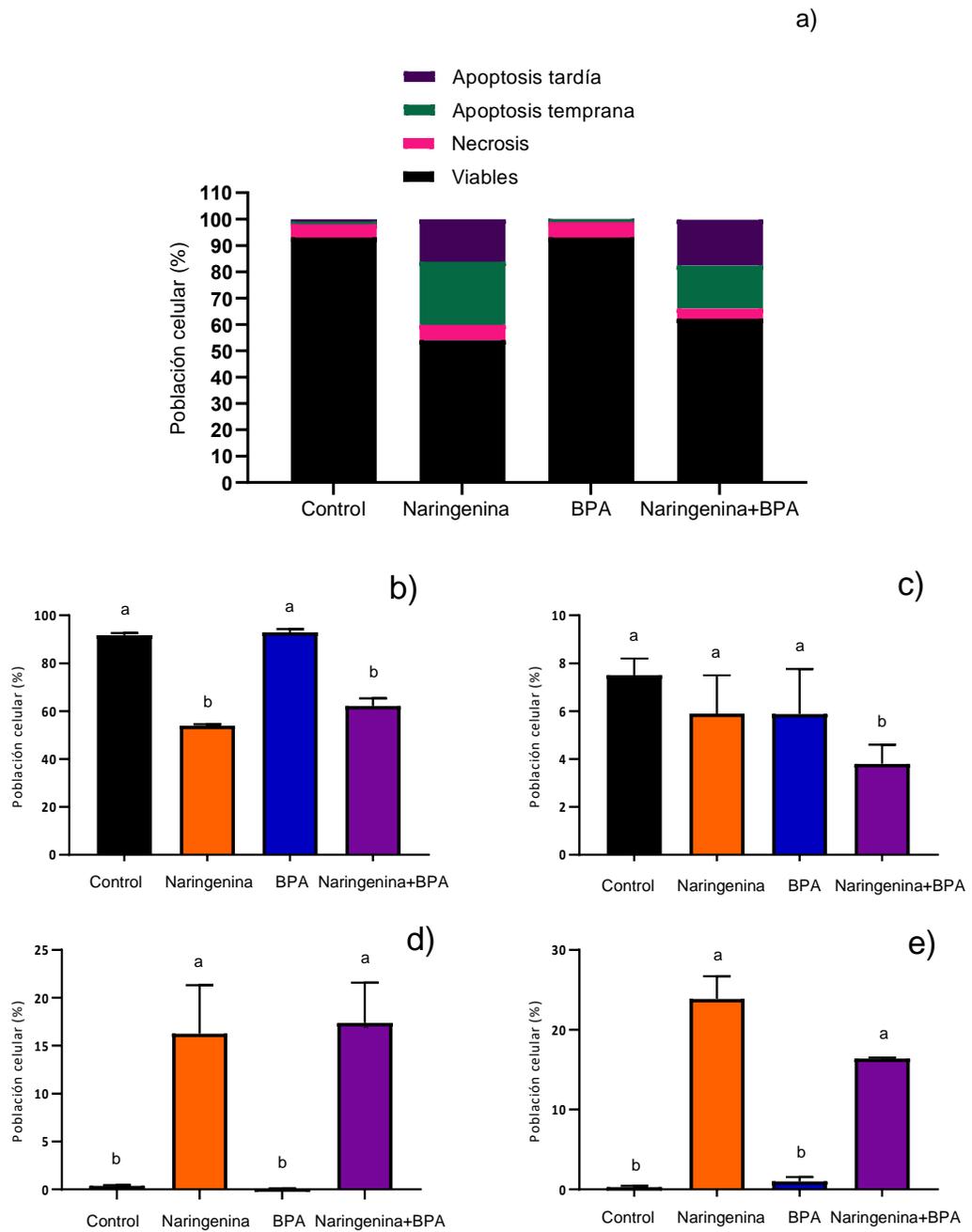


Figura 13. Efecto de la coexposición de naringenina (IC₅₀ 150 μ M) con y sin BPA (4.4 μ M) en células SW480 a 24 horas y blanco de fermentación al 10%. a) Población celular total b) Células viables, c) Células con necrosis, d) Células en apoptosis temprana, e) Células en apoptosis tardía. Los resultados son expresados como porcentaje de población celular (%) \pm EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes con 2 réplicas. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

6.5. Actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se determinó la actividad de superóxido dismutasa (SOD), se cuantificó la cantidad de glutatión reducido y se determinó la cantidad de ROS en células HT-29 bajo los diferentes tratamientos descritos. La función de SOD es dismutar el anión de peróxido a peróxido de hidrógeno. Existen tres isoenzimas de SOD, Cu / Zn SOD (SOD1), SOD3 se ha relacionado con la inhibición de crecimiento tumoral y metástasis; SOD1 y SOD2 se han visto aumentadas en diferentes etapas del cáncer (Rao *et al.*,2008) . En cáncer de colon, así como en otros tipos de cáncer SOD1 promueve la supervivencia y la transición epitelio-mesenquimal (Griess *et al.*, 2017). El kit empleado mide la actividad de todas las isoenzimas de SOD y se puede observar que en células HT-29 tratadas con EF (Figura 14) tienen una mayor actividad de SOD, lo cual implicaría la activación de sistemas antioxidantes pero en consiso la generación de H₂O₂, el cual pudiera estar promoviendo apoptosis celular. En la Figura 15, se puede apreciar la generación de ROS bajo este tratamiento lo que explicaría la activación de mecanismos apoptóticos desencadenados por ROS. Lo anterior concuerda con lo reportado por Tavsan *et al.* (2019), quienes encontraron que flavonoides como la apigenina, luteolina y miricetina aumentan ROS en células de cáncer de ovario desencadenando apoptosis intrínseca evidenciada por la activación de caspasa-9 y caspasa-3.

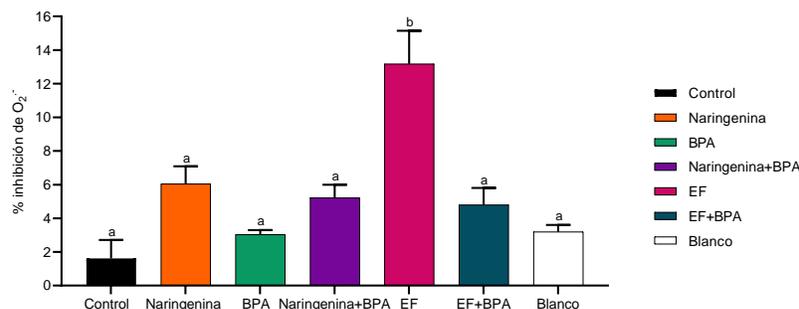


Figura 14. Actividad de SOD en células HT-29 (250 μ M de naringenina con y sin 4.4 μ M de BPA; 37% de EF con y sin 4.4 μ M de BPA y blanco de fermentación al 10%) con una exposición de 24 horas. Los resultados son expresados como el porcentaje de inhibición de O₂^{·-} \pm EE, y representan el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

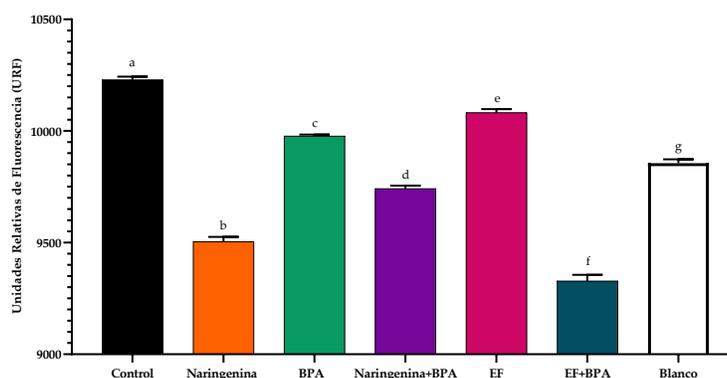


Figura 15. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células HT-29 tratadas (250 μ M de naringenina con y sin 4.4 μ M de BPA; 37% de EF con y sin 4.4 μ M de BPA y blanco de fermentación al 10%), con una exposición de 24 horas. Los resultados son expresados \pm EE, y representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los resultados de glutatión reducido (GSH) que se pueden apreciar en la Figura 16, muestran que las células HT-29 tratadas con naringenina presentan una disminución estadísticamente significativa de GSH. En muchos tipos de cáncer existe una desregulación en GSH por lo que se encuentra sobre expresado, confiriéndole a la célula cancerígena protección contra la agresión relacionada con el microambiente tumoral, evasión de la apoptosis, capacidad colonizadora y resistencia a quimioterapéuticos. Se ha visto que los flavonoides disminuyen la cantidad de GSH en células de cáncer favoreciendo su utilización como mecanismo antioxidante. Por lo que la disminución de GSH bajo el tratamiento de naringenina está involucrado en la promoción de mecanismos apoptóticos (Kim *et al.*, 2015).

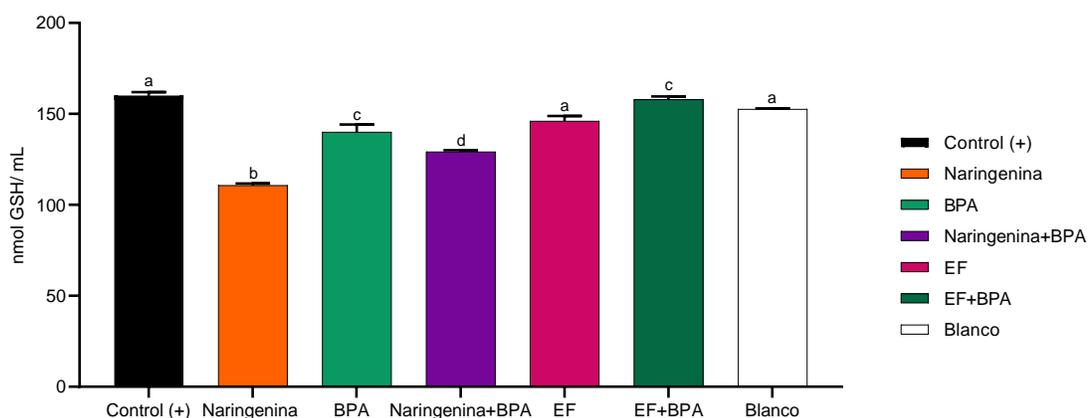


Figura 16. Glutati3n reducido en c3lulas HT-29 tratadas con 250 μM de naringenina con y sin 4.4 μM de BPA; 37% de EF con y sin 4.4 μM de BPA y blanco de fermentaci3n al 10%, con una exposici3n de 24 horas. Los resultados son expresados \pm EE, y representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 r3plicas. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

6.6. Expresi3n de ARNm de RE β , RE α , GPR30 Y DNMT1 en c3lulas SW480 y HT29

Los receptores estrog3nicos pertenecen a la familia de receptores nucleares y son considerados como marcadores pron3stico en la pr3ctica clínica del c3ncer. Los RE α son asociados a eventos proliferativos mientras que los RE β modulan mecanismos de antiproliferaci3n celular. Los resultados acerca de la expresi3n transcripcional de RE en el presente estudio muestran que el BPA en c3lulas SW480 presenta una tendencia a disminuir la expresi3n transcripcional del RE β (0.061 *fold*), mientras que naringenina presenta una tendencia a aumentar su expresi3n (2.2 *fold*), ambos resultados no son presentan diferencias significativas con respecto al control. M3s a3n, naringenina+BPA aumenta la expresi3n del RE β (10.44 *fold*) de manera significativa. Estos resultados se muestran en la Figura 15. Por otro lado, RE α result3 inducido por EF con o sin coexposici3n con BPA (2.51 *fold*; 13.43 *fold*, respectivamente). Tanto las c3lulas tratadas con naringenina y EF con o sin BPA naringenina+BPA no presentan diferencia en cuanto a la expresi3n DNMT1 y solo las tratadas con EF con y sin BPA presentan aumento en la expresi3n de GPR30 (2.8 *fold*; 6.1 *fold*, respectivamente).

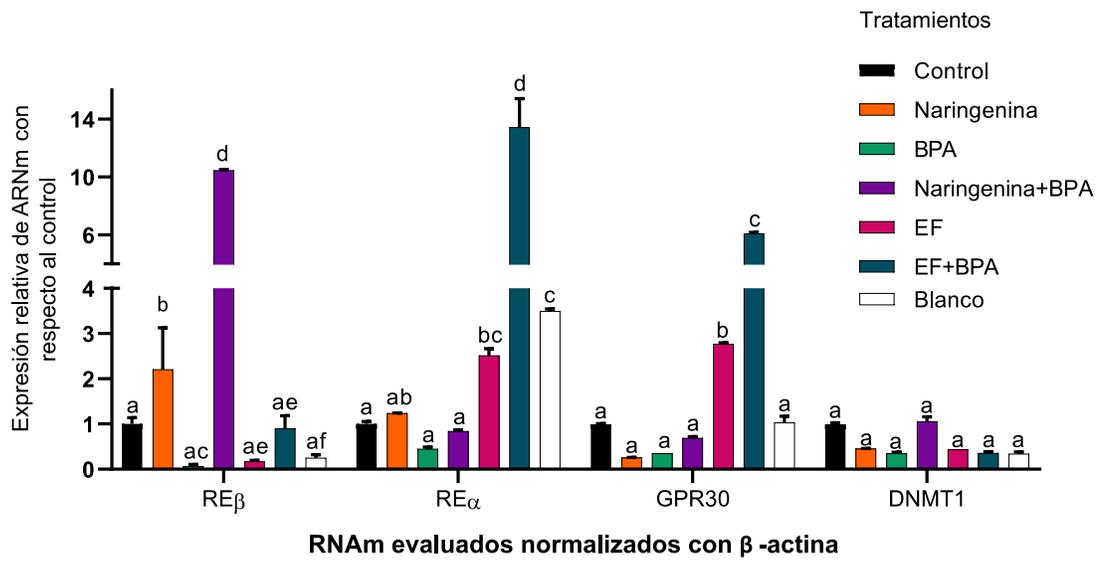


Figura 17. Expresión relativa de genes RE β , RE α , GPR30, DNMT1 con respecto a β -actina en células SW480 tratadas con naringenina (150 μ M), BPA (4.4 μ M), naringenina (150 μ M) + BPA (4.4 μ M), EF (34%) y EF(34%)+BPA(4.4 μ M). Los resultados son expresados como expresión relativa \pm EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En células HT-29 (Figura 16) se puede observar que el nivel de expresión relativa de RE β en las células tratadas con naringenina fue de 5.3 *fold* \pm 0.77 a diferencia de los tratados solo con BPA que tienen 2.53 *fold* \pm 0.20 y no presentan diferencia estadística con el control. Además, se puede apreciar un aumento en la expresión de este receptor bajo los tratamientos de EF con y sin BPA (13.67 *fold* \pm 2.0; 6.6 *fold* \pm 0.2, respectivamente). El nivel de expresión relativa de RE α en HT-29 con BPA fue 2.8 *fold* \pm 0.01 y los tratados con naringenina 0.7 *fold* \pm 0.04; bajo los tratamientos de EF con y sin BPA hubo un aumento (5.6 *fold* \pm 0.7; 30.7 *fold* \pm 0.3, respectivamente). El nivel de expresión relativa de DNMT1 en HT-29 bajo los diferentes tratamientos no tuvo diferencia estadística. Finalmente, los niveles de expresión relativa de GPR30 fueron menores bajo los tratamientos de naringenina (0.11 *fold* \pm 0.01), BPA (0.18 *fold* \pm 0.01) y naringenina+BPA (0.21 *fold* \pm 0.01) con respecto al control.

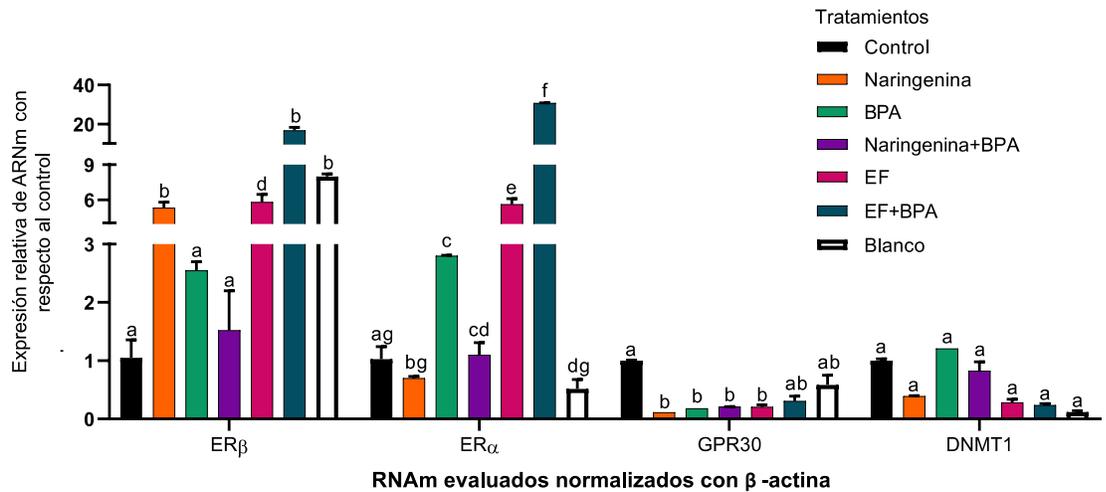


Figura 18. Expresión relativa de genes RE β , RE α , GPR30, DNMT1 con respecto a β -actina en células HT-29 tratadas con naringenina (250 μ M), BPA (4.4 μ M), naringenina(250 μ M) + BPA (4.4 μ M), EF(37%) y EF(37%) + BPA (4.4 μ M), Los resultados son expresados como expresión relativa \pm EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes. Diferente letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Estudios previos han demostrado que el riesgo de desarrollar cáncer de colon se incrementa con una alteración en las vías de señalización gobernadas por los receptores de estrógenos. Esto debido a que existe evidencia de que el RE β , cuya función se ha determinado que induce apoptosis celular, demuestra una correlación inversa con la presencia de pólipos colorrectales y estadio del tumor; mientras que el RE α , asociado a eventos proliferativos, se encuentra aumentado en este tipo de cáncer (Caiazza *et al.*, 2015; Elbanna *et al.*, 2012). Algunos disruptores estrogénicos de origen natural como los fitoestrógenos pueden unirse de manera agonista al RE β promoviendo apoptosis según lo observado en estudios epidemiológicos y modelos animales (Hedelin *et al.*, 2006). En células de cáncer de mama, la naringenina (5 μ M) se une de manera agonista al RE β disminuyendo la expresión de ARNm de TGF β 3, gen que codifica citocinas involucradas en morfogénesis y crecimiento de tejidos; en células de cáncer de colon (DLD-1) la naringenina (10 μ M) induce apoptosis por la cascada de señalización p38/MAPK modulada tras la activación agonista de RE β (Kim & Park, 2013; Totta *et al.*, 2004).

En la línea celular tanto SW480 pero principalmente HT-29, se pudo observar un aumento en la expresión del RE β relacionado con procesos de apoptosis, lo que concuerda con lo ya reportado.

Por otro lado, existen compuestos sintéticos con actividad de disruptor endócrino, como el BPA, que ha demostrado promover algunos tipos de cáncer por la capacidad agonista con RE α . Ejemplo de ello es el demostrado en células de cáncer de mama donde concentraciones de 1 μ M de BPA promueven la expresión de TGF α implicado en la proliferación de tejidos, y algunos ensayos enzimáticos han reportado efecto agonista entre el BPA (0.1 - 10 μ M) y RE α sustentando lo anterior (Hiroi *et al.*, 1999; Masuya *et al.*, 2019; Sengupta *et al.*, 2013). En el presente estudio únicamente observamos ese efecto en la línea celular HT-29, sin embargo en la línea celular SW480 pudiera tener un papel más decisivo el RE β .

La expresión de RE α implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de colon se ha relacionado con una menor sobrevida en estudios epidemiológicos (Nüssler *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2019). La pérdida de la expresión de RE β también se ha relacionado con un peor pronóstico de vida pues una de sus principales funciones es promover procesos de apoptosis celular (Caiazza *et al.*, 2015). En el presente estudio se encontró que la expresión transcripcional de RE β disminuye en la línea celular HT-29 cuando es coexpuesta naringenina con BPA, resultado que concuerda con lo reportado por Hess-Wilson *et al.* (2007) quienes evaluaron la disminución de RE β en células de cáncer de próstata LNCaP tratadas con BPA (1 nM). A su vez, la expresión de RE α es mayor en las células expuestas a BPA que la expresión de RE β , que podría estar asociado a los efectos negativos de BPA reflejado en el porcentaje de células que mueren por necrosis en nuestro estudio como lo reportado en cultivos primarios cerebelosos donde concentraciones entre 1-10 μ M de BPA aumentan la liberación de LDH dependiente de RE (Le & Belcher, 2010).

Por otro lado, las células HT-29 tratadas con EF, aumentan la expresión la expresión tanto de RE β como de RE α , algunos estudios han reportado que flavonoides la apigenina presenta gran afinidad a estos receptores en líneas

celulares como células de cáncer de mama, las cuales presentan una gran cantidad RE α ; probablemente debido a que las células HT-29 tienen un desequilibrio en la expresión de REs, promuevan también la expresión de RE α aunque en menor cantidad que RE β . Cho *et al.*, (2007) reportaron la importancia de ambos REs como inhibidores en la tumorigénesis de colon dependiente de APC en ratones; las células SW480 así como otras líneas celulares presentan mutación en APC sin embargo, difieren en las zonas alteradas lo que da como resultado que la ubiquitinación y degradación de la β -catenina se inhiban en SW480 pero no en las células DLD-1 y HT29. Algo que hay que destacar es la expresión de RE β en células SW480 tratadas con naringenina+BPA y EF+BPA, los cuales pudieran estar actuando de manera sinérgica, sin embargo, no existe diferencia en la expresión de RE β bajo el tratamiento de BPA por lo que pudiera inferirse que es en respuesta a un mayor estrés celular. En la línea celular HT-29 solo se observa dicha sinergia bajo el tratamiento de EF+BPA, y por el contrario en la coexposición de naringenina+BPA, el BPA interfiere en el efecto que tiene la naringenina sobre el receptor. Es importante señalar que la expresión de RE β es predominante en el epitelio colónico normal diferenciado, pero su expresión disminuye debido al microambiente hipóxico en colon a medida que avanza la malignidad resultado del cáncer (Konstantinopoulos *et al.*, 2003). Por lo tanto, el hallazgo encontrado en este estudio, en el que naringenina y EF inducen la expresión de RE β en HT-29 es de suma importancia, ya que se sugiere que esto permite que la célula siga activando mecanismos de defensa que le confieran ventajas para morir. También se observó que la expresión de GPR30 en células SW480 con naringenina, BPA y naringenina+BPA no presentan cambio en la expresión con respecto a las células control, solo las tratadas con EF; y en la línea celular HT-29 se observa que las células bajo los diferentes tratamientos tienen una menor expresión del receptor con respecto al control con excepción de las tratadas con EF. GPR30 es un receptor acoplado a proteína G sensible a estrógeno, que puede desencadenar diferentes cascadas de señalización, tanto proliferativas como apoptóticas, de migración celular entre otras. Estudios como el presentado por Dong *et al.*, (2011) muestran

que células de cáncer de mama el BPA (10 μ M) a través de GPR30 activa la cascada de señalización de Erk1/2 y la regulación transcripcional de c-fos a través de una vía mediada por AP1. En el presente estudio las dosis aplicadas fueron de 4.4 μ M de BPA, menos de la mitad de las del estudio anterior, por lo que posiblemente no sea concentración suficiente para activar esta vía, siendo importante evaluar la cascada sobre la que está actuando cada tratamiento que interfiere en la expresión de GPR30.

En cuanto a la expresión de DNMT1 en células SW480 y HT-29 bajo los diferentes tratamientos no se encontró diferencia estadística, aunque podemos observar una tendencia a disminuir la expresión del mismo bajo los tratamientos de naringenina y EF. Chen *et al.*, (2019) señalaron que en células de cáncer de colon la disminución en la expresión de DNMT1 aumenta la expresión de RASSF1A, el cual promueve apoptosis e inhibe migración celular, por lo anterior sería importante evaluar los niveles de proteína para determinar si pudiera verse un mecanismo similar en el presente proyecto.

6.7. Expresión de miR-200c y miR-141 en células HT-29

El papel de la expresión de algunos miRNA en cáncer como los miR-17-5p se tiene muy definido, se sabe que son promotores del proceso carcinogénico. Sin embargo, la función de otros miRNAs como el cluster miR-200 que incluye miR-200a/b/c y miR-141, no ha sido bien establecida. Algunos autores han reportado que el RE α promueve la expresión de miR-200c y que la expresión de miR-200c se encuentra elevada tanto en tejido como en suero de pacientes con cáncer de colon y se relaciona con metástasis y un mal pronóstico de vida (Chen *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2015; Chou *et al.*, 2017). En los resultados del presente proyecto se observó que en la línea celular HT-29 el tratamiento con BPA promueve la expresión de miR-200c (1.62 *fold*) por lo que, en esta línea celular, la expresión de RE α pudiera promover la expresión de miR-200c y desencadenar a nivel molecular mecanismos involucrados con metástasis. En cuanto a los resultados bajo el tratamiento de EF, se observó una disminución en la expresión tanto de miR-141 (0.01 *fold*) como de

miR-200c (0.15 *fold*) con respecto al control (Figura 17), ambos miRNAs correlacionados con disminuir la expresión de genes supresores de tumores como PTEN, por lo que su baja expresión tiene efecto negativo ante la evolución del proceso carcinogénico.

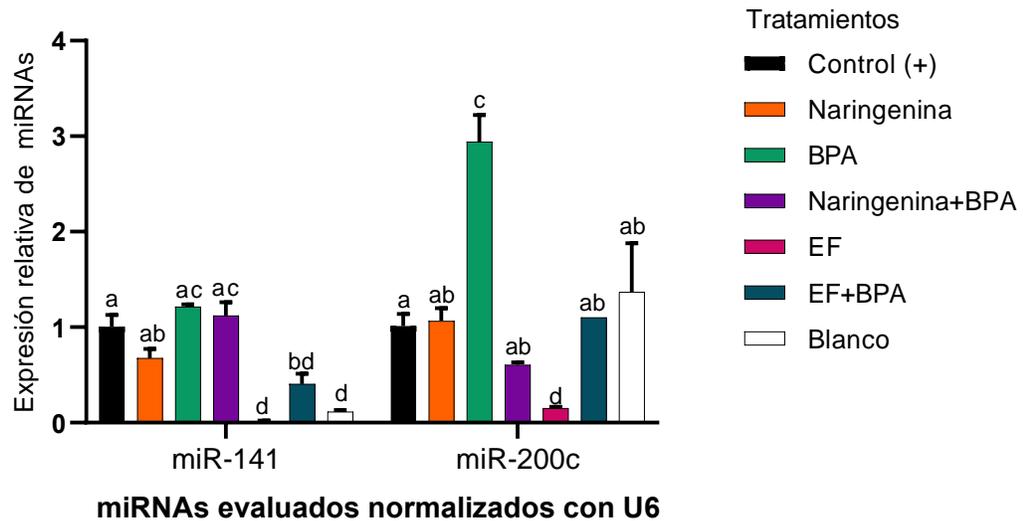


Figura 19. Expresión relativa de miR-200c y miR141 con respecto a U6 en células HT29 tratadas con naringenina (250 μ M), BPA (4.4 μ M) y Naringenina + BPA (250 μ M) + BPA (4.4 μ M). Los resultados son expresados como expresión relativa \pm EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes.* Diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Dunnet ($p < 0.05$) con respecto al control.

6.8. Expresión de genes relacionados con la cascada de señalización p53 en células HT-29 tratadas con BPA y naringenina

Se midió la expresión de 84 genes relacionados con la cascada de señalización p53 en células HT-29 tratadas con naringenina (250 μ M) (Tabla 6) y BPA (4.4 μ M) (Tabla7), encontrando una regulación positiva y negativa >2 *fold*s en 14 genes en células tratadas con naringenina y 11 genes en las células tratadas con BPA; la integración de los mismos se puede resumir en la Figura 20.

Tabla 6. Regulación de la expresión de genes de células HT-29 tratadas con naringenina, BPA, naringenina+BPA, EF y EF+BPA con respecto a las células control empleando β -Actina y GAPDH como housekeeping.

Símbolo	Descripción	Naringenina	BPA	Naringenina+BPA	EF	EF+BPA
APAF1	Factor <i>activador</i> de las proteasas apoptogénicas	1.11	1.52	21.10	2.62	27.86
ATM	Gen de la ataxia telangiectasia mutado	1.00	1.02	3.13	1.12	8.66
ATR	<i>Ataxia</i> telangiectasia y la proteína <i>relacionada con Rad3</i>	-1.20	-2.16	3.28	-1.07	5.63
ADGRB1	Inhibidor 1 de la angiogénesis específico del cerebro	-1.11	-1.04	16.54	2.39	16.04
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2	-1.27	-1.41	1.80	-1.45	5.06
BBC3	Componente 3 de unión a BCL2	1.46	-4.96	13.67	1.76	6.87
BCL2	Linfoma de células B2 (antiapoptótica)	-2.17	-1.21	40.54	1.70	146.89
BCL2A1	Proteína A1 relacionada a BCL-2	1.01	-1.21	19.29	3.76	43.36
BID	Agonista de muerte con dominio de homología 3 (BH3)	1.52	-1.16	1.79	1.11	1.17
BIRC5	Survivina, inhibidor 4 de apoptosis	1.36	1.41	10.53	3.12	21.64
BRCA1	Gen cáncer de mama 1	1.11	1.15	4.04	1.27	4.29
BRCA2	Ge cáncer de mama 2	3.28	-1.34	62.42	1.92	19.02
BTG2	Miembro 2 de la familia BTG	-1.24	-1.56	15.30	-2.66	2.88
CASP2	Caspasa 2	2.14	8.11	2.99	-1.58	4.30
CASP9	Caspasa 9	3.99	-1.06	2.36	2.03	12.27
CCNB1	Ciclina B1	1.32	1.30	1.47	1.46	2.12
CCNE1	Ciclina E1	1.11	1.13	3.96	1.88	8.23
CCNG1	Ciclina G1	1.02	1.02	-3.41	-1.49	1.22
CCNH	Ciclina H	1.31	-1.04	1.76	1.69	9.19
CDC25A	División celular	1.27	-1.11	18.49	2.02	12.59
CDC25C	División celular	1.45	1.14	4.31	1.73	7.16
CDK1	Ciclina dependiente de cinasa 1	1.17	1.30	-2.86	1.34	3.73
CDK4	Ciclina dependiente de cinasa 4	1.13	-1.39	1.84	-1.14	1.23
CDKN1A	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa 1A	1.36	-1.13	3.37	5.85	48.32
CDKN2A	Inhibidor de ciclina dependiente de cinasa 2A	1.38	1.11	2.18	1.44	1.62
CHEK1	Checkpoint	1.30	1.27	2.31	1.24	4.75

CHEK2	Checkpoint	1.54	1.18	2.74	1.74	7.30
CRADD	Adaptador que contiene el dominio CASP2 y RIPK1 con dominio de muerte	2.96	-1.48	56.18	1.38	10.58
DNMT1	ADN metiltransferasa-1	-1.05	1.01	2.20	1.21	2.07
E2F1	Factor de transcripción 1	1.29	1.03	3.59	1.39	6.35
E2F3	Factor de transcripción 3	1.18	-1.01	6.17	-1.44	5.39
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal	1.11	-1.05	4.07	1.04	8.01
EGR1	Respuesta de <i>crecimiento</i> temprano 1	1.44	-1.06	22.88	-1.00	15.41
EI24	ARNm <i>2.4 inducido por etoposido</i>	1.17	-1.12	-1.44	1.06	1.62
ESR1	Receptor de estrógeno alpha	1.11	3.63	63.17	5.11	33.01
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas	1.41	-1.07	1.19	-1.05	2.05
FAS	Receptor TNF	1.01	1.43	12.09	2.13	15.30
FASLG	Receptor TNF, FAS ligando	1.86	-1.31	35.45	4.63	52.37
FOXO3	Factor de transcripción FOX	1.29	1.01	1.69	1.15	4.45
GADD45A	Arresto de crecimiento e inducible por daños en el ADN	-1.16	-1.13	4.97	2.92	4.79
GML	Proapoptótica	1.95	1.05	37.20	4.98	60.37
HDAC1	Histona deacetilasa 1	1.49	-1.01	-1.57	-1.05	1.64
HK2	Hexocinasa	1.24	1.62	3.55	2.79	9.41
IGF1R	Receptor de crecimiento	1.27	1.17	3.50	-1.05	5.58
IL6	Interleucina 6	-1.40	-1.01	13.63	3.45	30.56
JUN	Proto-oncogen	-2.06	-1.72	1.57	-3.60	1.59
KAT2B	Acetiltransferasa	1.18	1.04	22.40	2.51	16.65
KRAS	Oncogen	-1.10	-1.01	-1.39	-1.42	2.19
MCL1	Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida Mcl-1	1.12	-1.17	2.52	1.47	4.03
MDM2	Apoptosis	1.14	1.46	21.69	2.85	36.22
MDM4	Apoptosis	-1.39	1.66	3.80	-1.28	7.25
MLH1	Homólogo 1 de MutL, cáncer de colon, tipo 2 sin poliposis	4.48	-7.94	2.15	1.25	5.32
MSH2	Homólogo 2 de MutL, cáncer de colon, tipo 1 sin poliposis	1.39	1.07	-1.24	1.30	4.25
MYC	Oncogen	-1.02	-1.21	1.25	-1.10	1.79
MYOD1	Diferenciador miogénico tipo 1	3.99	-1.10	75.89	5.20	26.82
NF1	Neurofibromin 1	1.16	1.09	4.35	1.56	11.20
NFKB1	Factor nuclear Kapa	-1.22	-1.08	6.63	-1.12	5.06
PCNA	Proliferación celular	1.14	-1.21	2.15	1.01	2.18

PIDD1	inductor de muerte celular (p53)	1.09	1.04	12.74	1.87	10.41
PPM1D	Fosfatasa	-1.35	1.14	10.99	1.31	6.36
PRC1	Proteína reguladora de citocinesis	1.12	-1.49	1.41	-1.17	1.59
PRKCA	Proteína cinasa C	1.75	-1.10	4.29	1.71	8.28
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa	2.70	-3.46	1.20	1.72	6.98
PTTG1	Tumor transformante de pituitaria	1.68	-1.38	1.74	2.72	6.99
RB1	Retinoblastoma 1	-1.01	-3.32	1.04	-1.08	3.02
RELA	Oncogen	1.49	-1.19	1.18	-1.19	1.87
RPRM	Reprimo, TArresto del ciclo celular	3.15	-1.39	59.96	5.71	42.08
SESN2	Sestrina 2	-1.70	-1.01	2.86	1.69	4.24
SIAH1	Ubiquitina ligasa	1.61	-1.42	1.21	1.39	4.26
SIRT1	Sirtuina 1	-1.00	-3.18	2.05	-1.09	2.70
STAT1	Transductor de señal y el activador de la transcripción 1	-1.08	-4.06	1.19	-1.21	-9.20
TADA3	Adaptador Transcripcional	1.39	-2.66	1.67	-1.17	-9.68
TNF	Factor de necrosis tumoral	1.71	-1.62	32.52	3.89	47.68
TNFRSF10B	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10	1.08	1.23	3.59	1.75	3.66
TNFRSF10D	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10d, señuelo con dominio de muerte truncado	4.98	-1.13	14.79	1.74	9.71
TP53	Proteína p53	1.15	1.41	-1.00	-1.80	1.19
TP53AIP1	Proteína p53 reguladora de apoptosis	3.99	-1.10	75.89	3.62	27.66
TP53BP2	Proteína p53 reguladora de apoptosis	1.35	-4.06	1.46	1.58	6.08
TP63	Proteína p63	2.11	-1.24	39.99	6.29	66.82
TP73	Proteína p73	3.99	1.12	75.89	2.65	101.66
TRAF2	TNF receptor-asociado a factor 2	1.21	-1.20	2.49	1.36	4.12
TSC1	Hamartina	-1.19	1.18	5.12	1.42	-1.04
WT1	Gen del tumor de Wilms	1.39	1.02	75.89	3.21	14.29
XRCC5	Reparador de rayo X	1.21	-1.31	-1.84	-1.73	-30.13

En cuanto a la cascada de señalización de p53, se pueden destacar la intervención de algunos genes importantes que intervienen en el proceso de apoptosis. Tal es el caso de CASPASA 9, el cual en los tratamientos de naringenina (3.99 *fold*), EF (2.03 *fold*), naringenina + BPA (2.36 *fold*) y EF + BPA (12.27 *fold*) existe un aumento de su expresión, lo que evidencia apoptosis mitocondrial bajo estos tratamientos. Esto puede estar relacionado con el aumento en la actividad de SOD por parte de EF y la baja cantidad de GSH por naringenina. Ah Kang *et al.*, (2014) demostraron que fisetina, una flavona con actividad antiangiogénica y antioxidante, en células de cáncer de pulmón NCI-H460 a una concentración de 75 μ M a las 24 h de tratamiento, aumenta la proteína caspasa-9 y disminuye BCL-2. En el presente estudio también se encontró una disminución de BCL-2, proteína antiapoptótica bajo el tratamiento de naringenina (-2.17 *fold*), y un aumento de la expresión del mismo en los tratamientos de coexposición, naringenina+BPA (40.54 *fold*) y EF+BPA (146.89 *fold*), lo que sugiere la intervención de BPA para evitar apoptosis.

Lee *et al.*, (2014) observaron en líneas celulares de cáncer de colon, HT-29 que el flavonoide kaempferol en concentraciones de 40 y 60 μ M, expuesto durante 48 h, promovía apoptosis mediada por las dos vías tanto extrínseca sustentado por el aumento en la expresión de FAS-L que activa a caspasa-8 que finalmente conduce a la escisión de Bid y la activación de caspasa-3. También el kaempferol activa la apoptosis por la vía intrínseca, demostrada por el aumento de citocromo C, que activa caspasa-9 y caspasa-3. La activación de ambas vías también fue encontrada en el presente estudio principalmente bajo los tratamientos de coexposición, ya que se encontró un aumento de FASLG bajo los tratamientos de naringenina+BPA (35.45 *fold*), EF (4.63 *fold*) y EF+BPA (52.37 *fold*), el cual también se encuentra relacionado con promover apoptosis por la vía extrínseca. El aumento en la expresión de este gen en esta línea celular es muy importante ya que no se encuentra expresado de manera constitutiva, se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) induce la expresión en la superficie celular de FasL funcional en células HT29 por lo que pueden ser capaces de inducir apoptosis por

esta vía. Lo anterior se vincula con lo encontrado en el presente estudio, donde existe un aumento de TNF bajo los tratamientos ya descritos (32.52, 3.89 y 47.68 *fold* respectivamente) (Naujokat *et al.*, 1999). Además de lo anterior también hay evidencia de apoptosis activada por la vía extrínseca por el aumento de FAS en las células tratadas con naringenina+BPA (12.09 *fold*), EF+BPA (15.30 *fold*) y de FADD (1.19 *fold*) y (2.05 *fold*) respectivamente. Recordemos que para que se desencadene apoptosis por esta vía es importante encontrar a FAS y FADD activos. Otros estudios han encontrado que polifenoles como la crocetina (100 μ M) en células HT29, promueve la asociación de FAS/FADD de manera dependiente de p73, esta asociación activa a BID que posteriormente activa apoptosis vía mitocondrial (Ray *et al.*, 2016).

Otro gen involucrado a apoptosis es CASP-2, el cual codifica una proteína que dependiendo de la señalización puede estar involucrada en mecanismos apoptóticos o no apoptóticos, así como inflamatorios. Un gen que puede ayudar a discernir la vía de señalización involucrada es CRADD, ya que codifica la proteína que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa y el dominio de muerte (DD) (también conocida como RAIDD) necesaria junto con PIDD1 para la activación de la caspasa-2 como proteína pro-apoptótica (Di Donato *et al.*, 2020). En el presente estudio, naringenina aumenta la expresión de CASP-2 (2.14 *fold*) y de CRADD (2.96 *fold*), además también se encuentra sobre-expresado TNFRSF10D (4.98 *fold*), gen que codifica el receptor TRAILR1 vinculado con promover procesos de proliferación como de apoptosis y pudiera estar regulando la vía extrínseca de la apoptosis. Este mismo mecanismo es compartido con los tratamientos en coexposición, los cuales tienen un aumento en la expresión de los mismos genes (Bouchier-Hayes 2010; Di Donato *et al.*, 2016; Sladky y Villunger 2020; Vigneswara y Ahmed 2020).

Dentro de la cascada de señalización que desencadenan en apoptosis mitocondrial, río arriba podemos encontrar a p53 el cual sufre un proceso de activación post-traduccional por estrés celular p53 regulado MDM2, el cual una vez unido, p53 aumenta transcripcionalmente los niveles de MDM2, lo que da como resultado la inhibición de la actividad de p53. Sin embargo las línea celular HT-29

alberga p53 mutado por lo que como se ha visto en estudios reportados por Shangary *et al.*, (2008), que los tratamientos como el MI-43 que es un antagonista de MDM2 en estas líneas celulares activan otras cascadas de señalización para obtener una disminución en la viabilidad celular. Zeng *et al.*, (1999) demostraron que en células con p53 mutado, MDM2 puede modular la activación de p73 pero no su expresión. En el presente estudio, los tratamientos de coexposición (naringenina+BPA, 21.69 *fold*; EF+BPA, 36.22 *fold*) y EF (2.85 *fold*), aumentaron la expresión de MDM2. Además, se observó un aumento en la expresión de TP73 bajo los tratamientos de naringenina (3.99 *fold*), naringenina+BPA (75.89 *fold*), EF (2.65 *fold*), y EF+BPA (101.66 *fold*). Dabiri *et al.*, (2019) estudiaron el papel de TP73 en células HT-29, encontrando por histoquímica la presencia de p73 tanto en núcleo como en citosol en células tratadas con bortezomil, un quimioterapéutico empleado por su acción de inhibidor de proteosoma y por lo tanto promotor de detección de ciclo celular y de apoptosis; por lo que los resultados evidencian el papel de TP73 en apoptosis celular al existir una mutación en TP53. Algunos autores como Herreros-Villanueva *et al.*, (2010), demostraron que la expresión de TP73 es dependiente de B-Raf, ya que las células HT-29 presentan mutación heterocigota de B-Raf, los hallazgos encontrados en nuestro ensayo cobran mayor peso por el efecto encontrado en la expresión de TP73 bajo el tratamiento de naringenina.

Una vez que se encuentra activo TP73, se puede unir a PTEN, el cual se encuentra sobre expresado bajo el tratamiento de naringenina (2.70 *fold*), EF (1.72 *fold*) y con una regulación negativa bajo el tratamiento de BPA (-3.46 *fold*); esta unión, activa a BBC3 (PUMA), el cual en el presente ensayo se encuentra regulado negativamente por BPA (-4.96 *fold*). El incremento de mRNA BBC3 o PUMA es dado tras recibir estímulos apoptóticos. La proteína que codifica se localiza en mitocondria y es dependiente de p53, en células HT-29 que presentan mutación de p53 se ha comprobado su activación por Sp1 y p73 (Lehman *et al.*, 2011; Ming *et al.*, 2008).

PTEN además de estar encargada de mediar apoptosis también se encuentra modulando la detención del ciclo celular e inhibición de la invasividad (Lehman *et*

al.,2011). Tili *et al.*, (2010), encontraron que las células SW480 bajo el tratamiento de 50 μ M de resveratrol aumenta la proteína PTEN, lo que desencadena procesos de apoptosis como los encontrados bajo el tratamiento de naringenina y EF. Por otro lado; Li *et al.*, (2014), reportaron una disminución en la expresión proteica de PTEN en células de cáncer de mama tratadas con 10 μ M de BPA relacionada con un aumento en la proliferación celular y un mayor porcentaje de células en fase S del ciclo celular. Además señalaron que 1 μ M de curcumina contrarrestaba dicho efecto. En el presente proyecto, de igual manera se encontró una disminución de PTEN bajo el tratamiento de BPA, el cual cuando era coexpuesto con naringenina (1.20 *fold*), o EF (6.98 *fold*), contrarrestar de igual manera dicho efecto.

Además de lo anterior la expresión de miR-200c bajo el tratamiento de BPA pudiera estar involucrado en la baja expresión de PTEN modulado por el aumento en la expresión de ER α (ESR1). Chen *et al.*, (2018), demostraron a través de un ensayo con luciferasa la unión de homólogos de miR-200 a la región 3'UTR de PTEN en células de cáncer de endometrio. En ese estudio también se demostró la importancia de 17 β -estradiol, en la regulación de la expresión de miR-200c, esto una vez que se une a ER α , mecanismo que pudiera compartir las células HT-29 del presente estudio.

Por otro lado, miR-141 también tiene como gen blanco PTEN, en estudios realizados en células de pacientes con carcinoma nasofaríngeo pre y post tratamiento con cisplatino, se observó que la expresión de miR-141 disminuía la expresión de PTEN, la cual se encuentra relacionada con una quimioresistencia (Sasikirana *et al.*,2019). En el presente estudio los tratamientos con naringenina, EF y EF+BPA son los que presentan mayor cantidad de PTEN, siendo EF y EF+BPA el que tiene menor expresión de miR-141, lo que aporta a la expresión de PTEN bajo estos tratamientos.

MLH-1 uno de los principales genes que se encuentran mutados o epigenéticamente silenciados en cáncer de colon, se encontró sobreexpresado bajo el tratamiento de naringenina (4.48 *fold*) y con una regulación negativa bajo el tratamiento de BPA (-7.94 *fold*). Lu *et al.*, (2017), observaron en células HT-29 y

SW480 que la expresión de MLH-1 aumentaba una vez que las células eran tratadas con 17β -estradiol, además comprobaron que el mecanismo río arriba por lo cual la expresión de este gen se veía beneficiada era medida por el ER β . El gen MLH-1 es uno de los genes pertenecientes a los MMR, los cuales codifican proteínas que reconocen y reparan errores en secuencias de microsatélites del ADN recién sintetizado; MLH-1 pertenece a esta familia de genes y forma un dímero con PMS2, el cual tiene actividad de endonucleasa e interactúa con Polimerasa δ , corrigiendo errores que escaparon de ADN polimerasa, por lo que la reducción en la expresión de MLH-1 por metilación o mutación es frecuente en cáncer de colon, los hallazgos encontrados en el presente estudio sugieren la regulación positiva de este gen mediada por ER β bajo el tratamiento de naringenina (Jin *et al.*, 2010).

Otro gen relacionado con reconocimiento del daño del DNA es ATR (ATM-Relacionadas con Rad3), su activación detiene el ciclo celular en las etapas G1, S o G2, proceso que puede ser mediado por la acción de quinasas de punto de control CHK1 y CHK2. Por lo que la disminución en la expresión tendría efectos no benéficos para la detención del ciclo celular en células tratadas con BPA (-2.16 *fold*) bajo el presente estudio; dicha regulación negativa se contrarresta una vez que las células con coexpuestas con naringenina (3.28 *fold*) y EF (5.63 *fold*), lo que sugiere una detención en el ciclo en tratamientos con coexposición (Groh y Esselen 2017).

Por su lado, Reprimo (RPRM) es una proteína que participa en la detención del ciclo celular en la fase G2/M dependiente de p53 y p73, la pérdida de su expresión se ha relacionado con etapas más invasivas de cáncer gástrico. En el presente estudio todos los tratamientos con excepción del BPA tiene un aumento en la expresión de este gen (Saavedra *et al.*, 2015). Además; se ha observado la hipermetilación de RPRM en diferentes tipos de cáncer y en células de cáncer de mama, relacionado con ER α (ESR1) el cual en el presente estudio se encuentra sobre expresado en todos los tratamientos, teniendo una mayor expresión en células tratadas con BPA (3.63 *fold*), naringenina+BPA (63.17 *fold*), EF (5.11 *fold*) y EF+BPA (33.01 *fold*) (Buechegger *et al.*, 2017; Hamilton *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2006). La expresión de RE α , implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de

colon, se ha relacionado con una menor sobrevida en estudios epidemiológicos (Nüssler *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2019). Huang *et al.*, (2017) han evaluado diferentes concentraciones de BPA (0.1-1000 nM) en células epiteliales de próstata, reportando una viabilidad del 98% pero con un aumento en la expresión de receptores estrogénicos tanto α como β ; en el presente estudio sólo se encontró un aumento en la expresión de ER α bajo el tratamiento de BPA. Es importante señalar que la expresión de RE β es predominante en el epitelio colónico normal diferenciado, pero su expresión disminuye debido al microambiente hipóxico en colon a medida que avanza la malignidad resultado del cáncer (Konstantinopoulos *et al.*, 2003). Por lo tanto, el hallazgo encontrado en este estudio, en el que los tratamientos con naringenina y EF inducen la expresión de RE β es de suma importancia, aunque exista un aumento en la expresión de ER α .

Otro gen relacionado con ER es SIRT1, el cual es una histona desacetilasa dependiente de nicotinamida adenosina dinucleótido (NAD / NADH) (HDAC) que funciona desacetilando histonas (H1, H3 y H4) y se encuentra vinculada a varios mecanismos. Si es activada por ciclina B/ Cdk1 sufre cambios postraduccionales que aumentan su actividad, por lo que es probable que bajo la influencia de algunos compuestos como el BPA (-3.18 *fold*) también tenga algún tipo de cambio. En cáncer de mama se ha relacionado su papel como coactivador de ER α ; sin embargo algunos otros autores han evidenciado su actividad como represora frente a este receptor. En células de cáncer de ovario la pérdida de la expresión de SIRT1 se encuentra relacionado con una mayor expresión de ER β . Por lo anterior posiblemente dependiendo de la estirpe celular y de la condiciones de la misma, puede que SIRT1 funcione como coactivador o represor de los distintos ER, lo cual sustentaría la baja expresión de SIRT1 con la baja expresión de ER β y la alta expresión de ER α bajo el tratamiento del BPA. Sin embargo, este mecanismo no aplica para el resto de los tratamientos, por lo que el papel de SIRT1 en el presente estudio no queda totalmente esclarecido (Lin *et al.*, 2010; Pinton *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2010).

Además de los procesos de apoptosis e inhibición de ciclo celular, la inhibición de la metástasis es un mecanismo importante mediado por los flavonoides. Un gen involucrado con ello es MyoD, el cual es un factor de diferenciación muscular que en células HT-29 se ha demostrado su efecto inhibitorio de proliferación celular, además de disminuir la expresión de mRNA de E-cadherina y vimentina ambos promotores de transición epitelio-mesenquimal (Sun *et al.*, 2019). En el presente estudio encontramos que las células tratadas con naringenina (3.99 *fold*), naringenina+ BPA (75.89 *fold*), EF (5.20 *fold*) y EF+BPA (26.82 *fold*), aumentan la expresión del mismo y por el contrario; el tratamiento de BPA (-1.10 *fold*) disminuye la expresión, por lo que se muestra la promoción de metástasis mediada por BPA y la inhibición de la misma mediada por naringenina y EF.

Las vías moleculares señaladas anteriormente se resumen en la Figura 20, donde se explica la activación de apoptosis intrínseca y extrínseca mediada por distintos mecanismo bajo los diferentes tratamientos, así como la activación de ciclo celular bajo la coexposición de BPA con naringeinna y EF.

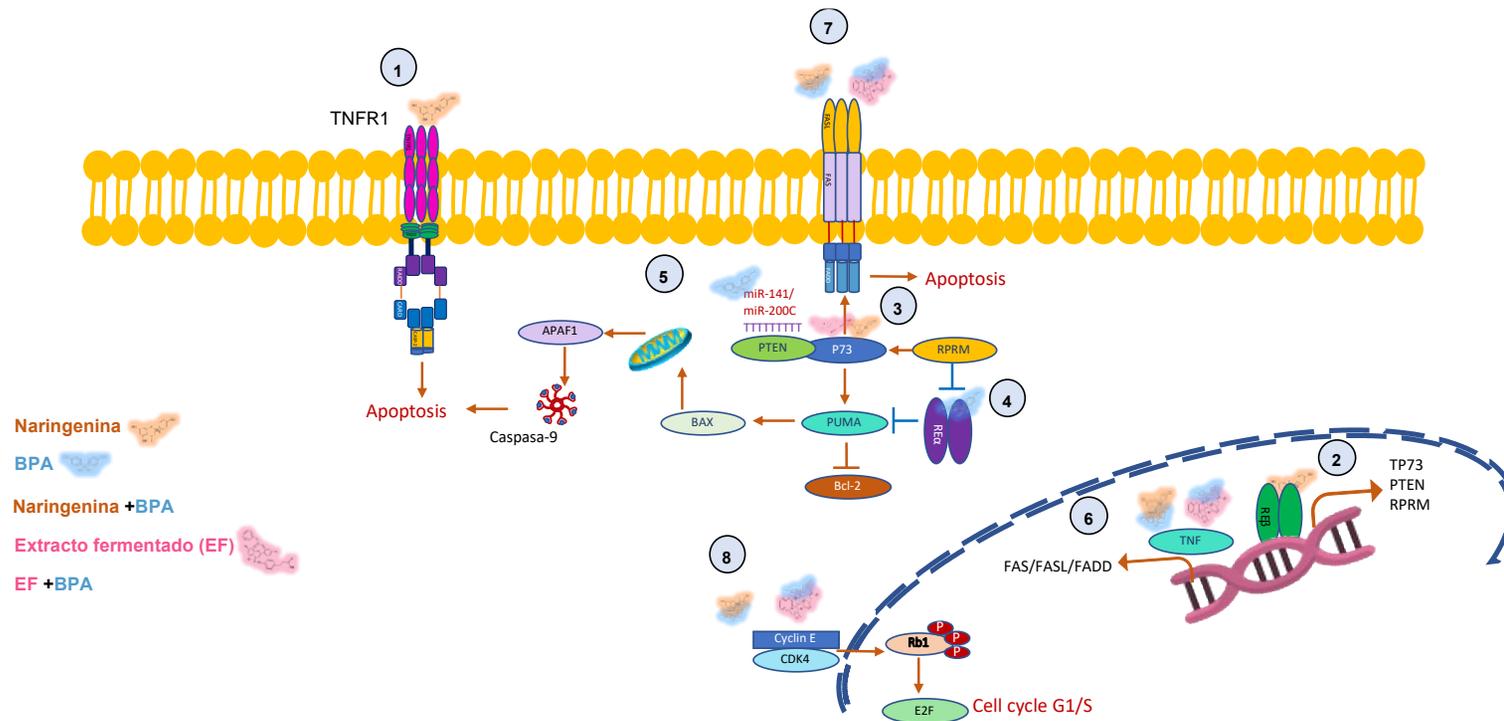


Figura 20. Integración de cascada de señalización p53 bajo los tratamientos naringenina, BPA, naringenina+BPA, EF y EF+BPA en células HT-29. 1) Apoptosis mediada por la vía extrínseca (receptor TNFR1) bajo el tratamiento de naringenina. 2) Expresión de genes mediada por el REβ bajo el tratamiento de naringenina. 3) Inducción de la expresión de PTEN y P73 (genes relacionados con apoptosis) bajo el tratamiento de naringenina y EF. 4) Inducción de la expresión de REα bajo el tratamiento de BPA. 5) Inhibición de PTEN por miR-141 y miR-200c bajo el tratamiento de BPA. 6) Aumento en la expresión de TNF, que promueve la expresión de FAS/FASL/FADD bajo los tratamientos de coexposición (EF+BPA y naringenina+BPA). 7) Apoptosis extrínseca mediada por FASL bajo los tratamientos de coexposición (EF+BPA y naringenina+BPA). 8) Aumento de ciclo celular bajo los tratamientos de coexposición (EF+BPA y naringenina+BPA).

VII. CONCLUSIONES

Durante el proceso de fermentación se generan diferentes subproductos a partir de la naringenina, en el presente proyecto solo se identificaron dos, apignina y 3HPP. Los subproductos generados en el EF no difieren con naringenina en la capacidad antioxidante evaluada por la metodología de ORAC, la cual asemeja las condiciones de un sistema fisiológico. Sin embargo, si tienen efecto diferente en cuanto actividad antioxidante ya que se observó un aumento en la actividad de SOD en las células HT-29 tratadas con EF. Esto podría estar implicado con un aumento de H₂O₂ que genera apoptosis celular, y lo anterior se puede apreciar con la cantidad de ROS encontrada bajo el mismo experimento. En cuanto a los resultados obtenidos de GSH, se observa una disminución del mismo bajo el tratamiento de naringenina en células HT-29, lo cual expone a la célula cancerígena a una mayor sensibilidad al tratamiento y una menor quimioresistencia.

Los resultados correspondientes a viabilidad celular sugieren que las células SW480 requieren una menor concentración de naringenina (150 µM) o de EF (34%) para llegar a un efecto citotóxico en comparación a la requerida para las células HT-29 (250 µM de naringenina 37% de EF), hecho que podría explicarse ya que SW480 pertenecen a un estadio intermedio del cáncer de colon en comparación con las células HT-29 que corresponden a un estadio más avanzado y agresivo. Además, no se observó un efecto biológicamente importante en la viabilidad de células 3T3-L1 células no cancerígenas, bajo los tratamientos empleados. Aunado a lo anterior, no se ha observado un efecto importante del BPA sobre la viabilidad celular con las técnicas empleadas hasta el momento. En cuanto al mecanismo de muerte celular, los ensayos de citometría muestran que la naringenina, con o sin coexposición al BPA en ambas líneas celulares, y el EF con y sin BPA en HT-29 inducen la muerte celular por apoptosis, así como también genera un bajo porcentaje de necrosis. Células SW480 tratadas con el EF también presentan un

porcentaje mínimo de muerte por necrosis por lo que el mecanismo de muerte al igual que en el de naringenina podría ser apoptosis.

En cuanto a lo observado en la expresión de los REs, se puede observar que la línea celular SW480 presenta mayor expresión del RE β en comparación a HT-29 razón por la cual el efecto de la naringenina y del BPA pueden diferir de una línea celular a otro. En la línea celular HT-29 hay un claro aumento de la expresión de RE β bajo el tratamiento de naringenina y EF, evidenciando la importancia del mismo en procesos apoptóticos. Esto concuerda con la sobreexpresión observada en el arreglo de qPCR donde integrando la cascada de señalización, RE β promueve la expresión de PTEN, involucrado en la inhibición de la proliferación, que a su vez en conjunto podría contribuir con PT73 para actuar sobre PUMA, el cual inhibe BCL-2 y promueve la liberación de citocromo c para inducir apoptosis mitocondrial. Además, EF disminuye la expresión de miR-141 y BPA aumenta la expresión de miR-200c mismos que puede inhibir PTEN. También se encontró evidencia clara de que naringenina no solo promueve apoptosis por la vía mitocondrial, sino que también de manera extrínseca por activación de TNFR1, teniendo río abajo caspasa-2 dependiente de CRADD. Se encontró que la coexposición de BPA tanto con naringenina como con EF aumentan la expresión de TNF, misma que promueve la expresión de FASL, permitiendo que se promueva apoptosis por esta vía; sin embargo, en estos mismos tratamientos también hay un aumento de BCL que por el contrario cuando no hay coexposición con BPA este gen antiapoptótico se encuentra disminuido.

Por su parte, el BPA aumenta la expresión de RE α en células HT-29 el cual se ha relacionado con reprimir a PTEN, aunado a lo anterior se encontró que disminuye la expresión de algunos genes involucrados con apoptosis como PUMA y de algunos otros más relacionados con reconocimiento y reparación del ADN como MLH-1 y ATR. En conclusión, los mecanismos por los cuales tanto naringenina como el EF promueven apoptosis difieren en las células HT-29 y SW480. La línea celular HT-29 tiene una clara implicación de los REs relacionados con el desarrollo carcinogénico, a diferencia de lo encontrado en la línea celular

SW480 donde únicamente se puede observar una tendencia al aumento de RE β bajo el tratamiento de naringenina. También se concluye que el BPA confiere a la célula a nivel molecular mecanismos que le permiten la sobrevida y la malignidad, una vez que es coexpuesto con los tratamientos de naringenina y EF, la célula responde al estrés generado desencadenando mecanismo alternos para promover apoptosis como es la expresión no constitutiva de FASLG.

VIII. REFERENCIAS

- Acconcia F., Pallottini V., Marino M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose Response*.7;13(4):1559325815610582.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2011). *Introducción a la Biología Celular*. 3a. Ed. Editorial Médica Panamericana. p 718. México.
- Alvarado-Sansininea, J.J., Sánchez-Sánchez, L., López-Muñoz, H., Escobar, M.L., Flores-Guzmán, F., Tavera-Hernández, R., Jiménez-Estrada, M. (2018). Quercetagenin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10).
- Amawi, H., Ashby, C.R Jr., Tiwari, A.K. (2017). Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting?, *Chinese journal of cancer*, 36(1), 50.
- Arai, N., Ström, A., Rafter, J.J., Gustafsson, J.A. (2000). Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(2), 425-431.
- Bouchier-Hayes, L. (2010). The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6a), 1212-1224.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424.
- Bulzomi, P., Bolli, A., Galluzzo, P., Acconcia, F., Ascenzi, P., Marino, M. (2012). The naringenin-induced proapoptotic effect in breast cancer cell lines holds out against a high bisphenol a background. *IUBMB Life*. 64(8):690-6.
- Burbao-Luna, D.F., Manrique, M.A., Chávez-García, M.A., Pérez-Corona, T., Hernández-Velázquez, N.N., Escandón-Espinoza, Y.M., Gómez-Urrutia, J.M., Rubalcaba-Macías, E.J., Martínez-Ramírez, G., Cisneros, A.A., García-Romero, A., Martínez-Galindo, M.G., Cerba-Cardona, J. (2016). Epidemiología del cáncer colorrectal en menores de 50 años en el Hospital Juárez de México. *Endoscopía*, 28;4, 160-165.
- Caiazza, F., Ryan, E.J, Doherty. G., Winter, D.C., Sheahan, K. (2015). Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*, 2;5:19.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59-65.
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77, 156-161.

- Cantowine, D., Meeker, J.D., Hu, H., Sánchez, B.N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-García, A., Fortenberry, G.Z., Calafat, A.M., Telles-Rojo, M.M. 2010. Bisphenol an exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Health*. 18; 9:62.
- Chen, Jianmei, Wang, W., Zhang, Y., Hu, T., & Chen, Y. (2014). The roles of miR-200c in colon cancer and associated molecular mechanisms. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35.
- Chen, X., Xia, J., Xia, Z., Zhang, H., Zeng, C. Lu, C., Zhang, W., Wang, W. (2015). Potencial functions of microRNAs in starch metabolism and development revealed by miRNA transcriptome profiling of cassava cultivars and their wild progenitor. *BMC plant biology*, 15, 33.
- Chen, Jing, Chen, L., Lu, T., Xie, Y., Li, C., Jia, Z., & Cao, J. (2019). ER α 36 is an effective target of epigallocatechin-3-gallate in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(9), 3222-3234.
- Chen, R., Zhang, M., Liu, W., Chen, H., Cai, T., Xiong, H., Sheng, X., Liu, S., Peng, J., Wang, F., Chen, H., Lin, W., Xu, X., Zheng, W., & Jiang, Q. (2018). Estrogen affects the negative feedback loop of PTENP1-miR200c to inhibit PTEN expression in the development of endometrioid endometrial carcinoma. *Cell Death & Disease*, 10(1), 4.
- Chichizola, C., Scaglia, H., Franconi, C., Ludueña, B., Mastandrea, C., Ghioe Pelayo, A. (2009). Disruptores endócrinos y el sistema reproductivo; *Bioquímica Patológica Clínica*, 73,(3): 9-23.
- Chimento, A., De Luca, A., Avena, P., De Amicis, F., Casaburi, I., Sirianni, R., Pezzi, V. (2022). Estrogen Receptors-Mediated Apoptosis in Hormone-Dependent Cancers. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1242.
- Cho, N. L., Javid, S. H., Carothers, A. M., Redston, M., & Bertagnolli, M. M. (2007). Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. *Cancer Research*, 67(5), 2366-2372.
- Chou, W.C., Lee, P.H., Tan, Y.Y., Lin, H.C., Yang, C.W., Chen, K.H., Chuang, C.Y.(2017). An integrative transcriptomic analysis reveals bisphenol A exposure-induced dysregulation of microRNA expression in human endometrial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 41, 133–142.
- Chtourou, Y.; Slima, A. B.; Makni, M.; Gdoura, R.; Fetoui, H. (2015). Naringenin Protects Cardiac Hypercholesterolemia-Induced Oxidative Stress and Subsequent Necroptosis in Rats. *Pharmacological Reports PR*, 67(6), 1090–1097.
- Curti, V., Di Lorenzo, A, Rossi. D., Martino, E., Capelli, E., Collina, S., Daglia, M.(2017).Enantioselective modulatory effects of naringenin enantiomers on the Expression Levels of miR3p Involved in Endogenous Antioxidant Defenses: *Nutrients*, 9(3), 215.
- Dabiri, Y., Abu el Maaty, M. A., Chan, H. Y., Wölker, J., Ott, I., Wölfl, S., & Cheng, X. (2019). P53-Dependent Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects of a Gold(I)

- N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complex in Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 9.
- Danese, E., Montagnana, M. (2017). Epigenetics of colorectal cancer: emerging circulating diagnostic and prognostic biomarkers. *Annals of translational medicine*, 5(13), 279.
- Di Donato, N., Jean, Y. Y., Maga, A. M., Krewson, B. D., Shupp, A. B., Avrutsky, M. I., Roy, A., Collins, S., Olds, C., Willert, R. A., Czaja, A. M., Johnson, R., Stover, J. A., Gottlieb, S., Bartholdi, D., Rauch, A., Goldstein, A., Boyd-Kyle, V., Aldinger, K. A., ... Jinks, R. N. (2016). Mutations in CRADD Result in Reduced Caspase-2-Mediated Neuronal Apoptosis and Cause Megalencephaly with a Rare Lissencephaly Variant. *American Journal of Human Genetics*, 99(5), 1117-1129.
- Ding, S., Tang, Z., Jiang, Y., Huang, H., Luo, P., Qing, B., Zhang, S., Tang, R. (2017). IL-8 Is Involved in Estrogen-Related Receptor α -Regulated Proliferation and Migration of Colorectal Cancer Cells. *Digestive diseases and sciences*, 62(12), 3438–3446.
- Doherty, L.F., Bromer, J.G., Zhou, Y., Aldad, T.S., Taylor, H.S. (2010). In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer, *Hormones & cancer*, 1(3), 146–155.
- Dong, S.; Terasaka, S.; Kiyama, R. (2011). Bisphenol A Induces a Rapid Activation of Erk1/2 through GPR30 in Human Breast Cancer Cells. *Environmental Pollution. (Barking Essex 1987)*, 159 (1), 212–218
- Drummond, A. E., & Fuller, P. J. (2010). The importance of ERbeta signalling in the ovary. *The Journal of endocrinology*, 205(1), 15–23.
- Elbanna, H. G., Ebrahim, M. A., Abbas, A. M., Zalata, K., & Hashim, M. A. (2012). Potential value of estrogen receptor beta expression in colorectal carcinoma: Interaction with apoptotic index. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 43(1), 56-62.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell death and differentiation*, 29(5), 946–960.
- García J., Gallego C., Font, G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Revista Toxicológica* 32:144-160.
- Gartel, A.L., Tyner, A.L.(2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Molecular cancer therapeutics*, 1(8), 639–649.
- Griess, B., Tom, E., Domann, F., & Teoh-Fitzgerald, M. (2017). Extracellular Superoxide Dismutase and its Role in Cancer. *Free radical biology & medicine*, 112, 464-479.
- Guo, X., Li, K., Guo, A., & Li, E. (2020). Intestinal absorption and distribution of naringin, hesperidin, and their metabolites in mice. *Journal of Functional Foods*, 74, 104158.
- Hedelin, M., Bälter, K. A., Chang, E. T., Bellocco, R., Klint, A., Johansson, J.-E., Wiklund, F., Thellenberg-Karlsson, C., Adami, H.-O., & Grönberg, H. (2006). Dietary intake of phytoestrogens, estrogen receptor-beta polymorphisms and the risk of prostate cancer. *The Prostate*, 66(14), 1512-1520.

- Herrera-Gómez, A., Garza- Salazar, J.G., Granados-García, M., (2010). Cáncer. En: Manual de oncología. *Procedimientos médico quirúrgicos*. 4a. Ed. Granados-Herrera-Montalvo, L.A., Andonegui, M.A., (2010). Carcinogénesis. En: Manual de oncología. *Procedimientos médico quirúrgicos*. 4a. Ed. Granados-García, M., Herrera-Gómez, A., (Eds.) McGrawHill. p 21. DF., México.
- Hess-Wilson, J. K., Webb, S. L., Daly, H. K., Leung, Y.-K., Boldison, J., Comstock, C. E. S., Sartor, M. A., Ho, S.-M., & Knudsen, K. E. (2007). Unique Bisphenol A Transcriptome in Prostate Cancer: Novel Effects on ER β Expression That Correspond to Androgen Receptor Mutation Status. *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1646-1653.
- Hester, C., Jala, V., Langille, M., Umar, S., Greiner, K.A., Haribabu, B. (2015). Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups. *World J. Gastroenterol.* 7; 21(9): 2759–2769.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y., & Taketani, Y. (1999). Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocrine Journal*, 46(6), 773-778.
- Huang, D., Wu, J., Su, X., Yan, H., Sun, Z. (2017). Effects of low dose of bisphenol A on the proliferation and mechanism of primary cultured prostate epithelial cells in rodents. *Oncology Letters*, 14(3): 2635-2642.
- Iwamoto, M., Masuya, T., Hosose, M., Tagawa, K., Ishibashi, T., Suyama, K., Nose, T., Yoshihara, E., Downes, M., Evans, R.M., Matsushima, A. (2021). Bisphenol A derivatives act as novel coactivator-binding inhibitors for estrogen receptor β . *The Journal of biological chemistry*, 297(5), 101173.
- Jacenic, D.; Beswick, E. J.; Krajewska, W. M.; Prossnitz, E. R. (2019). G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Colon Function, Immune Regulation and Carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 25 (30), 4092–4104.
- Jin, P., Lu, X., Sheng, J., Fu, L., Meng, X., Wang, X., Shi, T., Li, S., & Rao, J. (2010). Estrogen stimulates the expression of mismatch repair gene hMLH1 in colonic epithelial cells. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 3(8), 910-916.
- Kang, E., Jung, S.C., Nam, S.K., Park, Y., Seo, S.H., Park, K.U., Oh, H.K., Kim, D.W., Kang, S.B., Lee, H.S. (2022). Tissue miR-200c-3p and circulating miR-1290 as potential prognostic biomarkers for colorectal cancer. *Scientific reports*, 12(1), 2295.
- Kang, M.H.; Kim, I.H.; Nam, T.J.N. (2014). Phloroglucinol Induces Apoptosis via Apoptotic Signaling Pathways in HT-29 Colon Cancer Cells. *Oncology Reports*, 32 (4), 1341–1346.
- Kazemi, S., Mousavi Kani, S. N., Rezazadeh, L., Pouramir, M., Ghasemi-Kasman, M., & Moghadamnia, A. A. (2017). Low dose administration of Bisphenol A induces liver toxicity in adult rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 494(1-2), 107–112.
- Kharrazian D. (2014). The Potential Roles of Bisphenol A (BPA) Pathogenesis in Autoimmunity. *Autoimmune diseases*, 2014, 743616.
- Kim, A. D.; Zhang, R.; Han, X.; Kang, K. A.; Piao, M. J.; Maeng, Y. H.; Chang, W. Y.; Hyun, J. W.(2015). Involvement of Glutathione and Glutathione Metabolizing

- Enzymes in Human Colorectal Cancer Cell Lines and Tissues. *Molecular Medicine Reports*, 12 (3), 4314–4319.
- Kim, S., & Park, T. I. (2013). Naringenin: A partial agonist on estrogen receptor in T47D-KBluc breast cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(10), 890-899.
- Klaassen, C.D. (2007). Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poison. Capítulo 8. Chemical Carcinogens, 8a. Ed. Klauning J. and Kamendulis L. (Eds.) McGrawHill. p 329. New York
- Konstantinopoulos, P. A., Kominea, A., Vandoros, G., Sykiotis, G. P., Andricopoulos, P., Varakis, I., Sotiropoulou-Bonikou, G., & Papavassiliou, A. G. (2003). Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 39(9), 1251-1258.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.prot095497.
- Le, H. H., & Belcher, S. M. (2010). Rapid Signaling Actions of Environmental Estrogens in Developing Granule Cell Neurons Are Mediated by Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 151(12), 5689-5699.
- Lecomte, S., Demay, F., Ferrière, F., Pakdel, F. (2017). Phytochemicals Targeting Estrogen Receptors: Beneficial Rather Than Adverse Effects? *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1381.
- Lee, H. S., Cho, H. J., Yu, R., Lee, K. W., Chun, H. S., & Park, J. H. Y. (2014). Mechanisms Underlying Apoptosis-Inducing Effects of Kaempferol in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2722-2737.
- Lehman, J. A., Waning, D. L., Batuello, C. N., Cipriano, R., Kadakia, M. P., & Mayo, L. D. (2011). Induction of Apoptotic Genes by a p73-Phosphatase and Tensin Homolog (p73-PTEN) Protein Complex in Response to Genotoxic Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36631-36640.
- Li, W.; Cao, L.; Han, L.; Xu, Q.; Ma, Q. (2015). Superoxide Dismutase Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer Cells via Activation of the H2O2/ERK/NF-KB Axis. *International Journal of Oncology*, 46 (6), 2613–2620.
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M.T., Wang, S., Liu, H., Yin, Y.(2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167.
- Li, H., Zhu, F., Chen, H., Cheng, K. W., Zykova, T., Oi, N., Lubet, R. A., Bode, A. M., Wang, M., & Dong, Z. (2014). 6-C-(E-phenylethenyl)-naringenin suppresses colorectal cancer growth by inhibiting cyclooxygenase-1. *Cancer research*, 74(1), 243–252.
- Lin, J.-N., Lin, V. C.-H., Rau, K.-M., Shieh, P.-C., Kuo, D.-H., Shieh, J.-C., Chen, W.-J., Tsai, S.-C., & Way, T.-D. (2010). Resveratrol Modulates Tumor Cell

- Proliferation and Protein Translation via SIRT1-Dependent AMPK Activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1584-1592.
- Lin, S., Li, Y., Zamyatnin, A. A., Jr, Werner, J., & Bazhin, A. V. (2018). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal of cellular physiology*, 233(7), 5119–5132.
- Lu, J.-Y., Jin, P., Gao, W., Wang, D.-Z., & Sheng, J.-Q. (2017). Estrogen enhances mismatch repair by induction of MLH1 expression via estrogen receptor- β . *Oncotarget*, 8(24), 38767-38779.
- Manchope, M. F., Casagrande, R., & Verri, W. A., Jr (2017). Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone. *Oncotarget*, 8(3), 3766–3767.
- Masuya, T., Iwamoto, M., Liu, X., & Matsushima, A. (2019). Discovery of novel oestrogen receptor α agonists and antagonists by screening a revisited privileged structure moiety for nuclear receptors. *Scientific Reports*, 9(1), 9954.
- Ming, L., Sakaida, T., Yue, W., Jha, A., Zhang, L., & Yu, J. (2008). Sp1 and p73 activate PUMA following serum starvation. *Carcinogenesis*, 29(10), 1878-1884.
- Mohammadi, A., Mansoori, B., Baradaran, B. (2016). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, 705–713.
- Naujokat, C., Sezer, O., & Possinger, K. (1999). Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ Induce Expression of Functional Fas Ligand on HT29 and MCF7 Adenocarcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(3), 813-819.
- Nian, J., Sun, X., Ming, S., Yan, C., Ma, Y., Feng, Y., Yang, L., Yu, M., Zhang, G., Wang, X. (2017). Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based Colorectal Cancer Detection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical and translational gastroenterology*, 8(1), e216.
- Nüssler, N. C., Reinbacher, K., Shanny, N., Schirmeier, A., Glanemann, M., Neuhaus, P., Nussler, A. K., & Kirschner, M. (2008). Sex-specific differences in the expression levels of estrogen receptor subtypes in colorectal cancer. *Gender Medicine*, 5(3), 209-217.
- Organización Mundial de Salud, OMS, (2021). Recuperado 26 de septiembre 2022 de: Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49(10) 4619–4626.
- Pan, Y., Liang, H., Chen, W., Zhang, H., Wang, N., Wang, F., Zhang, S., Liu, Y., Zhao, C., Yan, X., Zhang, J., Zhang, C.-Y., Gu, H., Zen, K., & Chen, X. (2015). MicroRNA-200b and microRNA-200c promote colorectal cancer cell proliferation via targeting the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs. *RNA Biology*, 12(3), 276-289.
- Pan, P., Yu, J. y Wang, L. S. (2018). Colon Cancer: What We Eat. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 27(2), 243–267.
- Panieri, E., Santoro, M.M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell death & disease*, 7(6), e2253.

- Pellegrini, M.; Bulzomi, P.; Galluzzo, P.; Lecis, M.; Leone, S.; Pallottini, V. (2014). Marino, M. Naringenin Modulates Skeletal Muscle Differentiation via Estrogen Receptor α and β Signal Pathway Regulation. *Genes & Nutrition*, 9 (5).
- Pedraza-Fariña, L.G. (2009). Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. *The Yale journal of biology and medicine*, 79(3-4), 95–103.
- Pinton, G., Nilsson, S., & Moro, L. (2018). Targeting estrogen receptor beta (ER β) for treatment of ovarian cancer: Importance of KDM6B and SIRT1 for ER β expression and functionality. *Oncogenesis*, 7(2), 1-11.
- Ponte, L.G.S., Pavan, I.C.B., Mancini, M.C.S., da Silva, L.G.S., Morelli, A.P., Severino, M.B., Bezerra, R.M.N., Simabuco, F.M. (2021). The Hallmarks of Flavonoids in Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 2029.
- Ramesh, E.; Alshatwi, A. A. (2013). Naringin Induces Death Receptor and Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Cervical Cancer (SiHa) Cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 97–105.
- Rao, A. K., Ziegler, Y. S., McLeod, I. X., Yates, J. R., & Nardulli, A. M. (2008). Effects of Cu/Zn Superoxide Dismutase on Estrogen Responsiveness and Oxidative Stress in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 22(5), 1113-1124.
- Ray, P., Guha, D., Chakraborty, J., Banerjee, S., Adhikary, A., Chakraborty, S., Das, T., & Sa, G. (2016). Crocetin exploits p53-induced death domain (PIDD) and FAS-associated death domain (FADD) proteins to induce apoptosis in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 6, 32979.
- Ribeiro-Varandas, E., Viegas, W., Pereira, H.S., Delgado, M. (2013). Bisphenol A at concentrations found in human serum induces aneugenic effects in endothelial cells. *Mutation research*, 751(1), 27–33.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Rechner, A.R., Smith, M.A., Kuhnle, G., Gibson, G.R., Debnam, E.S., Srai, S.K., Moore, K.P., Rice-Evans, C.A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2):212-25.
- Robbin, Contran, Kumar, Abbas, Fausto, Aster. (2010). Patología estructural y funcional. Elsevier Saunders. México
- Saavedra, K., Valbuena, J., Olivares, W., Marchant, M. J., Rodríguez, A., Torres-Estay, V., Carrasco-Avino, G., Guzmán, L., Aguayo, F., Roa, J. C., & Corvalán, A. H. (2015). Loss of Expression of Reprimo, a p53-induced Cell Cycle Arrest Gene, Correlates with Invasive Stage of Tumor Progression and p73 Expression in Gastric Cancer. *PloS One*, 10(5), e0125834.
- Sasikirana, W., Radifar, M., Herawati, C., Surono, A., Astuti, I., Aryandono, T., & Haryana, S. M. (2019). The Expression of miR-141 and mRNA PTEN with Cisplatin Therapy on NPC. *KnE Life Sciences*, 67-75-67-75.

- Sakamoto H., Yokota H., Kibe R., Sayama Y., Yuasa A. (2002). Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 1573(2), 171–176.
- Sengupta, S., Obiorah, I., Maximov, P. Y., Curpan, R., & Jordan, V. C. (2013). Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *British Journal of Pharmacology*, 169(1), 167-178.
- Shangary, S., Ding, K., Qiu, S., Nikolovska-Coleska, Z., Bauer, J. A., Liu, M., Wang, G., Lu, Y., McEachern, D., Bernard, D., Bradford, C. R., Carey, T. E., & Wang, S. (2008). Reactivation of p53 by a specific MDM2 antagonist (MI-43) leads to p21-mediated cell cycle arrest and selective cell death in colon cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 7(6), 1533-1542.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2018. Colorectal cancer statistics, 2018. *CA. Cancer Journal for Clinicians*, 68(1):7-30.
- Sladky, V. C., & Villunger, A. (2020). Uncovering the PIDosome and caspase-2 as regulators of organogenesis and cellular differentiation. *Cell Death & Differentiation*, 27(7), 2037-2047.
- Song, H.M., Park, G.H., Eo, H.J., Jeong, J.B. (2016). Naringenin-Mediated ATF3 Expression Contributes to Apoptosis in Human Colon Cancer, 24(2):140-6.
- Strubberg, A.M., Madison, B.B. (2017). MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Disease models & mechanisms*, 10(3), 197–214.
- Sun, H., Tian, A., Zhang, J., Liao, X., & Zhang, N. (2019). Epithelial-mesenchymal transition induced by MyoD inhibits growth of high metastatic colorectal cancer. *Medical Hypotheses*, 130, 109285.
- Su Y., Shao C., Huang X., Qi J., Ge R., Guan H., Lin Z. (2018). Extraction and detection of bisphenol A in human serum and urine by aptamer-functionalized magnetic nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(7), 1885–1891.
- Surco-Laos, F.; Valle Campos, M.; Loyola, E.; Dueñas, M.; Santos, C. (2016). Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82 (1), 29–37.
- Tavsan, Z., & Kayali, H. A. (2019). Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 109004.
- Teng, J., Ilu, X., Zhao, Y., Tao, N., Wang, M. (2018). Dihydromyricetin as a Functional Additive to Enhance Antioxidant Capacity and Inhibit the Formation of Thermally Induced Food Toxicants in a Cookie Model. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2184.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.e5.
- Tili, E., Michaille, J.-J., Alder, H., Volinia, S., Delmas, D., Latruffe, N., & Croce, C. M. (2010). Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 2057-2065.

- Totta, P., Acconcia, F., Leone, S., Cardillo, I., & Marino, M. (2004). Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: Involvement of estrogen receptor alpha and beta signalling. *IUBMB Life*, 56(8), 491-499.
- Valentino R., D'Esposito V., Ariemma F., Cimmino I., Beguinot F., (2016). Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population?. *Journal of endocrinological investigation*, 39(3), 259–263.
- Vetrivel, P., Kim, S. M., Saralamma, V. V. G., Ha, S. E., Kim, E. H., Min, T. S., & Kim, G. S. (2019). Function of flavonoids on different types of programmed cell death and its mechanism: A review. *The Journal of Biomedical Research*, 33(6), 363-370.
- Vigneswara, V., & Ahmed, Z. (2020). The Role of Caspase-2 in Regulating Cell Fate. *Cells*, 9(5).
- Wang, M., Yu, F., Zhang, Y., Chang, W., Zhou, M. (2022). The Effects and Mechanisms of Flavonoids on Cancer Prevention and Therapy: Focus on Gut Microbiota. *International Journal of Biological Sciences*, 18 (4):1451-1475.
- Williams, C, DiLeo, A., Niv, Y., Gustafsson, J.A. (2016). Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer letters*, 372(1), 48–56.
- Xiong, H., Chen, Z., Lin, B., Xie, B., Liu, X., Chen, C., Li, Z., Jia, Y., Wu, Z., Yang, M., Jia, Y., Wang, L., Zhou, J., Meng, X. (2022). Naringenin Regulates FKBP4/NR3C1/NRF2 Axis in Autophagy and Proliferation of Breast Cancer and Differentiation and Maturation of Dendritic Cell. *Frontiers in immunology*, 12, 745111.
- Xu, Z.; Huang, B.; Liu, J.; Wu, X.; Luo, N.; Wang, X.; Zheng, X.; Pan, X. (2018). Combinatorial Anti-Proliferative Effects of Tamoxifen and Naringenin: The Role of Four Estrogen Receptor Subtypes. *Toxicology*, 410, 231–246.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2016). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive medicine and biology*, 16(1), 4–20.
- Yao, Y., Li, H., Gu, Y., Davidson, N. E., & Zhou, Q. (2010). Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling. *Carcinogenesis*, 31(3), 382-387.
- Ye, S.-B., Cheng, Y.-K., Zhang, L., Wang, X.-P., Wang, L., & Lan, P. (2019). Prognostic value of estrogen receptor- α and progesterone receptor in curatively resected colorectal cancer: A retrospective analysis with independent validations. *BMC Cancer*, 19(1), 933.
- Zeng, X., Chen, L., Jost, C. A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W. G., Oren, M., Chen, J., & Lu, H. (1999). MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), 3257-3266.
- Zeng, X., Su, W., Zheng, Y., He, Y., He, Y., Rao, H., Peng, W., & Yao, H. (2019). Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Naringin in Aged Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10.