



“ Evaluación del efecto antiproliferativo y antioxidante del extracto de la fermentación del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre células de cáncer de colon humano SW480=



2022



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

“Evaluación del efecto antiproliferativo y antioxidante del extracto de la fermentación del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre células de cáncer de colon humano SW480”

Opción de titulación

Tesis

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

Presenta:

IBT Yadira Yantziry Maldonado Cano

Dirigido por:

Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Evaluación del efecto antiproliferativo y antioxidante
del extracto de la fermentación del garambullo
(*Myrtillocactus geometrizans*) sobre células de cáncer
de colon humano SW480

por

Yadira Yantziry Maldonado Cano

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

Clave RI: MEMAC-239200-0123-123



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



“Evaluación del efecto antiproliferativo y antioxidante del extracto de la fermentación del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre células de cáncer de colon humano SW480”

Opción de titulación
Tesis

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

Presenta:
IBT Yadira Yantziry Maldonado Cano

Dirigido por:
Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda
Presidente

Dr. Pablo García Solís
Secretario

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Vocal

Dra. Mardey Liceth Cuellar Nuñez
Vocal

Dra. Rocio Campos Vega
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero 2023

RESUMEN

El cáncer de colon es una patología de prevalencia a nivel mundial, y de acuerdo a las últimas estadísticas en el 2020 causó 988 mil muertes. Hoy en día se sabe que esta enfermedad está fuertemente relacionada con la alimentación y el estilo de vida de las personas. Existe una asociación inversa entre el consumo de alimentos de origen vegetal y el desarrollo de cáncer de colon, esto a su vez relacionado con su contenido de fitoquímicos. Los fitoquímicos componen una amplia gama de moléculas activas que han demostrado tener un importante efecto sobre la salud gastrointestinal. El *Myrtillocactus geometrizans*, un fruto que pertenece a la familia de las cactáceas y que coloquialmente es conocido como garambullo, se ha demostrado por investigaciones recientes que contiene una importante cantidad de estas biomoléculas. Por lo tanto en este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo y antioxidante de un extracto fermentado de garambullo sobre células de cáncer de colon humano SW480. Se encontró que el extracto disminuye la viabilidad celular de manera dosis-dependiente, obteniendo una IC₅₀ del 15 %, 30 % de la muerte celular es por necrosis y 44 % por apoptosis. Además, el tratamiento provocó arresto en el ciclo celular principalmente en la fase G2/M y disminución en glutatión reducido. Los resultados permiten sugerir un efecto sobre la viabilidad celular y un efecto favorecedor en el uso de glutatión reducido como defensa antioxidante endógena. Sin embargo, es importante continuar con más estudios que permitan sugerir el mecanismo de acción molecular del fruto *Myrtillocactus geometrizans*.

SUMMARY

Colon cancer is a worldwide prevalent pathology, and according to the latest statistics in 2020 it caused 988 thousand deaths. Nowadays it is known that this disease is strongly related to people's diet and lifestyle. There is an inverse association between the consumption of plant foods and the development of colon cancer, this in turn related to their phytochemical content. Phytochemicals make up a wide range of active molecules that have been shown to have an important effect on gastrointestinal health. *Myrtillocactus geometrizans*, a fruit belonging to the Cactaceae family and colloquially known as garambullo, has been shown by recent research to contain a significant amount of these biomolecules. Therefore, in this work we evaluated the antiproliferative and antioxidant effect of a fermented extract of garambullo on human colon cancer cells SW480. It was found that the extract decreases cell viability in a dose-dependent manner, obtaining an IC_{50} of 15 %, 30 % of cell death is by necrosis and 44 % by apoptosis. In addition, the treatment caused cell cycle arrest mainly in the G2/M phase and a decrease in reduced glutathione. The results suggest an effect on cell viability and a favorable effect on the use of reduced glutathione as an endogenous antioxidant defense. However, it is important to continue with more studies to suggest the molecular mechanism of action of the fruit *Myrtillocactus geometrizans*.

A mis padres, mi hermano, mi tío y mi amor bonito

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico a mi persona, para poder dedicarme a tiempo completo de este proyecto. A mi padre por enseñarme a no rendirme antes las adversidades, a mi madre por su amor y calidez para continuar con mis sueños, a mi hermano por inspirarme, a mi tío y Alejandro Morales, quien con su amor, me hace sentir que puedo con todo. A mi directora de tesis Dra. en C. Haydé Vergara Castañeda, quien con su apoyo me permitió enamorarme del tema de mi tesis e indagar más allá abriéndome perspectivas del alcance de la investigación que antes de este posgrado no tenía. Agradezco su paciencia, su amor a la ciencia, sus palabras de apoyo cuando las necesite y su atención no solo en lo profesional sino en lo personal.

A todos los doctores que de alguna u otra forma me apoyaron a lo largo de este trayecto y de quienes se, continuarán haciéndolo una vez que termine, Dra. Ana Gabriela Hernández Puga, Dr. Pablo García Solís, Dr. Juan Carlos Solís, Dra. Liceth Cuellar, Dra. Rocio Campos.

A mis compañeros de generación, Luis Gasca, Maritza Cuevas, Daniel Luna, Dalia Méndez.

Por el incomparable apoyo de mis compañeras Edelmira Sánchez, Nataly García, Sara Lozano, Gloria Gutiérrez, Guadalupe López por brindarme una de las cosas más valiosas, que es su tiempo de explicarme y apoyarme cuando lo necesitaba.

A mis amigas, colegas y compañeros que en algún momento llegaron a ayudarme y escucharme, pues el camino al realizar un posgrado me atrevo a decirlo no es tan fácil como se dice.

En general hay días donde creemos sentirnos perdidos y con cierta incertidumbre, sin embargo, todos y cada uno de los aquí mencionados fueron parte importante de mi paso para concluir mi proyecto.

Y finalmente agradezco a mi alma mater la Universidad Autónoma de Querétaro así como a la facultad de Medicina por permitirme el uso de sus instalaciones para este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Fisiología del sistema digestivo.....	12
1.2 Cáncer	14
1.2.1 Sellos distintivos del cáncer	15
1.2.2 Cáncer de colon: estadísticas.....	17
1.2.3 Fisiopatología del cáncer de colon	18
1.3 Relación de la dieta con el cáncer de colon.	22
1.4 Fibra dietaria.....	22
1.5 Compuestos fenólicos	24
1.7 Garambullo (<i>Myrtillocactus geometrizans</i>).....	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo general	31
2.2 Objetivos particulares.....	31
3. METODOLOGÍA.....	31
3.1 Simulación de los procesos de digestión y fermentación <i>in vitro</i>	31
3.2 Viabilidad celular.....	33
3.3 Cuantificación de lactato deshidrogenasa.....	34
3.4 Glutación	35
3.5 Superóxido dismutasa.....	37
3.6 Ciclo celular	38
3.7 Apoptosis	38
3.8 Análisis estadístico.....	39

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1	El EFG disminuye la viabilidad celular en células SW480.	40
4.2	El EFG induce muerte celular por necrosis en células SW480	41
4.3	El EFG induce apoptosis en células de cáncer de colon humano SW480. ...	42
4.4	El extracto fermentado de garambullo induce arresto en el ciclo celular en la fase G2/M en células SW480.....	44
	Sistema antioxidante endógeno	47
4.5	El glutatión reducido se vio disminuido por el extracto fermentado de garambullo (EFG) en células de cáncer de colon SW480.	47
4.6	El extracto fermentado de garambullo no ejerce un efecto sobre la enzima superóxido dismutasa en células SW480.....	48
5.	CONCLUSIÓN.....	50
6.	REFERENCIAS	50
7.	APÉNDICE	62

Abreviaciones

BF	Blanco de fermentado
EFG	Extracto fermentado de garambullo
DMEM	Dulbecco Modified Eagles Minimal
SFB	Suero Fetal Bovino
FND	Fracción no digerible
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de minerales, carbohidratos, proteínas y fibra en *Myrtillocactus geometrizans*.

Tabla 2. Cuantificación de compuestos bioactivos de la fracción no digerible (FND) *Myrtillocactus geometrizans*.

Tabla 3. Preparación de reactivo lactato deshidrogenasa

Tabla 4. Preparación de soluciones para lactato deshidrogenasa

Tabla 5. Curva de calibración para medir actividad de lactato deshidrogenasa.

Tabla 6. Indicaciones para preparación de soluciones para superóxido dismutasa

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Aparato digestivo
- Figura 2. Capas de la pared del colon
- Figura 3. Proceso de transformación de una célula normal a una célula cancerígena
- Figura 4. Número de casos a nivel mundial de tipos de cáncer
- Figura 5. Desarrollo por pasos de un típico cáncer de colon
- Figura 6. Cáncer colorrectal, tamaño del tumor
- Figura 7. Proceso de recambio celular en la cripta intestinal
- Figura 8. Carcinogénesis colonorectal
- Figura 9. Fermentación bacteriana de la fibra en el colon
- Figura 10. Interacciones de compuestos fenólicos con fibra dietaria.
- Figura 11. Estructura química de polifenoles
- Figura 12. Fruto de *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo).
- Figura 13. Efecto del tratamiento con EFG sobre la viabilidad en células SW480 con MTT
- Figura 14. Cuantificación de lactato deshidrogenasa
- Figura 15. Efecto del EFG sobre muerte celular en células SW480
- Figura 16. Efecto del EFG sobre la apoptosis.
- Figura 18. Efecto del EFG sobre las fases del ciclo celular.
- Figura 19. Cuantificación de glutatión reducido
- Figura 20. Efecto del EFG sobre la enzima superóxido dismutasa (SOD).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Fisiología del sistema digestivo

El sistema digestivo es un sistema muy complejo, se conforma de una estructura de carácter endodérmica básica a lo largo de su composición como lo es una capa llamada mucosa, submucosa muscular, serosa y plexos nerviosos. Este sistema se compone de un conjunto de órganos y glándulas, las cuales se encargarán de ingerir, absorber y eliminar alimentos introducidos al organismo (Long., 2004). Su longitud es de aproximadamente de 11 metros, desde la boca hasta el esfínter anal (Figura 1).

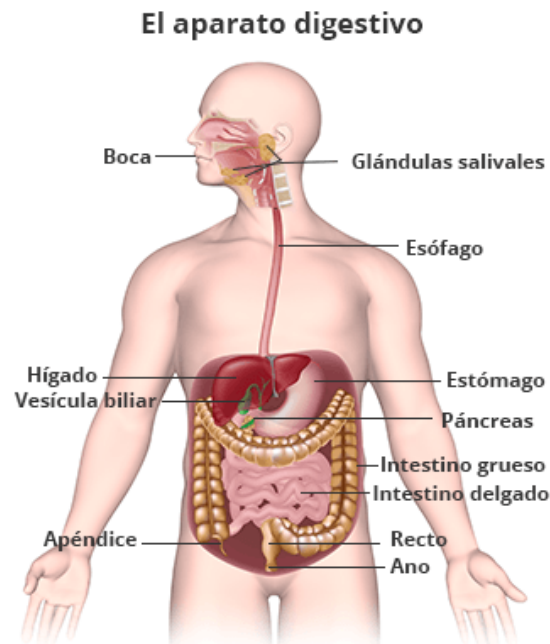


Figura 1. Aparato digestivo (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2021)

De manera sencilla el proceso del alimento a través del sistema digestivo, comienza desde la boca, donde además de ser la fase donde se trituran los alimentos, comienzan a degradarse por enzimas presentes en la saliva. En el estómago las proteínas presentes, sufren un proceso de degradación por el ambiente ácido generado por el jugo gástrico y enzimas como la pepsina (Rosell Puig y col., 2004). Ya en el intestino delgado el ahora conocido como quimo alimenticio es procesado

nuevamente por enzimas para el aprovechamiento de nutrientes, los cuales se absorberán por las células que componen al órgano (Mariel E.N., 2018).

El intestino grueso o colon, tal como su nombre lo indica, tiene un diámetro más grueso, pero en longitud es más corto (1.5 m). Este órgano se compone de algunas capas que le permiten su función. Resulta por lo tanto importante destacar que el tiempo que los alimentos permanecen en el intestino grueso es notablemente distinto al de los otros órganos que componen el sistema gastrointestinal. El tiempo que los alimentos permanecen en el estómago van desde ½ a 2 horas, en el intestino delgado de 2 a 6 horas y en el intestino grueso los tiempos son de 6 a 72 horas. La principal razón de este tiempo tan prolongado es debido a que el intestino grueso es capaz de generar nutrientes a partir del alimento, gracias al proceso de fermentación colónica, la cual se lleva a cabo por bacterias benéficas compuestas principalmente por *Bifidobacteria* y los *Lactobaccillus* conocidas como probióticos. Gracias al proceso que se lleva a cabo en el colon, se derivan moléculas importantes como lo son los ácidos grasos de cadena corta, los cuales funcionan como una fuente de energía alterna para las células, otorgando beneficios, que se revisaran más adelante (Jiang-Xin y col., 2021).

La parte de la fibra que no es fermentada por la acción de las bacterias pasará a ser parte de la masa fecal y a su vez esta podrá unirse a toxinas y productos de desechos ayudando a ser eliminadas en las heces (Zubillaga y col., 2001).

De manera más específica, la primera capa interior del intestino grueso se encuentra la mucosa, la cual abarca una parte de tejido del epitelio, una capa delgada de musculo llamada también *muscularis mucosae* y tejido conectivo, para continuar con la submucosa compuesta en su mayoría por tejido fibroso. Seguido a esto encontramos nuevamente tejido muscular, el cual abarca más área que el tejido muscular encontrado en la parte de la mucosa, para finalizar con una capa delgada externa de tejido conectivo el cual abarca la subserosa y la serosa, estas últimas recorren la mayor parte del colon con excepción del recto (Figura 2).

En el área perteneciente a la mucosa encontramos células calciformes y enterocitos en criptas conocidas como criptas de Lieberkuhn que tienen como función principal el revestimiento del intestino y producción de moco. Las células que conforman este

tejido constantemente están en recambio. Sin embargo, cuando existe un error en estos procesos existe el riesgo de convertirse en un adenocarcinoma (Instituto Nacional del Cáncer, 2020)

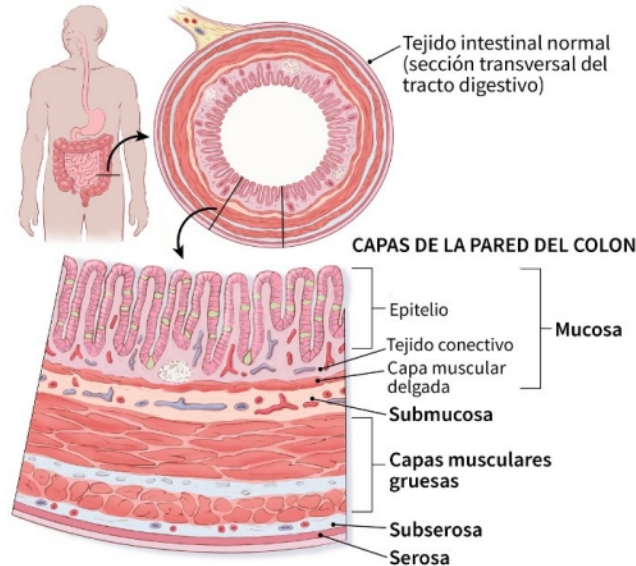


Figura 2. Capas de la pared del colon (American Joint Committee on Cancer, 2017)

1.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en donde las células crecen de manera descontrolada hasta diseminarse (Instituto Nacional del Cáncer, 2021). Dicha enfermedad puede aparecer casi en cualquier parte del cuerpo, entrar al tejido circundante y provocar metástasis (World Health Organization, 2021).

Las células presentan procesos ordenados de división y muerte. La mayoría de las células tumorales tienen en común un daño celular debido a la afectación de dos familias de genes, los proto-oncogenes; implicados en el crecimiento y división celular y los genes supresores de tumores los cuales están encargados de controlar una división celular exacerbada (National Human Genome Research Institute, 2020). La carcinogénesis aparece por la pérdida del equilibrio entre los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes reparadores del DNA. Estos últimos como su nombre lo dice están implicados en reparar cuando se detecta un daño en el genoma (Cruz-Bustillo y col., 2004).

1.2.1 Sellos distintivos del cáncer

Los sellos distintivos del cáncer tienen como objetivo proporcionar uniformidad en las propiedades celulares del proceso de transformación que adquiere una célula fenotípicamente normal a célula cancerígena (Figura 3). Éstos fueron propuestos por primera vez por Douglas Hanahan y Robert Weinberg en su artículo “The Hallmarks of Cancer” publicado en el 2000, los mismos autores han actualizado dichos marcadores de manera más específica (Hanahan y Weinberg, 2011).

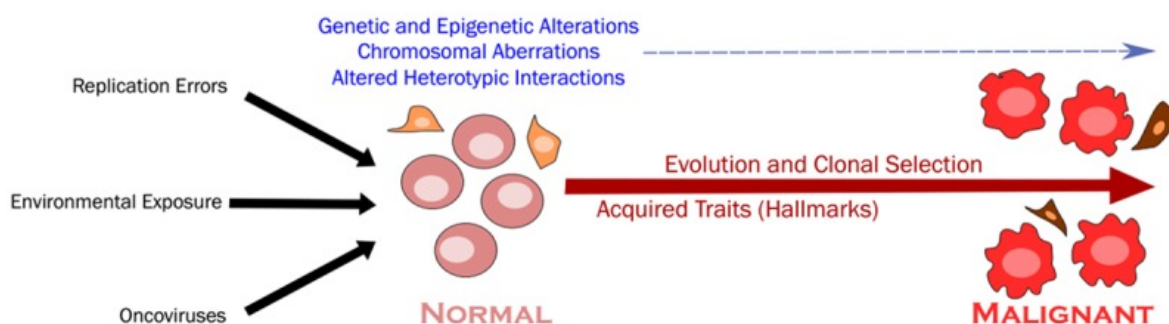


Figura 3. Proceso de transformación de una célula normal a una célula cancerígena (Fouad y Aanei, 2017)

Algunos de los marcadores del cáncer se describen a continuación:

- Autosuficiencia en señales de crecimiento: las células cancerígenas están en una constante estimulación de crecimiento y división, esto en muchas de las células puede ser debido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) el cual es una proteína presente en la superficie de las células y que, para activarse, se une al receptor de crecimiento epidérmico. Existen varias investigaciones destinadas a inhibir específicamente esta constante estimulación y de esa forma detener la rápida multiplicación celular (Sabbah y col., 2020).
- Insensibilidad a señales anti-crecimiento: la célula tiene un mecanismo que regula precisamente la división celular, sin embargo, en una célula cancerígena, las mutaciones que se hacen presentes, dan paso a la pérdida

de este control, pasando por alto las señales de anti crecimiento (Vogelstein y col., 2013).

- Evasión de la apoptosis: esta característica suele ser una de las últimas mutaciones que suele tener una célula para volverse maligna. A través de proteínas como es la p53 se induce la apoptosis, correspondiente a una muerte celular programada, sin embargo, al estar mutada esta molécula, la célula es capaz de evadir la muerte celular, volviéndose “inmortal” (López y Tait., 2015).
- Angiogénesis: la angiogénesis se refiere al proceso de ensamblaje de células endoteliales de vasos sanguíneos pre existentes. De esta manera una célula cancerígena es capaz de obtener nutrientes a partir de este proceso, proveyéndole de más energía para promover su crecimiento (Carmeliet., 2000).
- Invasión y metástasis: uno de los marcadores más característicos del cáncer es su invasión a otros órganos y tejidos y es precisamente este proceso lo que vuelve a dicha enfermedad tan maligna si no se detecta a tiempo (Steeg., 2006).
- Reprogramación del metabolismo energético: una característica de la célula cancerígena es su cambio metabólico. Se sabe que una célula cancerígena cambia su metabolismo de tal forma que su ambiente se vuelve hipóxico, con un pH ácido, además de presentar una elevada concentración de lactato, incluso cuando hay suficiente oxígeno para oxidar la glucosa mediante el ciclo de Krebs en la mitocondria. Esta capacidad adquirida se le conoce como efecto de Warburg, lo que le permite a la célula maligna ser más efectiva en la producción de energía. De este modo se ha propuesto que el lactato podría ser un oncometabolito, mediador clave para procesos tumorales (Warburg y col., 1926).
- Evasión de la respuesta inmune: El sistema inmune está involucrado en la mayoría de los procesos celulares que se llevan a cabo en el sistema y el cáncer no es la excepción. Se sabe que a diario muchas células mutan, debido a la regeneración celular; sin embargo, estas son reconocidas por el

sistema inmunológico y destruidas de inmediato. Coloquialmente es llamado “Inmunomedición del cáncer”. A pesar de este proceso de reconocimiento y eliminación por parte del sistema inmune algunas células son capaces de permanecer latentes y escapar su detección a través de alteraciones genéticas. Así, una célula tumoral puede evitar los componentes citotóxicos del sistema inmunológico mediante la expresión de factores inmunosupresores o bien por el reclutamiento de células inflamatorias inmunosupresoras (Dunn y col., 2002).

1.2.2 Cáncer de colon: estadísticas.

El cáncer de colon es uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial. Ocupa el tercer lugar a nivel mundial después del cáncer de pulmón y antes del de próstata (Figura 4). En el año 2018 se registraron 1 284 207 casos a nivel mundial (International Agency for Research on Cancer, 2018) y su tasa de mortalidad lo posiciona como el segundo cáncer con mayor mortalidad. Tan solo en el 2020 se reportaron cerca de 935 mil muertes (World Health Organization, 2020).

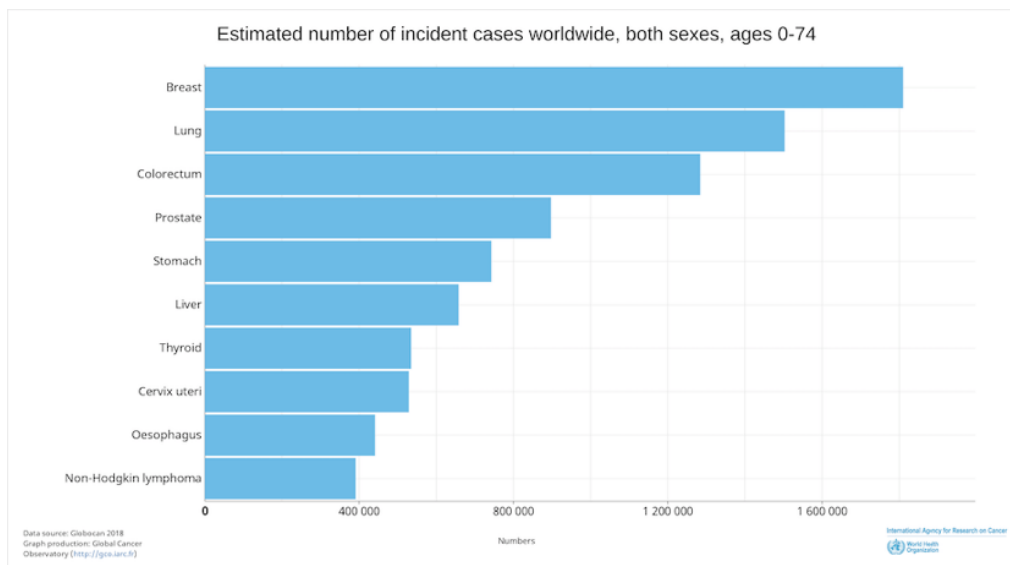


Figura 4. Número de casos a nivel mundial de tipos de cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2018).

En México la incidencia es igual de alarmante, según datos de la Secretaría de Salud el cáncer de colon ocupa el tercer lugar de los tipos de cáncer más predominantes. Expertos señalan que 14 de cada 100 fallecimientos es a causa de esta patología y quienes lo padecen tienen una expectativa de vida de 63 años (Instituto Nacional de Salud Pública, 2020).

1.2.3 Fisiopatología del cáncer de colon

El cáncer de colon comienza con la presencia de pólipos neoplásicos en la mucosa colónica (Cappell., 2008), estos pólipos inician como tumores benignos y a causa de un aumento en el ritmo del crecimiento de células aparentemente normales, las cuales en su desarrollo se convierten en una neoplasia maligna. Comúnmente el desarrollo de un tumor maligno está ligado a la activación de oncogenes y a la inhibición de supresores de tumores (Figura 5).

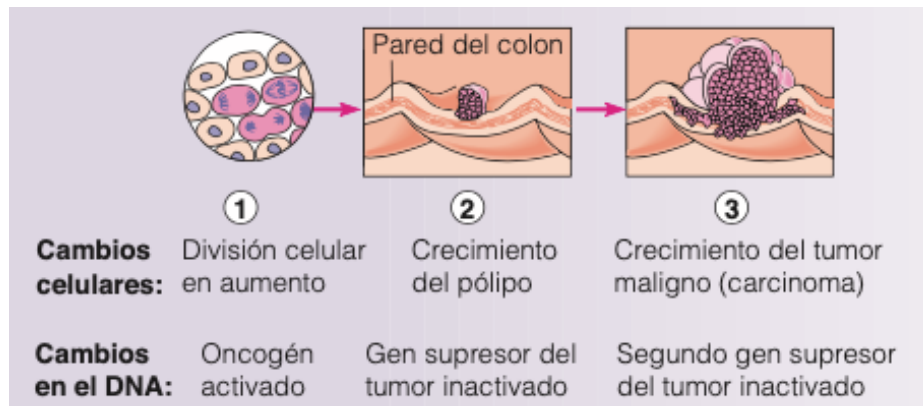


Figura 5. Desarrollo por pasos de un típico cáncer de colon (Marieb, Anatomía y fisiología Humana, 2008).

El cáncer de colon se puede estadificar de acuerdo al sistema del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), llamado TNM, cuyas letras corresponden a tres características para poder clasificar la patología, a continuación, se describen brevemente:

- Tamaño del tumor (T) es decir, la extensión del cáncer con base a la composición del intestino grueso.

- La transmisión del cáncer a los ganglios linfáticos adyacentes, en el que la “N” hace referencia a los nódulos.
- Metástasis (M) el cual hace referencia al avance del cáncer no solo a los ganglios linfáticos sino a otros órganos cercanos como por ejemplo el hígado o los pulmones.

Basados en estas características se tiene estadificada a la enfermedad del estadio 0 al IV, siendo este último el más avanzado del cáncer de colon (Figura 6).

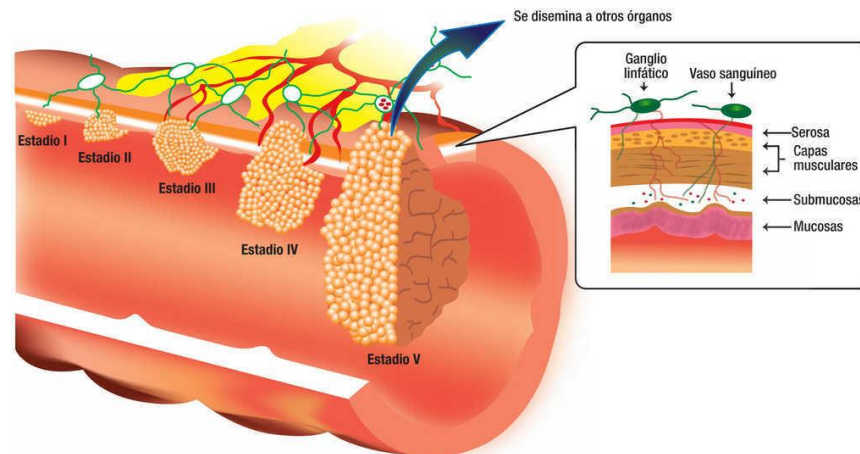


Figura 6. Cáncer colorectal, tamaño del tumor (Mota-Ramírez y col., 2011)

En el estadio 0 el cáncer se encuentra en la etapa más temprana de esta patología esto significa que no ha avanzado más allá de la capa de la mucosa, conocida como carcinoma *in situ*. En el estadio I el cáncer ha crecido hacia la capa *muscularis mucosae* llegando inclusive hasta la submucosa, a diferencia del estadio II donde el tumor ya se ha extendido hasta las capas más externas del colon y comienza a extenderse a los órganos adyacentes. El estadio III contempla que ya ha alcanzado los ganglios linfáticos, sin embargo, a diferencia del estadio IV aún no ha hecho metástasis (American Joint Committee on Cancer, 2017).

El cáncer de colon normalmente no presenta síntomas, pasando desapercibido provocando que el adenocarcinoma evolucione a la última fase del cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).

El desarrollo de cáncer podría entenderse como la pérdida del equilibrio entre los genes supresores de tumores y los protooncogenes. De acuerdo a esto la carcinogénesis colonorectal es el resultado de la alteración de los genes que

desencadenarán una proliferación autónoma y descontrolada de la célula, lo que llevará a la aparición de un adenocarcinoma.

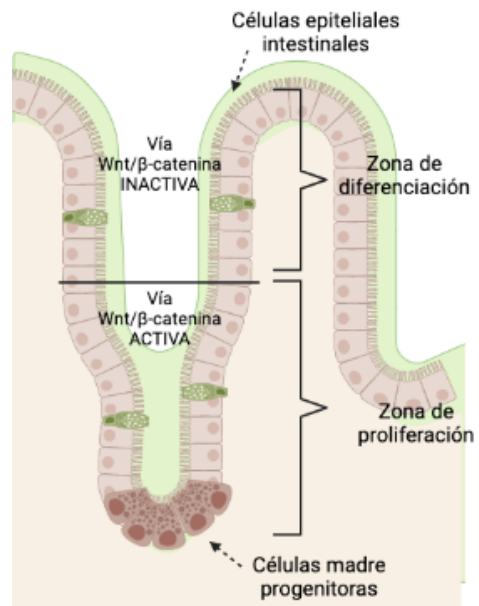


Figura 7. Proceso de recambio celular en la cripta intestinal (Imagen modificada de Hernández y col., 2012)

El proceso de malignización del tejido colonorectal involucra alteración en el proceso de recambio celular que se lleva a cabo en las criptas intestinales. Éstas intestinales se pueden dividir en dos zonas: la zona proliferativa y la zona de diferenciación, ubicada hacia la luz intestinal (Figura 7).

La regeneración celular ocurre aproximadamente de 3 a 6 días y este proceso consiste en la generación de nuevas células a partir de células madres, las cuales proliferarán gracias a un proceso de activación de la vía Wnt/ β-catenina en donde además existirá un predominio de señales antiapoptóticas, como es el caso de la proteína Bcl-2. Por otro lado, en la zona de diferenciación predominarán las señales antiproliferativas, con ayuda de la proteína APC la cual inactivará la vía Wnt/ β-catenina (Hernández y col., 2012).

La carcinogénesis colonorectal se conforma de cuatro fases: iniciación, promoción, progresión y metástasis (Figura 8).

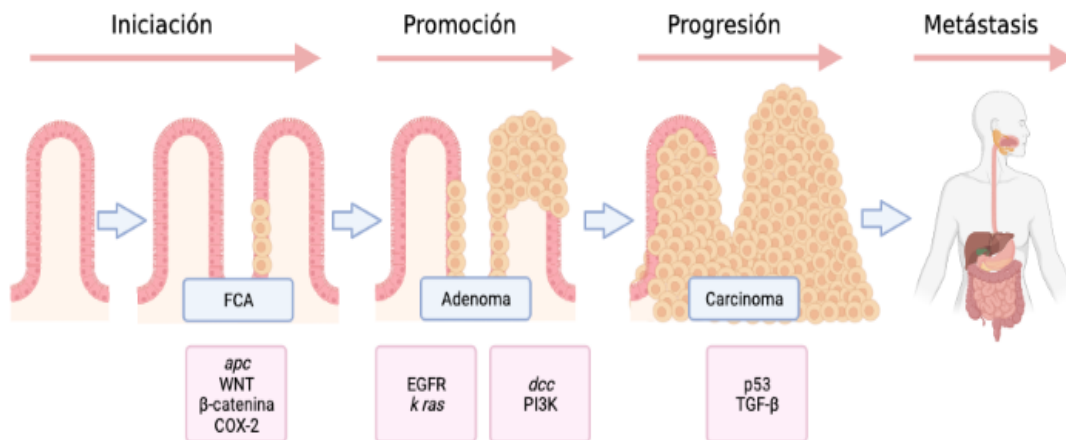


Figura 8. Carcinogénesis colonorectal (Imagen modificada de Rojman y col., 2014).

La fase de iniciación comienza con la mutación del gen *apc*, la activación de la vía Wnt permitiendo a su vez la sobre-activación de β-catenina y COX-2, provocando que la proliferación celular aumente. Esto a su vez dará paso a la formación de fosas crípticas aberrantes (FCA), que presentan características como: longitud mayor a lo normal, espacio pericriptal aumentado que a diferencias de las criptas normales se puede apreciar una capa gruesa de células epiteliales. (Asociación Castellana de Aparato Digestivo, 2021).

La fase de la promoción se caracteriza por la mutación en genes de la familia Ras, así como la activación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) otorgando a la célula la habilidad de supervivencia celular. Por otro lado, la mutación en el gen *dcc* provoca una alteración en el ciclo celular, desregulando así a la proteína PI3K y perdiendo la capacidad de diferenciación. Finalmente, en la fase de progresión, la acumulación de todas estas mutaciones y alteraciones provocarán la pérdida de función de p53 por lo tanto la célula ya no será capaz de reparar el DNA dañado, inhibiéndose la muerte celular programada (apoptosis), volviéndose un carcinoma. Finalmente, otras alteraciones genéticas provocarán metástasis (Rojman y col., 2014).

Múltiples investigaciones destacan la importancia de una dieta rica en nutraceuticos, fibras vegetales y bajas en grasas para reducir la incidencia del adenocarcinoma de colon (Ocvirk y col., 2019).

1.3 Relación de la dieta con el cáncer de colon.

Si bien no existe un alimento que por sí solo pueda asegurar una prevención absoluta o un tratamiento como tal, se ha establecido una fuerte asociación entre el consumo de fitoquímicos y la fibra vegetal con la detención del desarrollo del cáncer de colon (Robles-Agudo, 2005).

1.4 Fibra dietaria

La fibra dietaria proviene de las frutas y alimentos de origen vegetal, ésta se caracteriza por ser resistente a la actividad enzimática del estómago, por lo que pasa de manera prácticamente intacta al colon. La fibra dietaria se divide en soluble, fermentada casi en su totalidad en colon y la fibra insoluble, que es escasamente fermentada (Escudero-Álvarez, 2006). El proceso fermentativo anaerobio da lugar a productos como H_2 , CH_4 , CO_2 , y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) entre los que destacan el ácido acético, propiónico y butírico. Todos estos procesos son posibles gracias a la actividad de la microbiota colónica (García-Peris, 2004).

Los AGCC son producidos de dos maneras, en el caso del ácido acético y el ácido butirato son el resultado de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof, y el propionato es generado a partir del succinato (Figura 9). La síntesis del butirato genera energía de 1 a 2.5 kcal/kg, esta cantidad está sujeta al grado de fermentabilidad con el que cuenta la fibra (García-Peris y col. 2002).

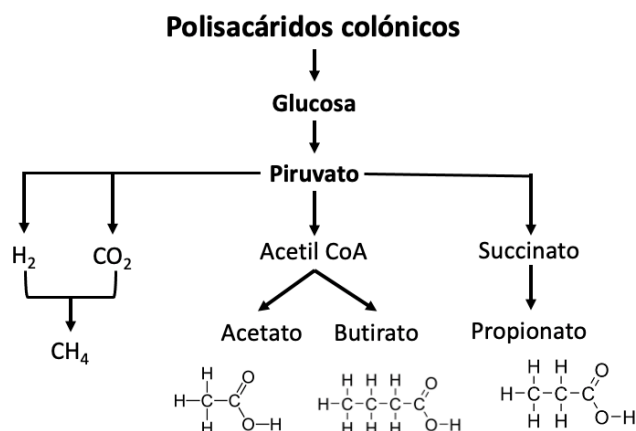


Figura 9. Fermentación bacteriana de la fibra en el colon (Imagen modificada de García Peris y col. 2002).

Los AGCC son utilizados metabólicamente hablando por el colonocito, en orden de ácido butírico, seguido del acético para finalizar en el propiónico (Manrique-Vergara y González-Sánchez, 2017).

De manera general la función de los AGCC es disminuir el pH intraluminal, promover la absorción del agua y el sodio, así como la de los cationes divalentes.

El ácido butírico tiene un efecto trófico, proporcionando energía, aumentando el flujo sanguíneo al colon, también aumenta la producción enzimática del páncreas, estimula el sistema nervioso, e interviene en la producción de enterohormonas implicadas en la proliferación celular (García-Peris, 2004). Por otro lado, también presenta efectos antiproliferativos asociados a la expresión de genes involucrados con la proliferación, apoptosis y diferenciación del colon. Entre estos genes se sabe que inhibe los protooncogenes ras, src y c-myc (Bravo y col., 2000).

Otro modo de acción de este AGCC es a través de la mediación de vías de señalización que involucran al NF-KB nuclear y la inhibición de histona desacetilasa. Es importante mencionar que NF-KB es clave en el control de expresión de genes que codifican para citosinas proinflamatorias, quimiocinas, enzimas inflamatorias, entre otras. Una respuesta exagerada de moléculas proinflamatorias puede causar enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades autoinmunes y promoción del cáncer (Bach-Knudsen, y col., 2018).

Por otro lado, interaccionando con esta fibra, se encuentran algunas biomoléculas conocidas como compuestos fenólicos (Ziegler y col., 2016). Es esta la razón, por la que se reconoce a este carbohidrato como fibra antioxidante. Los compuestos fenólicos que logran llegar al colon, son gracias a su interacción por puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y enlaces éster (Figura 10). Una vez que llega al colon esta fibra, los compuestos fenólicos son liberados y aprovechados (González-Aguilar y col., 2012).

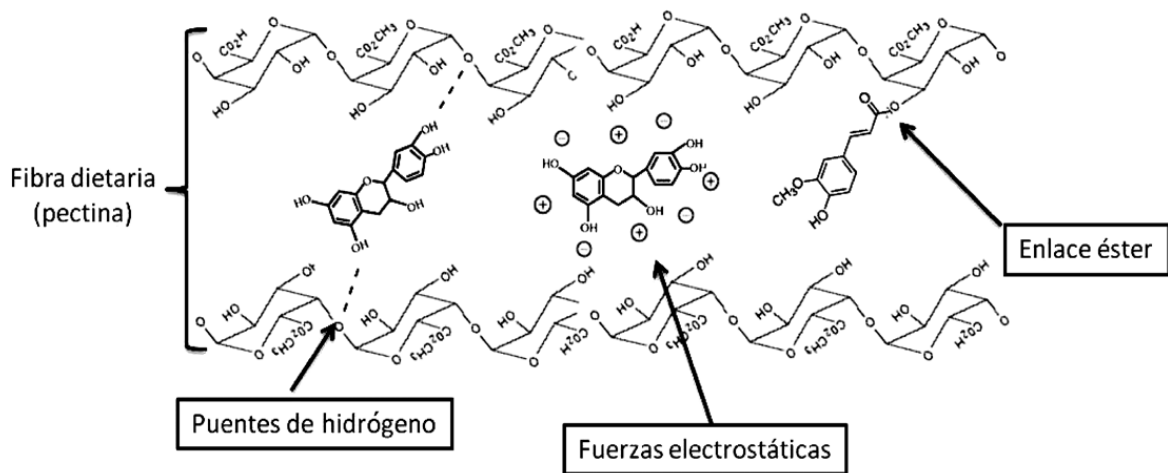


Figura 10. Interacciones de compuestos fenólicos con fibra dietaria.

1.5 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles son considerados los metabolitos secundarios de las plantas y pueden estar presentes ya sea dentro de la célula vegetal o su pared celular. Existen diferentes tipos de compuestos fenólicos, su diferencia radica en su composición química la cual está formada principalmente de un anillo benceno con grupos hidroxilos muchas veces unidos a residuos de azúcar. La estructura química de estos compuestos puede ir desde una molécula simple como los ácidos fenólicos, hasta estructuras mucho más complejas (Figura 11) como lo son los polifenoles (Pop y Diaconeasa, 2021).

Los polifenoles son los principales responsables de la pigmentación, otorgando los colores rojo, azul, violeta naranja y púrpura de la de las plantas y sus productos. Algunos son de gran importancia para las funciones fisiológicas vegetales y otros más son parte de situaciones de estrés o defensa de la propia planta que los genera (Quiñones, 2012).

Dentro de la clasificación de compuestos fenólicos encontramos 4 grupos principales: los flavonoides que componen la mayoría de los compuestos fenólicos totales, seguidos de los ácidos fenólicos y por último los estilbenos y lignanos (Samaneh y col., 2020).

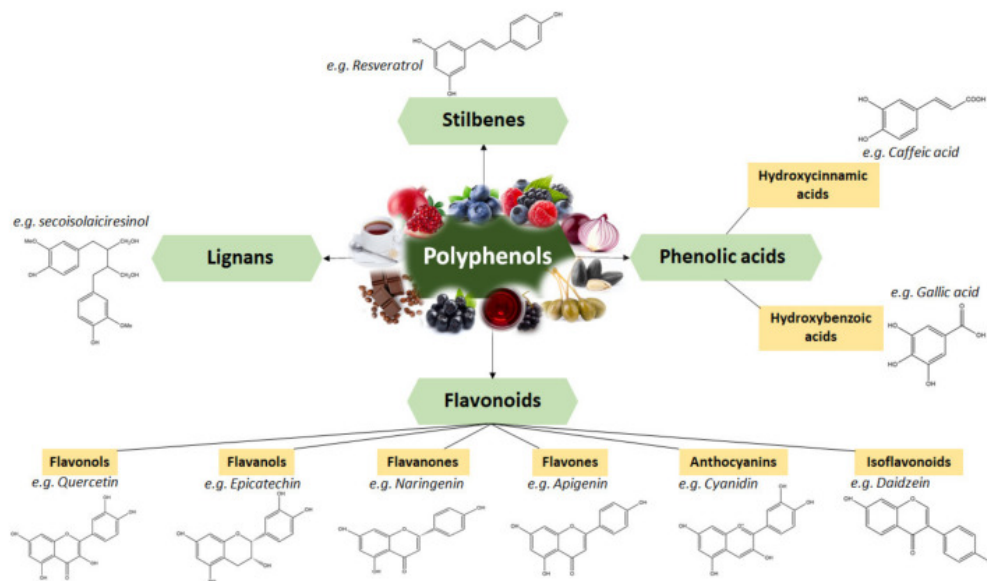


Figura 11. Estructura química y clasificación de polifenoles (Pop y Diaconeasa, 2021).

Los compuestos fenólicos sufren una serie de transformaciones y de interacciones por su paso en el sistema gastrointestinal. En la boca, una vez que el alimento es consumido entrará en contacto con las enzimas alfa amilasa en el proceso de masticación, ocasionando que se formen fragmentos más pequeños, entre los que componen compuestos fenólicos simples, glucosilados, fibra y glucosa libre. Es importante mencionar que la principal razón de que los compuestos fenólicos sean escasamente absorbidos es por su unión a los azúcares, es decir por sus uniones

β -glicosídicas. A causa de esto en el intestino delgado son absorbidos en muy bajo porcentaje, resistiendo a la actividad enzimática mediada principalmente por la lactasa florin hidrolasa (LPH) y la β -glucosidasa citosólica (CBG). Esta resistencia a la actividad de enzimas les permite llegar intactos al intestino grueso. La hidrólisis entonces ocurre en esta parte del sistema digestivo, siendo los principales responsables el microbiota presente en el intestino grueso (Chedea y col. 2018). Posteriormente, sufren nuevamente hidrólisis enzimática por enzimas producidas por la microbiota colónica, principalmente la β -glucuronidasa y la β -glucosidasa. Como resultado, la unión de los compuestos fenólicos a los azúcares se eliminará, permitiendo una absorción mayor (Manach y col., 2004). Los compuestos fenólicos una vez liberados, son metabolizados a AGCC hidroxilados durante el proceso fermentativo bacteriano. Estos metabolitos también han mostrado efectos anti-cáncer por diferentes mecanismos en células neoplásicas (Ernest y col., 2018). En el caso del ácido gálico se ha reportado un efecto apoptótico en células de cáncer de colon SW480 confirmado por la presencia de caspasa 3 y la disfunción de las mitocondrias (García-Gutiérrez y col., 2017).

1.6 Antioxidantes

Un radical libre es una especie química que consta de un electrón desapareado en su último nivel de energía, lo que provoca que sea altamente reactivo con moléculas cercanas. En los seres vivos, estos radicales libres derivan principalmente del oxígeno y el nitrógeno. Algunas especies reactivas son el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de acuerdo a estudios se ha comprobado que estos radicales son altamente tóxicos (Gutiérrez-Salinas, 2006). La principal fuente de radicales libres es la causa de la cadena respiratoria de las mitocondrias, pero también existe otras reacciones de óxido-reducción catalizados por algunas enzimas como NADPH reductasa, la xantino-oxidasa, el citocromo c-reductasa y las deshidrogenasas (Tonelli y col., 2018).

Normalmente la célula tiene mecanismos que controlan la producción y estabilización de estos radicales libres, sin embargo, cuando llega a existir un desequilibrio entre los radicales libres y los sistemas antioxidantes de la propia

célula se provoca un efecto conocido como estrés oxidativo. Durante este efecto se ven dañadas moléculas muy importantes para la funcionalidad de la célula, entre las que se encuentran las proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos y ácidos nucleicos. Estos daños son importantes y alteran a la célula de tal manera que pueden provocar la activación de la muerte celular programada, más conocida como apoptosis o bien por necrosis. Así como algunas enfermedades como artritis, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, esto por mencionar algunas patologías derivadas del estrés oxidativo (Zinovkin y col., 2019).

La célula tiene mecanismos que funcionan como sistemas antioxidantes y son constituidos por dos grupos de moléculas:

- a) Moléculas de alto peso molecular como las enzimas antioxidantes, dentro de las cuales se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el glutatión peroxidasa (GPX).
- b) Moléculas de bajo peso molecular como las vitaminas E y C, glutatión reducido (GSH), ácido úrico, carotenos y los compuestos fenólicos.
- c) Por último, el mecanismo de las moléculas de bajo peso molecular, es la de neutralizar “atrapando” las especies reactivas de oxígeno (Gutiérrez-Salinas y col., 2014).

Dentro del sistema antioxidante endógeno, la superóxido dismutasa (SOD) tiene dos variables, la Cu/Zn-SOD localizada en el citosol y Mn-SOD que se encuentra en la mitocondria, dicha enzima se activa en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y provoca la dismutación produciendo moléculas de oxígeno y agua. El mecanismo de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se encarga de los hidroperóxidos, los peróxidos orgánicos (ROOH) y provoca la reacción del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSH), el mecanismo de esta enzima es complementaria a la catalasa.

1.7 Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)

Un fruto rico en los fitoquímicos es el garambullo, perteneciente a la familia de las cactáceas columnares, es endémico de México y se puede encontrar en las regiones áridas y semiáridas del país, como lo es Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Hidalgo, entre otros (Guzmán-Maldonado y col., 2010). Hasta hoy se han reportado 4 especies que se distinguen por su forma, color y composición fitoquímica. La especie más abundante es la *Myrtillocactus geometrizans* (Figura 12). El fruto comestible tiene una forma globular con diámetros que van desde 1.5 cm y de colores que van desde el verde hasta un morado intenso, dependiendo de su estado de maduración (Hernández-López, 2008).



Figura 12. Fruto de *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo). Fotografía tomada por Maldonado-Cano

El consumo de este fruto puede ser de manera fresca, sin embargo, ya existen algunas presentaciones como lo son mermeladas, helados y dulces tradicionales, comúnmente desarrollados por personas de las propias comunidades donde se puede encontrar esta especie. Hoy en día algunos grupos de investigación se han interesado por estudiar y desarrollar productos a base de este fruto. Esto gracias a su importante contenido de fitoquímicos (Corzo-Ríos y col., 2016), llegando a

compararse con frutos más comercializados, volviendo más importante el estudio puntual de los efectos funcionales y nutricionales del garambullo.

De igual forma la industria alimentaria, se ha enfocado en el uso de esta fruta como colorante, esto por su contenido de betalaínas, el cual se tiene reportado hasta el momento que tiene entre 29.5 – 36.9 mg / 100 g de fruta (Herrera-Hernández y col., 2011).

El contenido nutrimental del garambullo incluye la presencia de minerales, carbohidratos, proteína y fibra, mismos que se muestran en la Tabla 1. Basándose en los datos, el contenido de los últimos 3 mencionados se ha reportado un mayor contenido en comparación con frutos más populares (Herrera-Hernández y col., 2011).

Tabla 1. Contenido de minerales, carbohidratos, proteínas y fibra en *Myrtillocactus geometrizans* (Herrera-Hernández y col., 2011).

Contenido	
Componente	g/kg
Potasio	19.4 - 23.3
Calcio	4.3 - 5.5
Magnesio	2.6 - 3.5
Hierro	3.7 - 4.1
Manganeso	5.4 - 6.9
Fosforo	1.54 - 1.9
Azufre	1.38 - 1.9
Zinc	0.96 - 1.28
Cobre	0.26 - 0.32
Componente	mg/kg
Carbohidratos	103.0 - 105.6
proteína	7.1 - 8.7
Fibra dietaria	34.9 - 36.9

Recientemente, Sánchez-Recillas y col. 2022 sometieron al garambullo a una simulación de la digestión y fermentación gastrointestinal *in vitro*, simulando las condiciones químicas y enzimáticas de boca, estómago, intestino delgado y colon. Dentro del extracto de intestino delgado obtuvieron 2 fracciones: la fracción digerible (FD) y fracción no digerible (FND) del fruto, en las cuales se identificaron y cuantificaron los metabolitos y compuestos bioactivos presentes en ambas fracciones. La Tabla 2 muestra las familias de compuestos bioactivos que fueron encontradas en la caracterización de la FND del garambullo y ejemplos de cada una.

Tabla 2. Cuantificación de compuestos bioactivos de la fracción no digerible (FND) (Sánchez-Recillas y col. 2022).

Familia	Componente	FND (µg/g)
Flavononas	Eritrosina	0.19
Flavonoles	Quercetina ramnosil-ramnosil-hexósido	52.71
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido hidroxibenzoico hexóxido isómero II	382.54
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido cafeico hexóxido	2.07
Betacianinas	Betanidina β-hexóxido	22.04
Betaxantinas	Prolina-Betaxantina	1.35

La fracción no digerible es sugerida por dichos autores como aquella que alcanza el colon y que pudiera entrar al proceso fermentativo propio de este tejido, generando metabolitos con potencial efecto benéfico en la salud.

Los compuestos bioactivos que componen el fruto de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) tienen efectos benéficos para la salud demostrado en otras matrices alimentarias. Sin embargo, se desconoce si los compuestos del garambullo que llegan al colon, así como los metabolitos generados a partir de ellos, pudieran ejercer algún efecto sobre células cancerosas, y su mecanismo de acción involucrado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiproliferativo y antioxidante del extracto de la fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) en células de cáncer de colon humano SW480.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad del extracto de la fermentación de garambullo sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon SW480.
- Estudiar el mecanismo de acción involucrado en el efecto del garambullo sobre la muerte celular en la línea celular SW480.
- Analizar el efecto del extracto de la fermentación de garambullo sobre el sistema antioxidante endógeno.

3. METODOLOGÍA

El desarrollo de dicho proyecto se realizó en el Centro de Investigación Biomédica Avanzada (CIBA) en la Facultad de Medicina campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro.

3.1 Simulación de los procesos de digestión y fermentación *in vitro*

La simulación de las condiciones fisiológicas se hizo de acuerdo al método diseñado por Campos Vega y col. (2015). Fueron incluidos sujetos sanos, es decir sin sobrepeso, sin historial de enfermedades gastrointestinales en los últimos 3 meses, además no consumir modificadores de la microbiota colónica como lo son los antibióticos y con una dentadura sana. Los participantes firmaron un consentimiento informado antes de participar en el estudio. Cada uno de los voluntarios masticaron las muestras de garambullo liofilizado por 15 segundos y para el blanco únicamente se recolectó la saliva con 5 ml de agua destilada (Todo esto se repitió 5 veces).

Para la fase del estómago se utilizaron 10 ml de solución de muestra y 10 ml de solución blanco (muestras independientes) y se le adicionó HCl 2N para ajustar el

pH a 2.0. Se añadió la solución de estómago, la cual consiste en 0.055g de pepsina disueltos en 0.95 ml de HCL 20 mM. Todo esto se incubó por 2 horas a 37 °C.

Para la etapa del intestino se preparó el fluido intestinal lo cual corresponde a 3 mg de hiel de buey y 2.6 mg de pancreatina disueltos en 5 ml de solución de Krebs-Ringer. Se mezclaron 10 ml de la etapa de estómago con 5 ml de la mezcla resultante del fluido intestinal y se adicionó 1 ml a un intestino de rata invertido (Ratas macho Wistar entre 250-300 g). Todo esto se dejó incubar por 15, 30 y 60 minutos a 37 °C. De estos procesos previos correspondientes a la digestión se obtuvo la fracción no digerible (FND) la cual se encontraba fuera del saco intestinal.

3.1.1 Fermentación colónica *in vitro*

Para este procedimiento se utilizó la FND tanto del garmbullo como de la muestra blanco. Se utilizó una muestra fecal de sujetos sanos, es decir que no llevaran una dieta vegetariana o vegana, que no hubieran consumido antibiótico en los últimos 3 meses, ni haber padecido alguna enfermedad gastrointestinal. Dichas muestras fecales se centrifugaron y se utilizaron para las muestras de la FND. A continuación se muestra una tabla de cómo fueron preparados cada una de las muestras:

Muestra	Proporción
FND de blanco	1 ml de líquido + 1 ml de inóculo fecal
FND de muestra	1 ml de solido + 1 ml de líquido + 1 ml de inóculo fecal
Rafinosa	100 mg

Cabe mencionar que la rafinosa, al ser una molécula altamente fermentable se utilizó para fines de control.

Todo lo mencionado se introdujo en un tubo de fermentación y se montó sobre una parrilla de fermentación, la cual permitió controlar las condiciones fisiológicas necesarias para dar paso a la fermentación colónica (Mezcla de gases H₂, CO₂ y N₂), a un pH inicial de 7.0 a 37 °C en agitación constante.

El pH fue medido a las 0, 6, 12 y 24 horas de la fermentación, las muestras se mezclaron en vortex por 1 minuto antes de cada toma de pH.

Finalmente se obtuvo el extracto fermentado de garambullo (EFG) utilizado en este proyecto, el cual se centrifugó y almacenó a -70°C cubiertos de la luz para los posteriores análisis.

3.1.2 Estudio experimental *in vitro*

Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma humano SW480, las cuales corresponden a una carcinogénesis colonorectal en estadio II B, con una mutación en guanina por adenina resultando en una mutación en p53. De igual manera presenta los oncogenes c-myc, k-ras, H-ras y N-ras, además la expresión del receptor EGFR (ATCC, 2020).

Para el mantenimiento de las células SW480 se utilizó medio Dulbeccos` s Modified Eagle Medium (DMEM) de la Marca Gibco, la preparación del medio se realizó de acuerdo a lo especificado en el protocolo del proveedor. Dicho medio se suplementó con suero fetal bovino (SFB) (Gibco Performance Plus) a una concentración del 10 %.

Para el mantenimiento de las células, se utilizó una incubadora (ThermoForma Modelo 310) a condiciones de 5 % de CO₂ a 37 °C.

Las células fueron sembradas en placas de 60 mm de la marca (Corning) con 6 ml de medio DMEM y SFB al 10 %. Cuando las células SW480 alcanzaban 80 % de confluencia, se realizaron los pases correspondientes a través de tripsinización.

3.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó por el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5 - dimetiltiazol -2-il)-2,5- difeniltetrazolio) el cual evalúa la actividad metabólica celular, el fundamento de esta técnica se basa en la reducción del colorante tetrazoilo por acción de las enzimas oxidoreductasas dependientes de NADPH, las cuales reflejan el número de células viables presentes. Los grupos experimentales se describen a continuación:

1. Control negativo. Células sin tratamiento con medio DMEM+SFB 2 %;

1. Blanco de fermentado, el cual fue sometido a las mismas condiciones de digestión y fermentado, pero sin la matriz de interés, es decir, el garambullo. Este blanco nos permite conocer el efecto que esta teniendo exclusivamente el garambullo, eliminando el posible efecto del vehículo.
2. Tratamiento con extracto de fermentado de garambullo a diferentes concentraciones, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 % diluido en medio DMEM+SFB2 %.

Brevemente, 10,000 células fueron sembradas por pozo, previamente contadas con ayuda del hemocitómetro, incubando por 24 horas con 5 % de CO₂ a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación se agregaron los tratamientos correspondientes y nuevamente se incubaron por 24 horas. Terminado el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante de la placa y se agregó MTT (200 µL por pozo), dejando incubar durante 1 h. Transcurrido el tiempo se retiró el reactivo y se agregó DMSO, mismo que disuelve los cristales de formazán formados. La reacción se midió a 540 nm en un lector de placa Elisa marca Thermo Scientific MULTISKA GO.

Se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones del extracto fermentado: 5, 10, 15, 20 y 25 %, de este modo se pudo determinar la IC₅₀ (Concentración inhibitoria del 50 % de la población celular) a partir de la ecuación de la recta. Para determinar el porcentaje de viabilidad se utilizó la siguiente ecuación.

$$\frac{DO \text{ de células tratadas}}{DO \text{ de células control}} \times 100$$

Para el IC₅₀ se usó la siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \frac{DO \text{ de células tratadas}}{DO \text{ de células control}} \times 100 = 50$$

3.3 Cuantificación de lactato deshidrogenasa

La IC₅₀ fue utilizada para la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa la cual se hizo de acuerdo al Kit Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche).

En una placa de 96 pozos se sembraron 10,000 células por pozo y se incubaron por 24 h. Pasado el tiempo se agregaron los tratamientos celulares correspondientes: control negativo (DMEM+SFB 2%), control positivo (Triton 1% en medio

DMEM+SFB 2 %), blanco de fermentado de garambullo al 10 %, tratamiento con extracto de fermentado de garambullo (IC₅₀= 15 %) y nuevamente se volvieron a incubar las células de la placa, ya con tratamientos descritos, por 24 horas. Posteriormente, se transfirieron 100 µL del sobrenadante de las muestras a una nueva placa de 96 pozos no estéril con 100 µL del reactivo LDH preparado de acuerdo a la proporción indicada en el inserto del kit, el cual se describe a continuación:

Tabla 3. Preparación de reactivo LDH

Reactivo	Cantidad
Catalizador (Bote 1, tapa azul)	250 µL para 100 reacciones
Solución tinte (Bote 2, tapa roja)	11.25 mL para 100 reacciones

La placa se leyó en lector de ELISA de la marca Thermo Scientific MULTISKA GO. a 492 nm a los 10 minutos para permitir la reacción de la enzima con los reactivos agregados.

El porcentaje de citotoxicidad se determinó con la siguiente ecuación:

$$\frac{Abs\ de\ muestra - Abs\ control\ negativo}{Abs\ Control\ positivo - Abs\ control\ negativo} \times 100$$

3.4 Glutación

El ensayo de glutatión se realizó con el kit Glutation Assay Kit (Sigma-Aldrich). En placas de 60 mm se sembraron 3x10⁶ de células en cada una, correspondientes a los tratamientos, control negativo (células con medio DMEM +SFB 2%), blanco de fermentado y la IC₅₀ del extracto fermentado de garambullo.

A las 24 horas se agregó el tratamiento, volviéndose a incubar otras 24 h. Al finalizar este tiempo de incubación se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS estéril y se rasparon las células las cuales fueron recolectadas en un tubo eppendorf. Se centrifugaron por 5 minutos a 600 x g, se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 veces el volumen del pellet del reactivo (Sulfosalicylic acid dihydrate) SSA al 5 %, se agitó en vortex hasta homogenizar y se sometió la muestra a -70 °C

hasta que se congelaran. Posteriormente, dichas muestras se descongelaron a baño maría y se repitió el proceso de congelación y descongelación con la finalidad de generar un choque térmico en la membrana de las células y permitir la entrada del ácido sulfosalicílico dihidratado. Culminado este proceso se tomó el sobrenadante para ser analizado como lo indica el proveedor.

Para obtener la reacción, en una placa de 96 pozos no estéril se agregaron 10 μL de la muestra obtenida, 200 μL de la solución de trabajo preparada de acuerdo a las indicaciones del inserto del kit y se realizó de acuerdo a la tabla indicada en el inserto del kit a continuación presentada.

Tabla 4. Tabla de preparación de soluciones para lactato deshidrogenasa

Número de plato	1	2	3	4	5
Concentración GSH (μM)	50	25	12.5	6.25	3.135
Solución GSH (μL)	50	25 del primer plato	25 del segundo plato	25 del tercer plato	25 del cuarto plato
SSA al 5 % (μL)	-	25	25	25	25
Número de moles GSH en 10 μL de muestra	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

Además, se preparó una curva de calibración para el análisis de los resultados. Las muestras se leyeron en un lector de placa ELISA a 412 nm en el tiempo 0 y 5 minutos.

Tabla 5. Preparación de curva de calibración para lactato deshidrogenasa.

	Volumen de la muestra	SSA 5 %	Solución de trabajo	NADPH (0.16 mg/ml)
Reagente de blanco	-	10 μL	150 μL	50 μL
Curva estándar	10 μL	-	150 μL	50 μL
Muestra	X μL	10-X	150 μL	50 μL

Los cálculos correspondientes se realizaron a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración y el número de moles de GSH en una muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{Abs/minuto (muestra) * dilución}{Abs/minuto(1 nmol) * volumen}$$

En donde:

Abs/min (muestra) = pendiente generada por la muestra (después de restar los valores generados por la reacción de los blancos).

Abs/ minuto (1nmol) = pendiente calculada a partir de la curva estándar para 1 nmol de GSH

Dilución = factor de dilución de la muestra original

Volumen = volumen de la muestra en la reacción en ml

3.5 Superóxido dismutasa

La cuantificación de superóxido dismutasa se realizó con el kit SOD Assay Kit de (SIGMA Life Science). Se sembraron 1×10^6 células en placas de 60 mm y se incubaron por 24 horas, se prepararon tratamientos para control negativo, células con extracto de fermentado de garambullo y blanco de fermentado. Pasado el tiempo de incubación se agregaron los tratamientos correspondientes y se procedió nuevamente a incubar por 24 horas. Culminado el tiempo se hizo un doble lavado de las células con 3 mL de PBS 1X frío con 500 μ L de buffer de lisis a un pH de 7.5, y se recuperaron las células por raspado en un tubo Eppendorf. Las muestras se sonicaron por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos, recuperando el sobrenadante.

Se prepararon las soluciones de trabajo de acuerdo a lo indicado en el inserto del kit y se agregaron en la siguiente proporción.

Tabla 6. Indicaciones para preparación de soluciones para superóxido dismutasa

	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Muestra	20 μ L	-	20 μ L	-
Agua bidestilada H ₂ O	-	20 μ L	-	20 μ L
Solución de trabajo	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
Solución de trabajo de enzima	20 μ L	20 μ L	-	-
Buffer de dilución	-	-	20 μ L	20 μ L

Una vez preparadas las muestras tal como se indica en la tabla 6 se incubaron por 20 minutos a 37 °C y finalmente se leyeron en un lector de ELISA a una absorbancia de 450 nm.

Para calcular la actividad de SOD (Porcentaje de inhibición) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{(Abs\ Blanco\ 1 - Abs\ Blanco\ 3) - (Abs\ muestra - Abs\ Blanco\ 2)}{(Abs\ Blanco\ 1 - Abs\ Blanco\ 3)} * 100$$

3.6 Ciclo celular

La determinación de las diferentes fases del ciclo celular se realizó mediante la técnica de citometría de flujo con Muse Cell Cycle Kit MCH100106 (Muse).

Se sembraron 1×10^6 de células en placas de 6 mm y se incubaron por 24 horas, se preparó para control negativo, tratamiento con extracto de fermentado de garambullo y blanco de fermentado. Pasadas las 24 horas se agregaron los tratamientos y se volvió a incubar por otras 24 horas. Al término de este tiempo, se recuperó el medio de las placas y se tripsinizaron las células adheridas a la placa, todo se recuperó en un tubo Falcón y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS para volverse a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se agregaron 200 μ L del reactivo de ciclo celular a las muestras y se incubaron por 30 minutos. Pasado el tiempo se leyeron en el citómetro de flujo, obteniéndose los histogramas correspondientes.

3.7 Apoptosis

El análisis de apoptosis se realizó mediante la técnica de citometría de flujo con el kit Muse Annexin V Et Dead Cell Kit MCH100105 (Muse).

Brevemente, se sembraron un millón de células en placas de 6 mm y se incubaron por 24 horas, se prepararán para control negativo, control positivo, tratamiento con extracto de fermentado de garambullo y blanco de fermentado. Pasadas las 24 horas se agregaron los tratamientos y se volvieron a incubar por otras 24 horas. Al termino de este tiempo, se recuperó el medio de las placas y se tripsinizaron las

células adheridas a la placa, todo se recuperó en un tubo Falcón y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. Finalmente se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS para volverse a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se agregaron 100 μ L del reactivo de anexina y 100 μ L de muestra y se incubaron por 20 minutos. Pasado el tiempo se leyeron en el citómetro de flujo, obteniéndose los diagramas correspondientes.

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo por Anova para el análisis de varianza y por el método Dunnett para la comparación de cada tratamiento contra el grupo control (células sin tratamiento) en el caso de los resultados paramétricos. Los datos menores a $p < 0.05$ % se consideraron como estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 9.2.0 (283), cada experimento se realizó por triplicado.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 El EFG disminuye la viabilidad celular en células SW480.

En la Figura 13 se muestra un efecto dosis-respuesta del EFG sobre la viabilidad de las células SW480. El EFG al 10% redujo un 30% la viabilidad celular y a la concentración de 30% redujo la viabilidad a un 82%, del mismo modo se obtuvo la IC_{50} al 15 % de la concentración de EFG.

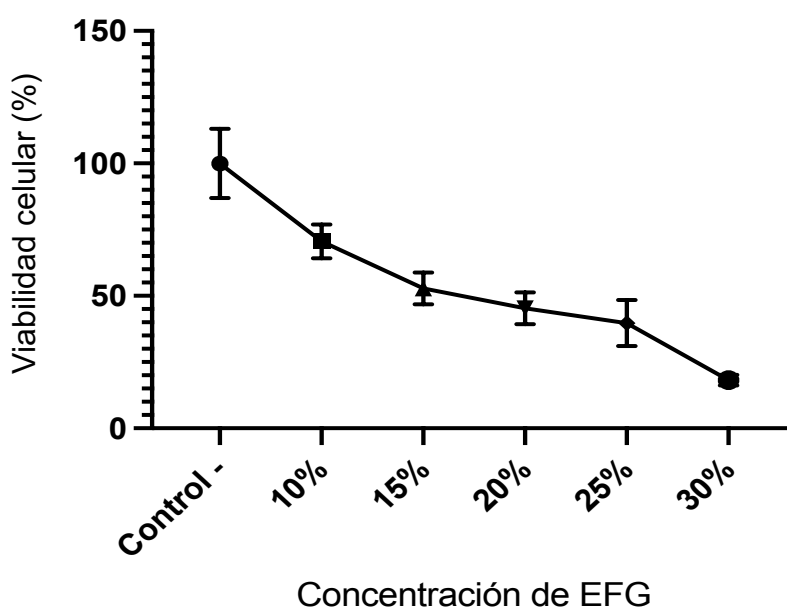


Figura 13. Efecto del extracto fermentado de garabullo (EFG) sobre la viabilidad de las células SW480 con MTT. La viabilidad celular está normalizada a 100% con respecto al control (células incubadas en ausencia de EFG) y representan la media \pm ES de tres experimentos independientes.

En otros estudios realizados en células SW480, se evaluó el extracto fermentado de una baya andina (*Vaccinium meridionale Swartz*), donde se encontró un efecto antiproliferativo y una IC_{50} del 19.32 % (Maldonado y col., 2018). El garabullo y esta baya andina comparten algunos fitoquímicos como ácidos fenólicos y flavonoides, lo que sugiere que dichos componentes pudieran estar participando activamente en la disminución de la viabilidad celular.

4.2 El EFG induce muerte celular por necrosis en células SW480

El análisis de LDH permite reconocer la citotoxicidad de un compuesto por medio de la cuantificación de lactato deshidrogenasa liberada al medio, sugiriendo que la célula sufrió un daño en la integridad de su membrana, lo que está asociado al proceso de necrosis (Kabakov y col., 2018). Para este ensayo se usó la concentración de 15% de EFG, correspondiente a la IC₅₀ determinada en el ensayo de viabilidad celular.

Las células SW480 exhibieron 33 % de necrosis (Figura 14) con el EFG en comparación con el control positivo (células tratadas con triton al 1 %). Los resultados obtenidos sugieren que uno de los mecanismos moleculares envueltos en el efecto antiproliferativo del EFG sobre la línea celular a través de la inducción de la necrosis.

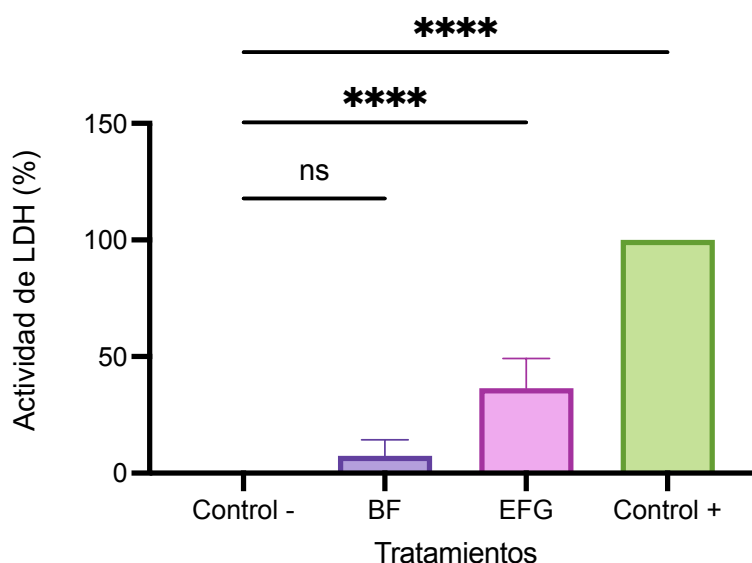


Figura 14. Estimación de necrosis por actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en las células SW480. Las células SW480 fueron tratadas con 15% de extracto fermentado de garmbullo (EFG). Los resultados están expresados de acuerdo al porcentaje obtenido de lactato deshidrogenasa con respecto al control negativo (células incubadas en ausencia de EFG). Se utilizó como control positivo (control +): Triton X 100 (1%), BF (blanco de fermentado). Los datos se presentan como la media \pm ES de tres experimentos independientes, *** $p < 0.05$.

En un estudio realizado en células de cáncer de colon HT-29 tratadas con un extracto del fruto *Brucea javanica*, se reportó un 30 % de muerte celular por necrosis a una concentración de 25 µg/ml (Bagheri y col., 2018). El *Myrtillocactus geometrizans* también comparte fitoquímicos como la quercetina, en su composición con dicho fruto, por lo que se infiere que el garambullo podría tener efectos similares sobre la inducción de muerte celular por necrosis.

4.3 El EFG induce apoptosis en células de cáncer de colon humano SW480.

La apoptosis se define como una muerte celular programada por la célula. Uno de los métodos para cuantificar la apoptosis en células es a través de citometría de flujo y Anexina V, esta última al ser una molécula que se une específicamente a la molécula fosfatidilserina, permite la identificación de apoptosis. En el presente estudio se cuantificó la apoptosis inducida por el extracto fermentado de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) en células SW480.

Para este ensayo se utilizó la IC₅₀ determinada en el ensayo de viabilidad celular (15 % de EFG). Los resultados mostraron apoptosis en un 44 % de la población celular (Figura 15) en células tratadas con EFG, respecto al control (Células sin EFG). De acuerdo al análisis estadístico (Figura 16), hay una diferencia significativa de $p = 0.027$ entre la apoptosis detectada en células tratadas con EFG y el control. Los resultados sugieren inducción de apoptosis por parte del EFG en células de cáncer de colon SW480. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la cuantificación de lactato deshidrogenasa, la cual nos indica una muerte por necrosis, se sugiere que el fruto de garambullo está induciendo ambas muertes.

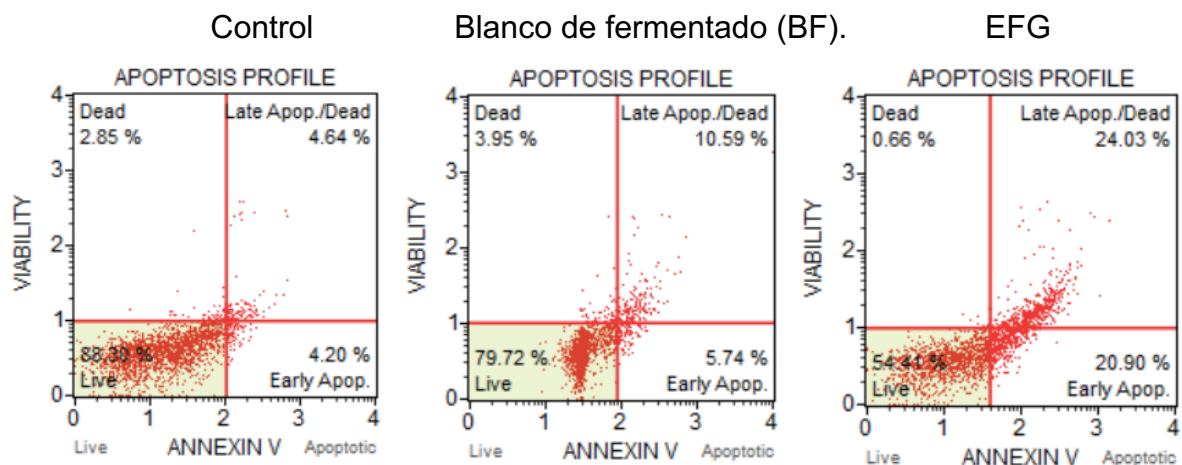


Figura 15. Efecto del EFG sobre muerte celular en células SW480. En el cuadrante inferior izquierdo, se muestran las células viables (Control 88.3 %, BF 79.72 %, EFG 54.41 %), en el cuadrante inferior derecho las células en apoptosis temprana (Control 4.2 %, BF 5.74 %, EFG 20.9 %), cuadrante superior derecho las células en apoptosis tardía (control 4.64 %, BF 10.59 %, EFG 24.03 %) y en el cuadrante superior izquierdo se muestran las células necrosadas (control 2.85 %, BF 3.95 %, EFG 0.66 %). Los tratamientos son: control (Células sin tratamiento), blanco de fermentado (BF) y extracto fermentado de garambullo (EFG).

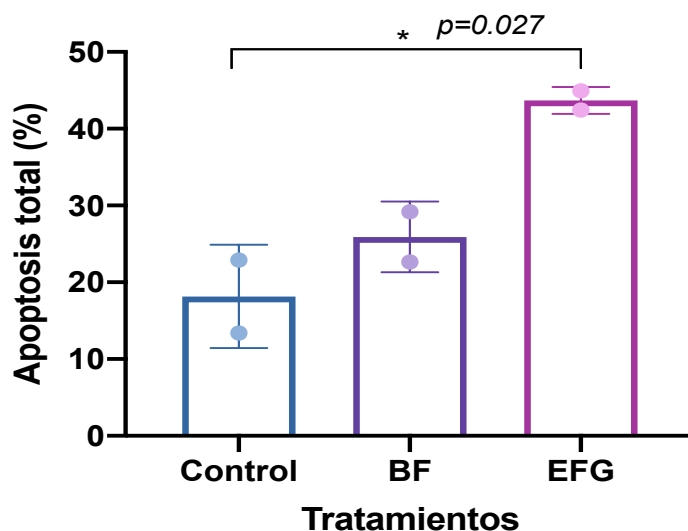


Figura 16. Efecto del EFG sobre la apoptosis. Los resultados están expresados de acuerdo al porcentaje de células totales detectadas por el citómetro de flujo. Se representan la media \pm ES de al menos dos experimentos independientes. *Representa significancia estadística ($p < 0.05$).

En un estudio realizado por Rao y col., (2019) se evaluó la inducción de apoptosis en células SW480 expuestas a extractos fenólicos de cereales, entre ellos el arroz morado, dando como resultado un 23.9 % de apoptosis. Dichos autores demostraron que el efecto no fue a través de las caspasas 3 y 7, por lo que sugieren un efecto sobre el ciclo celular de las células de cáncer de colon.

Por otro lado investigadores (Shi y col., 2021) determinaron la apoptosis inducida por naringenina en células de cáncer de colon A549, reportándose un 29.4 % de apoptosis con una IC_{50} de 8.4 %. En dicho estudio los autores midieron la caspasa 3 y reportaron un aumento significativo de esta biomolécula en las células tratadas con naringenina. Sugiriendo entonces un efecto a través de caspasa 3.

4.4 El extracto fermentado de garambullo induce arresto en el ciclo celular en la fase G2/M en células SW480.

Se sabe que una de las primeras capacidades que una célula cancerígena adquiere es la de proliferar excesivamente, sin embargo, para que la multiplicación celular se lleve a cabo, la célula debe pasar por un ciclo orquestado por distintas biomoléculas que hacen posible el paso de una fase a otra (Li C y col., 2017). Para el estudio del efecto del EFG en el ciclo celular de células SW480 se utilizó la metodología por citometría de flujo con yoduro de propidio. Nuevamente se comenzó usando la IC_{50} determinada en el ensayo de viabilidad celular del presente estudio. Obteniéndose como resultado un aumento de la población celular en las fases G2/M (Figura 17) de células tratadas con el EFG en comparación con las células control (Células sin tratamiento). De acuerdo al análisis estadístico, las diferencias entre las células tratadas con el EFG y el control existe una diferencia estadísticamente significativa (Figura 18). Lo que sugiere que el efecto del EFG sobre los mecanismos involucrados en el arresto de las últimas fases del ciclo celular (G2/M).

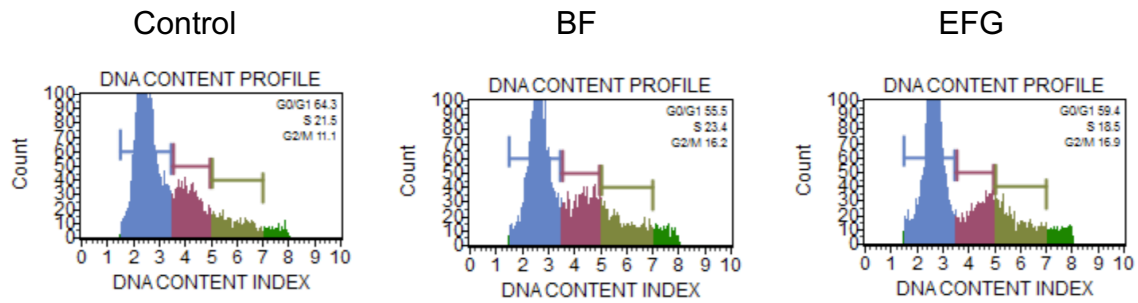


Figura 17. Efecto del EFG en células SW480 mostrado en histogramas; control (Células sin tratamiento), BF y EFG.

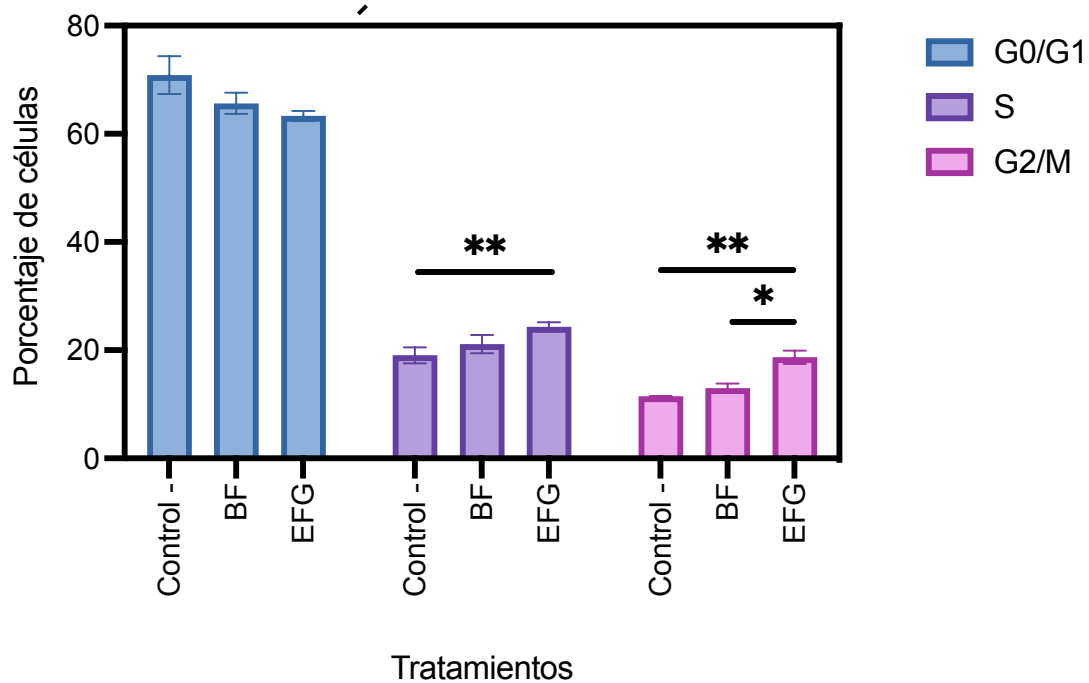


Figura 18. Efecto del EFG sobre las fases del ciclo celular. Los resultados están expresados de acuerdo al porcentaje obtenido de células en fase G0/G1, S y G2/M con BF y EFG con respecto al control negativo (Células incubadas en ausencia de EFG). Se representan la media \pm ES de al menos dos experimentos independientes. *Representa significancia estadística ($p < 0.05$).

En un estudio realizado sobre células SW480 con un extracto fermentado de granos de café se reportó un efecto de arresto en las fases G0/G1 y G2/M (García y col., 2017). En otro estudio realizado por Narayan y col., (2002) en células de cáncer de colon HCT-116 con curcumina se observó un arresto en la fase G2/M del ciclo

celular. Los autores además encontraron una afectación a la vía Wnt sugiriendo el efecto a través de esta vía molecular.

Aunque se sabe que una gran cantidad de polifenoles son capaces de llegar al colon por efecto de la fibra dietaria, se desconocen los efectos que las biomoléculas del garambullo pudieran ejercer sobre este órgano. Hasta el momento se sabe que algunas biomoléculas tienen su efecto en varios reguladores importantes del ciclo celular como lo son la ciclina D1, cdk4, cdk6, p53, p21 y p27 (Langer y col., 2013). Aunado a esto, los resultados que se obtuvieron de la cuantificación de lactato deshidrogenasa y apoptosis sugieren no solo un efecto sobre el arresto del ciclo celular por parte del extracto fermentado de garambullo, sino un efecto directamente sobre estos dos tipos de muertes celulares (necrosis y apoptosis) sugiriendo la regulación directa sobre las moléculas involucradas.

La necroptosis es un tipo de muerte celular programada que resulta de un proceso híbrido de la apoptosis y necrosis. Este tipo de muerte se desencadena por la activación a través de ligando como el factor de necrosis tumoral (TNF) desencadenando señales que permitirán la formación de un complejo apoptótico citosólico. En un estudio realizado por Karunagaran y col., (2022), se reportó 30 % de necrosis y por apoptosis no hubo diferencias significativas, en células de cáncer de cuello uterino tratadas con una molécula conocida como RETRA (Reactividad de la actividad del reportero transcripcional), comprobándose a través del análisis de moléculas como RIPK1, RIPK3 y MLKL que se trata de necroptosis, ya que estas moléculas son las activadoras maestras de dicha muerte celular. Además, los autores encontraron arresto en el ciclo celular específicamente en la fase S con la regulación positiva de p21 y negativa de ciclina D3. En el presente estudio, se recomienda realizar estudios que permitan detectar con más precisión las moléculas involucradas en la actividad del extracto sobre el ciclo celular.

Sistema antioxidante endógeno

4.5 El glutatión reducido se vio disminuido por el extracto fermentado de garambullo (EFG) en células de cáncer de colon SW480.

El ensayo GSH permite cuantificar el glutatión reducido de una manera sensible y precisa (Rahman y col., 2006). El GSH juega un papel muy importante en la protección de la célula contra el estrés oxidativo, esto le otorga una importante función fisiopatológica (Uhlig y Wende, 1992). En células tumorales el GSH se encuentra en niveles elevados (Bansal, 2018). En personas con cáncer de colon encontrar una alta cantidad de esta molécula ha sido asociada con la agresividad del cáncer (Barranco C y col., 2000).

Los resultados del presente estudio respecto a la cuantificación de GSH muestran una disminución estadísticamente significativa (Figura 19) obteniéndose 11 nmoles de GSH en las células tratadas con EFG contra el control, el cual presentó 22 nmoles de GSH.

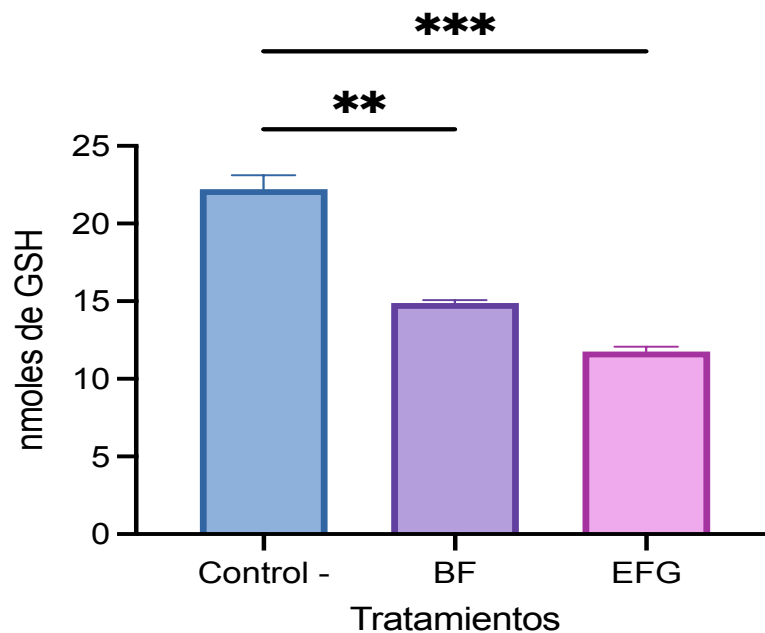


Figura 19. Cuantificación de glutatión reducido. Los resultados están expresados en nmoles de GSH con respecto al control negativo (Células incubadas en ausencia de EFG). Se representan la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. * Representa significancia estadística $p < 0.05$.

En un estudio realizado en células SW480 se evaluó el efecto de un extracto de la baya andina (*Vaccinium meridionale* Swartz) reportándose una disminución del tiorbato a una concentración del 30 % de la baya (Maldonado y col., 2018).

Algunos estudios *in vivo* han reportado disminución de glutatión por efecto de compuestos fenólicos como la quercetina. Los autores indujeron cáncer de colon en ratones observando que, en el tratamiento con este flavonoide, en comparación con el grupo control, la cantidad de GSH era considerablemente diferente, encontrándose una reducción de GSH hasta un 50 %. Por lo tanto, estos datos demuestran que la quercetina puede ayudar a reducir el estrés oxidativo provocado por el metabolismo de la propia célula cancerígena, concluyendo un mecanismo subyacente a un efecto antitumoral (Lin-Rui y col. 2020). Recientemente, Herrera-Lozano y col. (2022) mostraron que la naringenina inhibe el GSH en células de cáncer de colon HT-29 con respecto al control, sugiriendo que GSH está participando en el efecto antioxidante del flavonoide a través de procesos de óxido-reducción de la molécula de GSH y sensibilizando a la célula cancerosa. La disminución de GSH podría ser una importante estrategia para desequilibrar las especies reactivas de oxígeno, reduciendo así el crecimiento tumoral (Ortega y col. 2011).

4.6 El extracto fermentado de garambullo no ejerce un efecto sobre la enzima superóxido dismutasa en células SW480.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una importante biomolécula para el sistema antioxidante endógeno. En el presente estudio se cuantificó la enzima SOD por medio del kit SOD Assay Kit de la marca SIGMA Life Science.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa una disminución de superóxido dismutasa (Figura 20) en células de cáncer de colon humano SW480 en comparación con el control (Células sin tratamiento). Sin embargo, los resultados no son estadísticamente significativos, lo cual nos permite sugerir que en el caso del *Myrtillocactus geometrizans*, su mecanismo de acción no es modificando la actividad de dicha enzima.

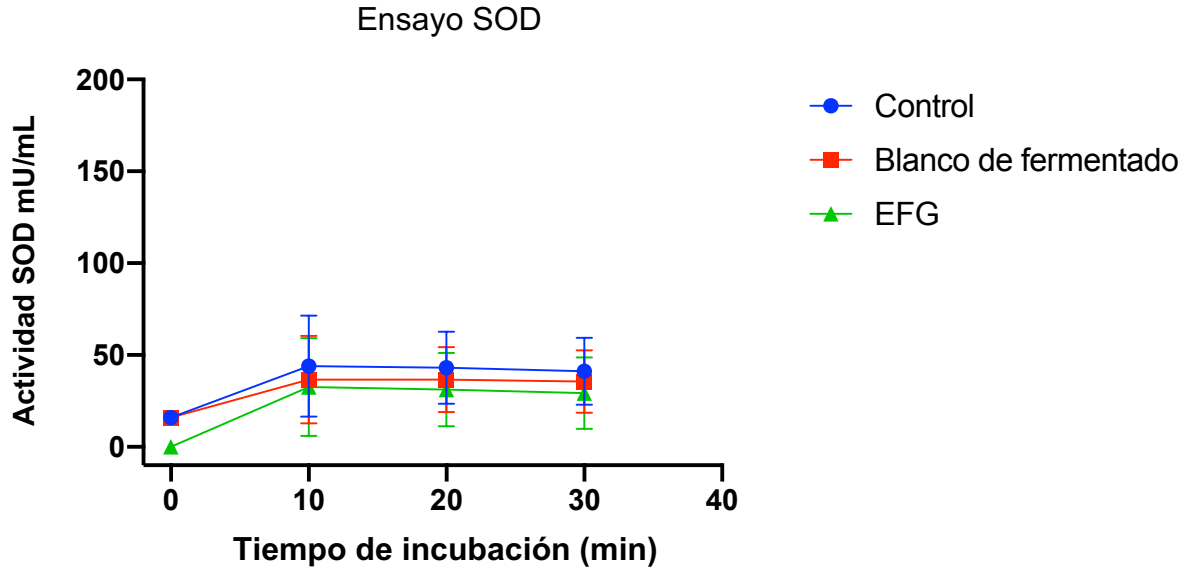


Figura 20. Efecto del EFG sobre la enzima superóxido dismutasa (SOD). Los resultados están expresados de acuerdo al porcentaje de SOD en mU/mL. Se representan la media \pm ES de al menos dos experimentos independientes. *Representa significancia estadística ($p < 0.05$).

Estos resultados muestran diferencia a lo reportado por otros autores. En el estudio realizado (Cianciosi y col., 2022) se analizó el efecto de la miel de Manuka sobre las enzimas antioxidantes en las células de cáncer de colon humano HCT-116. En dicho estudio se reportó que los fitoquímicos que componen a la miel indujeron fuertemente el estrés oxidativo en las células aumentando la acumulación de especies reactivas de oxígeno, incrementando de esta manera el daño a proteínas, lípidos y DNA. A razón de esto se analizaron algunos genes encontrándose la supresión de las enzimas antioxidantes dependientes del gen Nrf2 y la actividad de superóxido dismutasa. Si bien, en el estudio realizado en el presente documento no se observa una diferencia significativa, es importante señalar que la acción podría estar suprimiendo genes de enzimas antioxidantes, tal como lo encontraron en sus estudios los autores anteriormente revisados. Cabe señalar que si bien la miel de Manuka no es similar al garambullo en composición nutricional, nutracéuticamente comparten algunos fitoquímicos.

La enzima superóxido dismutasa es una proteína que cataliza reacciones involucradas con la disminución de superóxido, es precisamente esta acción lo que la vuelve tan importante en el sistema antioxidante endógeno de la célula.

Para poder sugerir un mecanismo de acción se sugiere realizar más estudios entorno al sistema antioxidante endógeno.

5. CONCLUSIÓN

El presente estudio muestra que el extracto fermentado de garambullo disminuye la viabilidad celular en células de cáncer de colon humano, a través del arresto al ciclo celular en la fase G2/M, conduciendo a muerte por necrosis y apoptosis, sugiriéndose por tanto la muerte celular a través de la necroptosis.

Por otro lado, el efecto antioxidante observado a través de la disminución del glutatión reducido, sugiere que el EFG favorece la utilización del mismo como defensa antioxidante endógeno de la célula. Sin embargo, el EFG no modifica la actividad de la enzima superóxido dismutasa, por lo que otras enzimas no cuantificadas en el presente estudio pudieran estar involucradas en la inducción del sistema antioxidante endógeno, además de GSH, por parte del EFG. Es importante continuar con el estudio más profundo de los mecanismos moleculares del fruto, para poder elucidar y proponer mecanismos de acción en concreto, y continuar dándole valor agregado al consumo del garambullo.

6. REFERENCIAS

Afrin, S., Giampieri, F., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T. Y., Cianciosi, D., Reboledo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Quiles, J. L., & Battino, M., (2018). The inhibitory effect of Manuka honey on human colon cancer HCT-116 and LoVo cell growth. Part 2: Induction of oxidative stress, alteration of mitochondrial respiration and glycolysis, and suppression of metastatic ability. *Food & function*, 9(4), 2158–2170. <https://doi.org/10.1039/c8fo00165k>

Agudelo, D., Luzardo, I., Campos, R., Loarca, G., Maldonado, M. (2018). Bioaccessibility during In Vitro Digestion and Antiproliferative Effect of Bioactive

Compounds from Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) Juice. *J Agric Food Chem.* 66(28):7358-7366. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01604.

American Joint Committee on Cancer. (2017). In: *AJCC Cancer Staging Manual.* 8, 471.

Arango, S., Luzardo, I., Reyes, C., Yahia, E., Maldonado, M. (2021). Antiproliferative potential of Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice in combination with Aspirin in human SW480 colon adenocarcinoma cells. *J Food Biochem.* 45, 137-160. doi: 10.1111/jfbc.13760.

Asociación Castellana de Aparato Digestivo. (2021). Foco de criptas aberrantes: la semilla del cáncer de colon. [Internet] 2021. [Citado 2021 nov 15] Disponible en: <https://www.acad.es/foco-de-criptas-aberrantes-la-semilla-del-cancer-de-colon/>

Bagheri, E., Hajiaghaalipour, F., Nyamathulla, S., Salehen, N. (2018). The apoptotic effects of *Brucea javanica* fruit extract against HT29 cells associated with p53 upregulation and inhibition of NF- κ B translocation. *Drug Des Devel Ther.* 29, 657-671. doi: 10.2147/DDDT.S155115.

Barrera, F., Reynoso, C., Mejía, E. (1998). Stability of betalains extracted from garambullo. *Food Science and Technology International.* 4, 115–120.

Belitz, H. D., & Grosch, W. (2009). *Química de los Alimentos.*

Bansal, A., Celeste, S., (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology.* 217(7), 2291–2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>

Barranco, S., Perry, R., Durm, E., Quraishi, M., Werner, A., Gregorcyk, G., Kolm P. (2000). Relationship between colorectal cancer glutathione levels and patient survival: early results. *Dis Colon Rectum.* 43(8), 1133-40. doi: 10.1007/BF02236562.

Boateng, J., Verghese, M., (2012). Protective Effects of the Phenolic Extracts of Fruits against Oxidative Stress in Human Lung Cells. *International Journal of Pharmacology*, 8:152-160. DOI 10.3923/ijp.2012.152.160

Bravo, A., Afonso, J., Medina, V., Pérez, J., Lorenzo, N., Fernández, M., González, F. (2000). Butirato y carcinogénesis colorrectal.1, 1-18

Campos, R., Reynoso, R., Pedraza, G., Acosta, J. A., Guzman, S., Paredes-, O., Loarca, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>.

Campos, R., Vázquez, K., López, D., Loarca, G., Mendoza, S., Oomah, B. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food*

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. (2000). *Nat Med.* 6, 389-95. doi: 10.1038/74651.

Cappell, M. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America.* 37, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>

Chedea, V., Palade, L., Marin, D., Pelmus, R., Habeanu, M., Rotar, M., Gras, M., Pistol, G., Taranu, I. (2018). Intestinal Absorption and Antioxidant Activity of Grape Pomace Polyphenols. *Nutrients.* 10, 588. doi: 10.3390/nu10050588.

Coates, E., Popa, G., Gill, C., McCann, M., McDougall, G., Stewart, D., Rowland I. (2007). Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *J Carcinog.* 18, 4-6. doi: 10.1186/1477-3163-6-4.

Corona, M., Mercado, S., Ramírez, L. (2007). Efecto del 1-mcp sobre el comportamiento fisiológico Postcosecha de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. DIPA.

Corzo, L., Bautista, M., Gómez, Y., Torres, L. (2017). Frutas de cactáceas: Compuestos bioactivos y sus propiedades nutraceuticas. *Propiedades funcionales de hoy*. 1, 38-49. doi: 10.3926/oms.361

Cruz, D. (2004). Genética molecular del cáncer colorrectal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 96(1), 48-59.

Cienciosi D., Tamara Y. Forbes H., Regolo L., Alvarez S., Quinzi D., Sargenti Z., Bai W., Tian L., Giampieri F., Battino M. (2022). Manuka honey in combination with 5-Fluorouracil decreases physical parameters of colonspheres enriched with cancer stem-like cells and reduces their resistance to apoptosis., *Food Chemistry*. 374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131753>.

Decker, A. (1997). Phenolics: Prooxidants or Antioxidants?. *Nutrition Reviews*.11, 396-398. <https://doi.org/10.1111/j.17534887.1997.tb01580.x>

Diccionario de cáncer del NCI. (2020). Instituto Nacional del Cáncer. [Internet] 2020. [Citado 2020 oct 03] Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cripta-del-colon>

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82, 47-95.

Dunn, G., Bruce, A., Ikeda, H., Old, L., Schreiber, R. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3(11), 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991.

Ernest, U., Chen, H., Xu, M., Taghipour, Y., Asad, M., Rahimi, R., Murtaza, G. (2018). Anti-Cancerous Potential of Polyphenol-Loaded Polymeric Nanotherapeutics. *Molecules*. 11, 2723-2787. doi: 10.3390/molecules23112787

Escudero, E., González, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*. 21, 61-72.

Féliz, A., Pérez, L., Guerra, R. (2019). Caracterización física y bioquímica de frutos de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) 8vo Congreso internacional de investigación en ciencias básicas y agronómicas. Instituto Politécnico Nacional.

Fouad, Y., Aanei, C. (2017). Revisando las señas de identidad del cáncer. *Revista estadounidense de investigación del cáncer*. 7(5), 1016–1036.

García, N., Maldonado, M., Rojas, M., Loarca, G., Campos, R. (2017). The fermented non-digestible fraction of spent coffee grounds induces apoptosis in human colon cancer cells (SW480). *Journal of Functional Foods*. 30, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.014>

García, P., Bretón, L., Compes, C., Camblor, M. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. 17, 11-16.

García, P. (2004) La fibra en la alimentación, ámbito hospitalario. Edikamed S.L. 1, 1-12.

Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos, Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*. 23, 80-84.

González, G., Quirós, A., Palafox, H., Robles, R. (2012). Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: Capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 13,3-11.

Gutiérrez, J., Mondragón, P., García, L., Hernández, S., Ramírez, S., Núñez, N. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista Española Med Quir*. 19, 446-454.

Gutiérrez J. (2006). ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres?. *Rev Mex Cien Farm*. 37, 69-73.

Guzmán, S., Herrera, G., Hernández, D., Reynoso, R., Guzmán, A., Vaillant, F., Brat, P. (2010) Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilized fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry*. 121, 381–386. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.039.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hernández, D., Vaillant, F., Reynoso, R., Guzmán, S. (2008). *Myrtillocactus* (cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits*. 63, 269-276.

Herrera, M., Guevara, F., Reynoso, R., Guzmán, S. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 129, 1744–1750.

Hernández, A., Nuñez, P., Rosales, M., Vázquez, C. (2012). La vía de señalización Wnt-beta-catenina y su relación con el cáncer. *Cir Cir*. 80, 389-398

Hertog, M., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Pekkarinen, M. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of internal medicine*. 155, 381-386.

Inan, M., Rasoulpour, R., Yin, L., Hubbard, A., Rosenberg, D., Giardina, C. (2000). The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kB activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 118, 724-734.

Instituto Nacional de Salud Pública. Cáncer de colon y recto. [Internet] 2020. [Citado 2020 oct 14] Disponible en: <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>

Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer de colon (PDQ) Versión para pacientes. [Internet] 2021. [Citado 2021 oct 20] Disponible en:

https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq#_93

International Agency for Research on Cancer. Cancer today. [Internet] 2020. [Citado 2020 oct 22]. Disponible en: www.who.int. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>.

Kabakov, A. E., & Gabai, V. L. (2018). Cell Death and Survival Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1709, 107–127. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9

Knudsen, K., Lærke, H., Hedemann, M., Nielsen, T., Ingerslev, A., Gundelund, Nielsen, D., Theil, P., Purup, S., Hald, S., Schioldan, A., Marco, M., Gregersen, S., Hermansen, K. (2018). Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier. Function and Inflammation. *Nutrients*. 10, 1499. doi:10.3390/nu10101499

Langner, E., Nunes, F., Pozarowski, P., Kandefer, M., Pierzynowski, S., Rzeski, W. (2013). Melanoidins isolated from heated potato fiber (Potex) affect human colon cancer cells growth via modulation of cell cycle and proliferation regulatory proteins. *Food and Chemical Toxicology*. 57, 246–255. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.042>.

Li C. J. (2017). Flow Cytometry Analysis of Cell Cycle and Specific Cell Synchronization with Butyrate. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1524, 149–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6603-5_9

Lin, R., Piao, M., Song, Y., Liu, C. (2020). Quercetin Suppresses AOM/DSS-Induced Colon Carcinogenesis through Its Anti-Inflammation Effects in Mice. *J Immunol Res*. 21, 924-926. doi: 10.1155/2020/9242601.

Liu, P., Wang, Y., Yang, G., Zhang, Q., Meng, L., Xin, Y., Jiang, X. (2021). The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. *Pharmacol Res*. 165:105420. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105420.

Long C. (2004) Lo esencial en el aparato digestivo. Elsevier España. 2, 12-27

Lopez, J., Tait, S. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 112(6), 957-962. doi: 10.1038/bjc.2015.85.

Malaterre, C. (2007). Organicismo y reduccionismo en la investigación del cáncer: hacia un enfoque sistémico. *Estudios Internacionales en Filosofía de la Ciencia*. 21, 57–73.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 79, 727-747.

Manrique, D., González, M. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición hospitalaria*, 34, 4-6.

Mariel, E. (2018). Anatomía y fisiología Humana. Pearson Educación. Edición 9

Martínez, I., Periago, M., Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 50, 5-18.

Mataix, J., Carazo, E. (1995). Nutrición para educadores. 2, 1-653

Miller, N., Rice, C., Davies, M., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*. 84, 407-412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>

Mohanty, S., Yadav, P., Lakshminarayanan, H., Sharma, P., Vivekanandhan, A., & Karunakaran, D. (2022). RETRA induces necroptosis in cervical cancer cells through RIPK1, RIPK3, MLKL and increased ROS production. *European journal of pharmacology*, 920, 174-840. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174840>

Narayan, S., Gupta, N., Marlow, B., Jaiswall, A. (2002). B-Catenin-mediated transactivation and cell–cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*. 5, 8414-8427. doi: 10.1038/sj.onc.1205947

National Human Genome Research Institute. Oncogén. [Internet] 2020. [Citado 2020 oct 20] Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Oncogen>

Sabbah, D., Hajjo, R., Sweidan, K., (2020). Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 20, 815-834. doi: 10.2174/1568026620666200303123102.

Samaneh Soleymani, Solomon Habtemariam, Roja Rahimi, Seyed Mohammad Nabavi. (2020). The what and who of dietary lignans in human health: Special focus on prooxidant and antioxidant effects. *Trends in Food Science & Technology*. 106, 382-390. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.015>.

Sánchez, E., Campos, R., Pérez, I., Luzardo, I., Cuellar, M., Vergara, H. (2022) Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*): effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of phytochemicals. *Royal Society of Chemistry*. 13(8), 4699-4713 doi: 10.1039/d1fo04392g

Shi, X., Luo, X., Chen, T., Guo, W., Liang, C., Tang, S., & Mo, J. (2021). Naringenin inhibits migration, invasion, induces apoptosis in human lung cancer cells and arrests tumour progression in vitro. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(5), 2563–2571. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16226>

Steeg, P. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 12(8), 895-904. doi: 10.1038/nm1469.

Ocvirk, S., Wilson, A. S., Appolonia, C. N., Thomas, T. K., & O'Keefe, S. (2019). Fiber, Fat, and Colorectal Cancer: New Insight into Modifiable Dietary Risk

Factors. *Current gastroenterology reports*, 21, 62.
<https://doi.org/10.1007/s11894-019-0725-2>

Ortega, A., Mena, S., Estrela, J. (2011). Glutathione in cancer cell death. *Cancers*. 3(1), 1285–1310. <https://doi.org/10.3390/cancers3011285>

Pérez, S. (1999). Ecologic and potential uses of garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) that sustain its domestication and agronomic management. *Food Chemistry*. 1, 31–35

Phan, C. Tso, P. (2001) Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci*. 6: 299-319.

Pop, T. D., & Diaconeasa, Z. (2021). Recent Advances in Phenolic Metabolites and Skin Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22, 9707. <https://doi.org/10.3390/ijms22189707>

Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*. 27, 76-89.

Rahman, I., Kode, A., Biswas, S. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 1, 3159-3165. doi: 10.1038/nprot.2006.378.

Rao, S., Chinkwo, K., Santhakumar, A., Johnson, S., & Blanchard, C. (2019). Apoptosis Induction Pathway in Human Colorectal Cancer Cell Line SW480 Exposed to Cereal Phenolic Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24, 2465. <https://doi.org/10.3390/molecules24132465>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol Med*. 26.

Research International, 77(Part 2), 156–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>.

Robles, F., Sanz, F., López, J., Beltrán, M. (2005). Alimentación y cáncer. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 40, 184-194. [https://doi.org/10.1016/s0211-139x\(05\)74851-4](https://doi.org/10.1016/s0211-139x(05)74851-4)

Roediger, W. (1982). The effect of bacterial metabolites on nutrition and function of the colonic mucosa. *Colon and Nutrition*. 11-24.

Rojman, A. Wulfson, A., Ottavio, G. (2014) Carciogénesis colorrectal, Nuevas perspectivas e implicancias clónicas para su detección. *Rev. Med. Rosario*. 80, 6374

Rosell, W., González, B., Cué, C., Dovale, C. (2004). Organización de los sistemas orgánicos del cuerpo humano para facilitar su estudio. *Educación Médica Superior*. 18, 1561-2902.

Secretaría de Salud. (2017). Cáncer, tercera causa de muerte en México [Internet] 2020. [Citado 2020 sep 26] Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of nutrition*. 127, 1260-1268.

SW480 [SW-480] ATCC ® CCL-228TM *Homo sapiens* colon Dukes' typ. (2020). LEADING BIOLOGICAL STANDARDS. [Internet] 2020. [Citado 2020 oct 03] Disponible en: https://www.lgcstandards-atcc.org:443/Products/All/ccl-228.aspx?geo_country=nl#culturemethod

Tandon, V., Gupta, B., Tandon, R. (2005). Free radicals/Reactive oxygen species. *JK- Practitioner*. 12, 143-148.

Tonelli, C., Chio, I., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling*, 29, 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>

Uhlig, S., Wendel, A. (1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci.* 51(14), 1083-1094. doi: 10.1016/0024-3205(92)90509-n.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M., Mazura, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J BiochemCell Biol.* 39, 44-84.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V., Zhou, S., Diaz, L., Kinzler, W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science.* 339(6127), 1546-1558. doi: 10.1126/science.1235122.

Warburg, F., Wind, E., (1926). Negelein. “Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Wochenschr.* 5(19), 829–832.

World Health Organization. (2017). Cáncer. Organización Mundial de la Salud. [Internet] 2020. [Citado 2021 oct 21] Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>

Ziegler, K., Kerimi, A., Poquet, L., Williamson, G. (2016). Butyric acid increases transepithelial transport of ferulic acid through upregulation of the monocarboxylate transporters SLC16A1 (MCT1) and SLC16A3 (MCT4). *Arch Biochem Biophys.* 599, 3-12. doi: 10.1016/j.abb.2016.01.018.

Zinovkin, R. A., & Zamyatnin, A. A. (2019). Mitochondria-Targeted Drugs. *Current molecular pharmacology*, 12, 202–214. <https://doi.org/10.2174/1874467212666181127151059>

Zubillaga, M., Weill, R. (2001) Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr Res.* 21, 569-579.

7. APÉNDICE