



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

**Evaluación del efecto anticancerígeno de la quercetina y su
extracto fermentado en células de colon humano tratadas con
bisfenol A**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias en Biomedicina

Presenta

M.C. Nataly García Gutiérrez

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Querétaro, Qro. Abril del 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación del efecto anticancerígeno de la
quercetina y su extracto fermentado en células de
colon humano tratadas con bisfenol A

por

Nátaly García Gutiérrez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: MEDCC-120616



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Evaluación del efecto anticancerígeno de la quercetina y su
extracto fermentado en células de colon humano tratadas con
bisfenol A**

TESIS

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

Presenta

M.C. Nataly García Gutiérrez

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda
Presidente

Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Secretario

Firma

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié
Vocal

Firma

Dr. Pablo García Solís
Suplente

Firma

Dra. Rocio Campos Vega
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
México

DEDICATORIAS

A Dios por darme la fuerza, paciencia y sabiduría para afrontar los momentos duros y dejarme disfrutar de las victorias.

A mi amado esposo Alejandro Alvarado Torres por estos hermosos 13 años juntos que ahora saben mejor en compañía de nuestro bebe. Por ser tan comprensivo y paciente aun cuando ni yo me aguantaba. Sé que siempre estas y estarás ahí cuando te necesite. Te amo.

A mi hermoso bebecito Ale, porque haces que quiera levantarme día a día a luchar por tí, porque todo lo que hago es para verte feliz y seguro.

A mis padres Jesús Antonio García Barraza, María Araceli Gutiérrez Guerrero y mis hermanas Guadalupe García Gutiérrez y Belinda Araceli García Gutiérrez, porque coincido en que la familia es lo más importante, ustedes me motivan a ser mejor persona. Les agradezco por todo el amor, su apoyo y las palabras de aliento que me refrescan la vida, más en aquellos momentos difíciles. ¡Este también es su logro !!

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco en primer lugar a mi directora de tesis la Dra. Hayde Azeneth Vergara Castañeda por todo su apoyo, su guía, sus consejos, hasta sus regaños cuando me los merecía, porque sé que eran para mejorar. Porque tuve la dicha no solo de que fuera mi mentora, sino mi mejor amiga, fue un privilegio trabajar contigo y ser tu estudiante, guardaré en mi corazón con alegría y satisfacción estos 4 años.

Les agradezco a los miembros de mi comité de tesis la Dra. Ana Gabriela Hernández Puga, Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié, Dra. Pablo García Solís, Dra. Rocio Campos Vega y Dr. Pablo García Solís, por sus valiosas aportaciones, su tiempo y atención para la realización y mejora de este proyecto.

A mis compañeros del doctorado Alan, Paco, Itzelly y en especial a mi chiqui Sara porque sin ella seguiría atascada en mis experimentos y no estaría graduándome; pero más aún por todos los días y tardes en el laboratorio cantando Ave María para que crecieran bonitas las células. Recordaré con cariño el congreso de bioquímica en Ixtapa.

A las chicas del colon por su apoyo, sus sugerencias y su sincera amistad. Y a todas aquellas personas que me acompañaron durante mi estancia en el doctorado y lo hicieron más ameno, a Fernando, Bibi, Luis, Maritza, Karen, Joss y muchos más.

Finalmente le agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de doctorado.

Índice general

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. ANTECEDENTES	13
2.1 La dieta y compuestos fenólicos.....	13
2.1.1 Flavonoides.....	13
2.1.2 Quercetina.....	13
2.1.2.1 Efectos biológicos de la quercetina	14
2.2 Disruptores endócrinos.....	19
2.2.1 Bisfenol A.....	20
2.2.1.1 Efecto del bisfenol A en el sistema endócrino	21
2.3 El cáncer de colon y los compuestos fenólicos.....	22
2.3.1 Efecto del bisfenol A en colon	23
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
V. METODOLOGÍA.....	26
5.1 Materiales	26
5.1.1 Reactivos	26
5.2 Metodología	27
5.2.1 Simulación de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	27
5.2.2 Simulación de fermentación colónica <i>in vitro</i>	27
5.2.3 Análisis de Polifenoles por HPLC-DAD.....	27
5.2.4 Cuantificación de la Capacidad Antioxidante por DPPH.....	28
5.2.5 Cuantificación de la Capacidad Antioxidante por ORAC	28
5.2.6 Cultivo celular	28
5.2.7 Viabilidad celular y determinación de IC ₅₀	29
5.2.8 Tratamientos.....	29
5.2.9 Cuantificación de la actividad de lactato deshidrogenasa.....	30
5.2.10 Cuantificación de DNA en las fases del ciclo celular por citometría de flujo 30	
5.2.11 La expresion génica.....	31
5.2.12 Evaluación de la expresión génica de la vía de señalización <i>p53</i>	31
5.2.13 Análisis de acomplamiento molecular <i>in silico</i>	32
5.2.14 Análisis Estadístico	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto fermentado de quercetina por HPLC y su capacidad antioxidante.....	33
6.2 Efecto de la quercetina y su extracto de fermentación sobre células de colon humano y fibroblasto de ratón.....	35
6.3 Efecto del bisfenol A sobre células de colon humano.....	38
6.4 Efecto de la coexposición de la quercetina y su extracto fermentado sobre células HT-29 y SW480 tratadas con bisfenol A.....	40

6.5	Efecto de los tratamientos sobre las fases del ciclo celular en células HT-29.	41
6.6	Efecto necrótico de la exposición con quercetina en células HT-29 expuestas a BPA.....	43
6.7	Efecto de la quercetina y su extracto de fermentación sobre los receptores estrogénicos de células HT-29 y SW480 expuestas a BPA.....	45
6.8	Efecto de la quercetina y su extracto de fermentación sobre genes relacionados a la vía de señalización P53 de células HT-25 expuestas a BPA.	49
6.9	Acoplamiento molecular <i>in silico</i> de quercetina y BPA por los receptores estrogénicos α y β .	56
VII.	CONCLUSIONES.....	61
VIII.	REFERENCIAS.....	63
IX.	ANEXO.....	74
9.1	Documento de consentimiento informado.	74

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Secuencias de genes <i>ERS1</i> , <i>ERS2</i> , <i>GPR30</i> and Actina.	31
Cuadro 2	Polifenoles presentes en el extracto fermentado de quercetina y su capacidad antioxidante. Nivel de expresión (fold-change) de genes relacionados a la vía de señalización de p53 de células HT-29 tratadas con 160.63µM de Q,	34
Cuadro 3	16% de EFQ, 4.4µM de BPA, coexposición Q+BPA o coexposición EFQ+BPA con relación al control negativo (regulación positiva +, regulación negativa -).	53

Índice de Figuras

Figura 1	Mecanismos de los efectos anticancerígenos de la quercetina (Q) en el cáncer de colon.	14
Figura 2	Comparación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.	16
Figura 3.	Reacción que cataliza la enzima superóxido dismutasa.	18
Figura 4	Acción de los disruptores sobre las hormonas naturales del cuerpo humano.	20
Figura 5	Curva dosis-respuesta de Q en células HT-29 y SW480 bajo 48 h de tratamiento.	35
Figura 6	Curva dosis-respuesta del extracto fermentado de quercetina (EFQ) en células HT-29 y SW480 bajo 48 h de tratamiento.	36
Figura 7	Curva dosis-respuesta de Q en células 3T3-L1 (A) y CCD-112CON (B) bajo 48 h de tratamiento.	38
Figura 8	Efecto del BPA en células HT-29 y SW480 bajo 48 h de tratamiento.	39
Figura 9	Efecto de Q y EFQ en células HT-29 y SW480 tratadas con BPA.	41
Figura 10	Contenido de DNA en las fases del ciclo celular de células HT-29 tratadas con Q, EFQ y BPA.	43
Figura 11	Efecto citotóxico de la Q y EFQ en células HT-29 tratadas con BPA.	44
Figura 12	Efecto de la Q y EFQ en coexposición con el BPA en la expresión de receptores estrogénicos α , β y GPR30 en células HT-29.	47
Figura 13	Efecto de la Q y EFQ en coexposición con el BPA en la expresión del receptor estrogénico β en células SW480.	49
Figura 14	Análisis de acoplamiento molecular <i>in silico</i> entre ligandos y receptores.	59
Figura 15	Mecanismo de acción propuesto que explica como Q, EFQ, Q+BPA and EFQ+BPA promueve la inhibición celular evitando el efecto del BPA en células HT-29.	60

ABREVIATURAS

BPA: Bisfenol A

CF: Control de fermentación

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DO: Densidad óptica

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EE: Error estándar

FEQ: Extracto fermentado de quercetina

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un arreglo de diodos

IC50: Concentración inhibitoria media

LDH: Lactato deshidrogenasa

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ORAC: Capacidad de absorción del radical de oxígeno

PBS: solución salina tamponada con fosfato

Q: Quercetina

SFB: Suero bovino fetal

RESUMEN

El bisfenol A (BPA) es un disruptor endócrino sintético capaz de promover la incidencia de cáncer colónico mediante el daño al material genético. La quercetina (Q) es un flavonoide con propiedades anticancerígenas por regular vías de señalización a través de receptores hormonales; por lo que su presencia podría mitigar el daño causado por el BPA evitando la progresión del cáncer colónico. El objetivo fue dilucidar un mecanismo de acción antiproliferativo de la Q y su extracto fermentado (EFQ) sobre células de cáncer de colon coexpuestas con BPA. La cuantificación química en el EFQ se realizó por HPLC y su capacidad antioxidante por DPPH y ORAC. La viabilidad celular (VC) y concentración inhibitoria media (IC_{50}) en células HT-29 y SW480 se midió por MTT. Tratamientos: Q (IC_{50}), BPA (4.4 μ M, concentración tolerable permitida), Q+BPA, EFQ (IC_{50}), EFQ+BPA, controles. La modificación del ciclo celular se evaluó por citometría de flujo y citotoxicidad por lactato deshidrogenasa. Se midió la expresión génica de *ESR1*, *ESR2* y *GPR30* por RT-qPCR y la expresión de genes de la vía de señalización de p53 con un microarreglo de qPCR. Se realizó un análisis de modelamiento molecular *in silico* para observar la afinidad de ligandos por los receptores estrogénicos. Análisis estadístico: ANOVA/Tukey. Los compuestos cuantificados en EFQ fueron la Q y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). La capacidad antioxidante medida por DPPH en el EFQ se observó una tendencia de Q>EFQ, mientras que por ORAC fue EFQ>Q. La IC_{50} se determinó en 160.63 μ M y 161.53 μ M de Q, así como en 15.98% y 17.92% de EFQ, en HT-29 y SW480, respectivamente. En ambas líneas celulares Q, Q+BPA, EFQ y EFQ+BPA redujeron la VC en 50% y BPA en 10%. En HT-29, Q y Q+BPA indujeron arresto al ciclo celular por acumulación celular en la fase G0/G1, mientras que EFQ y EFQ+BPA lo hicieron en S, además EFQ lo arrestó en G2/M. Los grupos Q, Q+BPA y BPA indujeron necrosis en HT-29 en un 10%, mientras que EFQ y EFQ+BPA en un 15%. En HT29 con Q se observó modulación positiva de los genes *ESR2* y *GPR30*; en SW480 la expresión del receptor antiproliferativo estrogénico β aumentó con Q, EFQ y EFQ+BPA. Se observó que los tratamientos con Q, Q+BPA, EFQ y EFQ+BPA modulan positivamente genes involucrados en apoptosis y detención del ciclo celular, mientras que BPA inhibe la expresión de genes pro-apoptóticos y aquellos que reprimen el ciclo celular. Se encontró que la afinidad de los ligandos por los receptores siguió la tendencia de Q>BPA>DOPAC. Estos resultados demuestran la actividad antiproliferativa de Q y EFQ solos y en coexposición con BPA en células de cáncer de colon, sin embargo, es necesario continuar con estudios que ayuden a entender el papel de los disruptores en el cáncer colónico.

Palabras clave. Quercetina, extracto de fermentación de quercetina, cáncer de colon, bisfenol A.

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a synthetic endocrine disruptor capable of promoting the incidence of colon cancer through damage to genetic material. Quercetin (Q) is a flavonoid with anticancer properties by regulating signaling pathways through hormone receptors; Therefore, its presence could mitigate the damage caused by BPA, preventing the progression of colon cancer. The objective was to elucidate an antiproliferative mechanism of action of Q and its fermented extract (EFQ) on colon cancer cells co-exposed to BPA. The chemical quantification in the EFQ was performed by HPLC and antioxidant capacity by DPPH and ORAC. Cell viability (VC) and mean inhibitory concentration (IC_{50}) in HT-29 and SW480 cells were measured by MTT. Treatments: Q (IC_{50}), BPA (4.4 μ M, allowed tolerable concentration), Q+BPA, EFQ (IC_{50}), EFQ+BPA, controls. The modification of the cell cycle was evaluated by flow cytometry and cytotoxicity by lactate dehydrogenase. Gene expression of *ESR1*, *ESR2* and *GPR30* was measured by RT- qPCR and gene expression of the *p53* pathway by qPCR microarray. *In silico* molecular modeling analysis was performed to observe the affinity of ligands for estrogen receptors. Statistical analysis: ANOVA/Tukey. The compounds quantified in EFQ were Q and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). The antioxidant capacity measured by DPPH in the EFQ showed a trend of Q>EFQ, while by ORAC it was EFQ>Q. IC_{50} was determined at 160.63 μ M and 161.53 μ M Q and 15.98% and 17.92% EFQ in HT-29 and SW480, respectively. In both cell lines Q, Q+BPA, EFQ and EFQ+BPA reduced VC by 50% and BPA by 10%. In HT-29, Q and Q+BPA induced cell cycle arrest by cell accumulation in G0/G1 phase, whereas EFQ and EFQ+BPA did so in S, and EFQ arrested them in G2/M. Groups Q, Q+BPA, and BPA induced necrosis in HT-29 by 10%, whereas EFQ and EFQ+BPA did so 15%. In HT-29, positive modulation of *ESR2* and *GPR30* genes was observed with Q; in SW480, antiproliferative estrogen receptor β expression of the increased with Q, FQ, and FQ+BPA. It was observed that treatments with Q, Q+BPA, EFQ and EFQ+BPA positively modulated genes involved in apoptosis and cell cycle arrest, whereas BPA inhibited the expression of pro-apoptotic genes and those that suppress the cell cycle. The affinity of the ligands for the receptors was found to follow the trend of Q>BPA>DOPAC. These results demonstrate the antiproliferative activity of Q in colon cancer cells co-exposed to BPA; however, it is necessary to continue with studies that help to understand the role of disruptors in colon cancer.

Keywords. Quercetin, quercetin fermentation extract, colon cancer, bisphenol A.

I. INTRODUCCIÓN

Debido al efecto disruptor del bisfenol A (BPA) en el sistema endócrino por su capacidad de activar receptores hormonales y alterar la fisiología, se han realizado diversos estudios *in vivo* e *in vitro* con el fin de elucidar posibles mecanismos de acción. Sin embargo, a pesar de su alarmante efecto tóxico en el organismo y de que el colon está en contacto directo con el BPA consumido oralmente, su impacto en dicho órgano ha sido muy poco explorado y, por lo tanto, su empleo en productos industriales destinados al uso de los alimentos no ha sido restringido. El BPA se ha asociado a múltiples daños en el organismo, así como promoción de cáncer. El cáncer de colon es una enfermedad crónica no transmisible que presenta una alta prevalencia a nivel mundial y nacional, y es promovida por malos hábitos alimentarios, el sedentarismo, y en los últimos años se ha sugerido que los compuestos tipo disruptor endócrino como el BPA, podrían contribuir para su desarrollo, aunque aún no se ha elucidado por completo. Por otro lado, recientemente, se han investigado moléculas de origen vegetal que regulen los efectos negativos del BPA en el cuerpo humano. Entre estos se encuentran los polifenoles, en específico, la quercetina es considerada un compuesto bioactivo con capacidad antioxidante y regulador del sistema hormonal provocando la muerte de células cancerosas. A su vez, la quercetina se ha demostrado que tiene efectos benéficos en la disminución de la proliferación de células de cáncer de colon por diferentes mecanismos. Por lo cual, en el presente trabajo se pretende estudiar si la quercetina ejerce un efecto antiproliferativo en células expuestas a BPA, y los mecanismos de acción celular y molecular asociados a ese posible efecto protector en células de cáncer de colon.

II. ANTECEDENTES

2.1 La dieta y compuestos fenólicos

Los compuestos bioactivos de origen natural han sido foco de estudio debido a su potencial efecto benéfico en la prevención de ciertas enfermedades no transmisibles y promoción de la salud. Se ha asociado que una ingesta alta en compuestos fenólicos provenientes de frutas y verduras disminuye el riesgo de padecer enfermedades degenerativas causadas principalmente por estrés oxidativo, debido en parte a la actividad antioxidante que estas moléculas poseen (Boeing et al., 2012). A estos metabolitos se les han atribuido múltiples efectos benéficos a la salud incluyendo la prevención y tratamiento contra enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer, entre otros (Li et al., 2014; Xia et al., 2010). Los polifenoles están recibiendo cada vez más atención por parte de las comunidades científicas y médicas, debido a su capacidad para intervenir en muchas etapas del desarrollo del cáncer (Dai y Mumper, 2010).

2.1.1 Flavonoides

Los flavonoides muestran una estructura base de flavona (2-fenil-benzo- γ -pirano) que está compuesta por dos anillos de benceno unidos por un anillo de pireno (Venturelli et al., 2016). De los flavonoides que existen, la quercetina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavona), es el más común en verduras y frutas (Abdelmoaty et al., 2010), principalmente en arándanos (147mg/100g) y cebolla (54mg/100g) (Bhagwat et al., 2015).

2.1.2 Quercetina

La quercetina proveniente de los alimentos presenta baja biodisponibilidad una vez ingerida, por lo que su forma intacta llega al colon donde es degradada por las bacterias intestinales transformándola principalmente en ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico, ácido 3,4-dihidroxyfenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido fenilacético (Serra et al., 2012). La vida media de 100mg de quercetina varía entre 20-30 horas con un pico de concentración en plasma a los 30 min (Konrad y Nieman, 2015). Es eliminada principalmente por la orina y heces (Muñoz-Reyes et al., 2021).

La quercetina es uno de los antioxidantes más potentes que se ha evaluado en estudios *in vivo* (Doğan et al., 2015) e *in vitro* (Bao et al., 2017) debido a la conformación de sus grupos hidroxilo fenólicos en el anillo B y la conjugación entre los anillos A y B.

2.1.2.1 Efectos biológicos de la quercetina

Entre los efectos benéficos a la salud que presenta la quercetina sobresalen los antiinflamatorios, antiproliferativos, proapoptóticos y anticancerígenos en modelos *in vitro* (Chirumbolo et al., 2010; Wang et al., 2012). Se ha reportado que la quercetina es capaz de inhibir la proliferación de varias líneas celulares de cáncer incluyendo las de pulmón, próstata, hígado, mama, cervical y de colon mediante diferentes mecanismos de acción (Mense et al., 2008; Kim et al., 2008; Vidya et al., 2010). En la **Figura 1** se muestran algunos de estos mecanismos específicamente contra el cáncer de colon, incluyéndose moléculas clave cuya modulación por este fitoquímico promueven o inhiben el proceso.

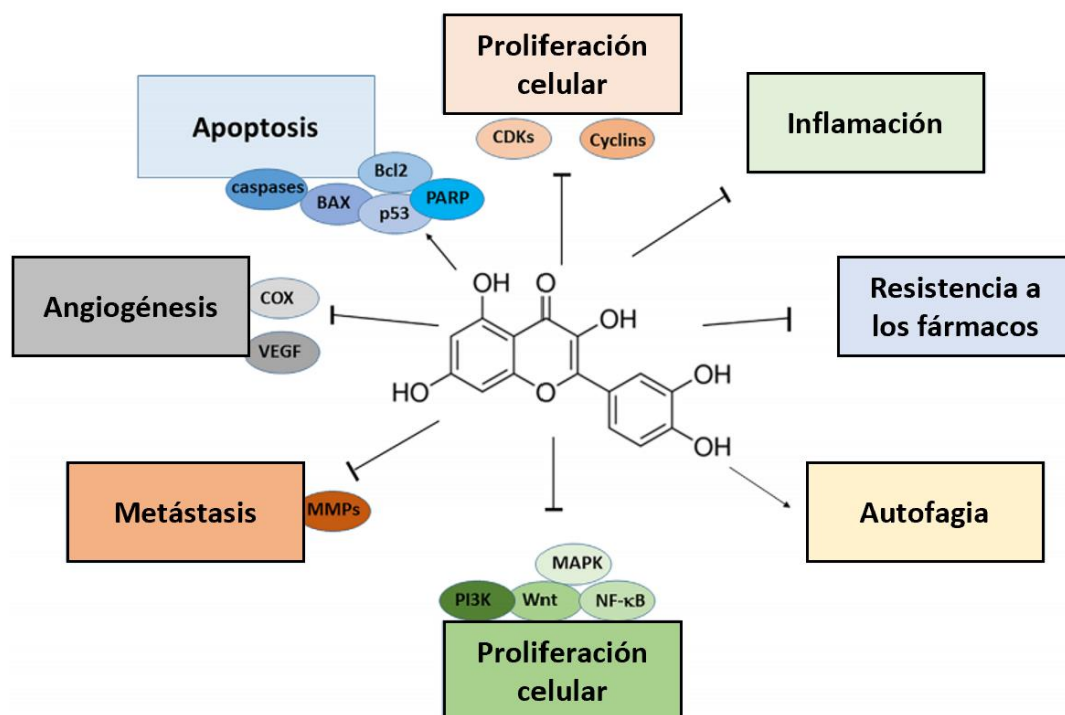


Figura 1. Mecanismos de los efectos anticancerígenos de la quercetina en el cáncer de colon (Darband et al., 2018).

Entre los mecanismos anticancerígenos de la quercetina se encuentra la apoptosis. Este tipo de muerte programada se desencadena en células infectadas, mutadas, dañadas o viejas que necesitan ser eliminadas para reestablecer el equilibrio con aquellas células nuevas que se están generando. A diferencia de la necrosis, que es una muerte descontrolada donde hay ruptura de membrana y liberación de contenido celular al espacio extracelular, la apoptosis se considera como un proceso sumamente controlado donde hay síntesis proteica, fragmentación del DNA, formación de cuerpos apoptóticos y finalmente fagocitosis (Obeng, 2021). La inducción de apoptosis puede desencadenarse mediante dos rutas principales. La vía intrínseca dependiente de la mitocondria es modulada por la liberación de proteínas proapoptóticas incluyendo a los miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-xL, Bax y Bid) (Obeng, 2021).

La otra ruta conocida como la vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores de membrana en respuesta a ligandos extracelulares como FADD (proteína asociada al dominio de muerte del ligando FAS) (Liu et al., 2022). Esto a su vez promueve la activación de las caspasas iniciadoras 2, 8 y posteriormente a las caspasas efectoras y 7 en una cascada hacia la muerte celular. Es importante señalar que la activación de las caspasas durante la apoptosis temprana parece estar regulada principalmente por la familia de las proteínas Bcl-2, cuya función principal es el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial a través de la formación o poros de permeabilidad transicional mitocondrial (Obeng, 2021). En la **Figura 2** se muestra la representación de las vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

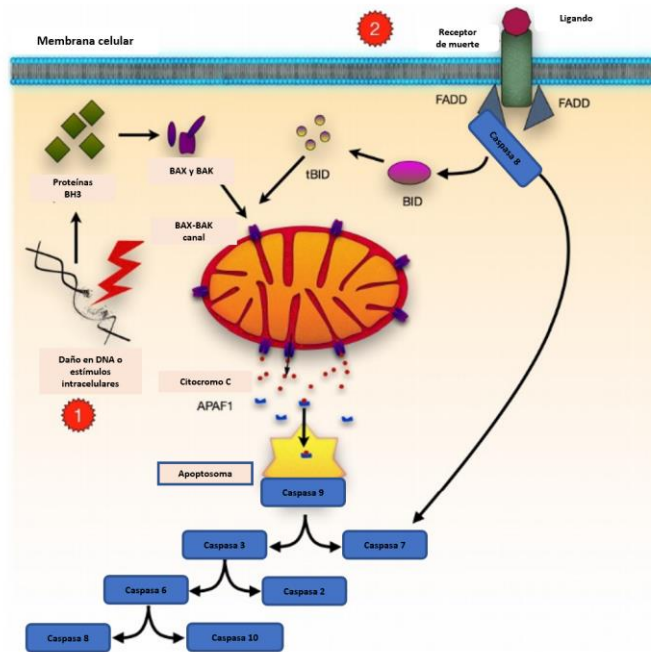


Figura 2. Comparación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Glowacki et al., 2013).

Las células cancerosas presentan un recambio celular alterado derivado de los defectos en la promoción de apoptosis. Esta pérdida del control de proliferación e inhibición de muerte celular se ha estudiado profundamente en relación con moléculas con capacidad anticancerígena como la quercetina. En un estudio realizado por Kim et al. (2010), se demostró que la quercetina induce la muerte celular mediante mecanismos de acción apoptótica en células de adenocarcinoma humano HT29 mediante la fosforilación de la proteína cinasa activada por AMP y el cambio en los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax. Zhang et al. (2015) también encontraron que la quercetina induce la muerte celular de las líneas de cáncer de colon CaCo-2 y SW620, por medio de la inhibición de la vía de señalización de NF- κ B, la regulación negativa de Bcl-2 y positiva de la proteína Bax.

La elucidación de estos mecanismos ha sido el resultado de diversos estudios en los que se demuestra el efecto antiproliferativo y anticancerígeno de la quercetina. Parte de los experimentos que se han realizado en diferentes líneas celulares particularmente de cáncer de colon señalan que la quercetina no solo inhibe la

proliferación celular mediante procesos apoptóticos, sino que también lo realiza a través del arresto al ciclo celular.

El ciclo celular es el conjunto de eventos de duplicación y división celular, que da lugar a la proliferación celular (Matson y Cook, 2017). El ciclo celular se divide en las fases G1, S, G2 y M. Las células dentro de las fases G1 y G2 experimentan crecimiento celular y alta actividad metabólica. La fase S o de síntesis consiste en la replicación del material genético. Y finalmente en la fase M de mitosis la célula se divide en dos células idénticas. El tránsito por estas cuatro fases del ciclo celular se encuentra regulado por las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs 1, 2, 4, 6) y sus subunidades activadoras, las ciclinas (A, B, D y E) (Suryadinata et al., 2010).

En este sentido la quercetina es capaz de inhibir la proliferación de diversas líneas celulares cancerosas debido a su capacidad para detener el ciclo celular y la modulación de sus componentes incluyendo las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas. En un estudio realizado por Van Erk et al. (2005) en células de cáncer de colon CaCo-2, se encontró que la quercetina a concentraciones de 5 μ M y 50 μ M es capaz de inhibir la proliferación celular y arrestar el ciclo celular en la fase sub-G1 mediante la regulación negativa de los genes CDC6, CDK4, ciclina D1. De igual manera en otro estudio se encontró que en células de adenocarcinoma humano SW480, la quercetina a una concentración de 160 μ M y durante 24 h de tratamiento, logró disminuir la viabilidad celular debido a la modulación a la baja de la ciclina D y survivina (Shan et al., 2009).

Por otra parte, el efecto antioxidante que muestra la quercetina se le ha atribuido no solamente a su capacidad para estabilizar radicales libres (Meng et al., 2012), inhibir la xantina oxidasa, la peroxidación lipídica (Pauff y Hille, 2009), sino también a su poder de modulación de enzimas y moléculas antioxidantes endógenas (Chen et al., 2017). Tal es el caso de la enzima superóxido dismutasa y el péptido glutatión.

La enzima superóxido dismutasa es una proteína esencial para la depuración de especies reactivas de oxígeno particularmente el anión superóxido o O₂⁻, hacia

moléculas más estables como el peróxido de hidrógeno (**Figura 3**). De esta enzima las hay de tres tipos dependiendo del ion metálico que contenga en su estructura (cobre, cinc o manganeso) y del compartimiento en el que se encuentre (mitocondria y citoplasma) (Wang et al., 2018).

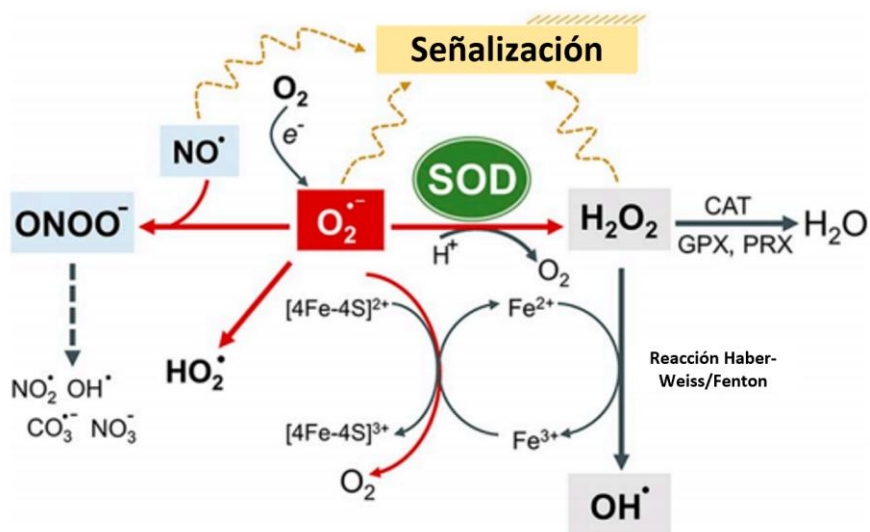


Figura 3. Reacción que cataliza la enzima superóxido dismutasa (Wang et al., 2018).

El glutatión es el péptido de tres aminoácidos (gamma glutamil-cisteinilglicina) de bajo peso molecular más abundante en las células eucariotas (Koppula et al., 2021). El glutatión participa en la defensa antioxidante endógena y es considerado un indicador de la salud celular y el estrés oxidativo. El 85-90% del glutatión se encuentra en su forma reducida, en la que el grupo sulfidriilo de la cisteína no está unido a un enlace disulfuro de otro glutatión. Cuando el glutatión reducido es oxidado se produce un dímero de dos de péptidos unidos por un enlace disulfuro entre las cisteínas presentes en ambas moléculas o llamado GSSG, que inmediatamente puede ser revertido a su forma reducida por medio de la enzima glutatión reductasa (Lv et al., 2019). Derivado de experimentos se ha observado que algunos compuestos cuando reaccionan con GSH tienden a formar aductos o aumentan la concentración de GSSG, lo que a su vez disminuye la relación de glutatión reducido/oxidado ($GSH/GSSG$). Esta reducción se ha visto asociada con procesos de envejecimiento y desarrollo de enfermedades, por lo cual a esta relación

a menudo se le ha considerado como un marcador de toxicidad celular (Ballatori et al., 2009).

Aunado a los mecanismos de acción estudiados, también se ha observado que la quercetina puede regular la actividad de receptores estrogénicos beta ($RE\beta$), involucrando la activación de la proteína p38 y caspasa 3, sugiriendo la muerte en células de cáncer. Bulzomi et al. (2012) determinaron que la quercetina a una concentración de 1 μ M, induce apoptosis de forma similar al 17β -estradiol en células de cáncer de colon DLD-1, por medio de la activación de p38 que a su vez estimuló a la activación de la caspasa-3 y escisión de la proteína PARP.

Si bien estos resultados indican el posible efecto quimiopreventivo o terapéutico de la quercetina, son necesarios más estudios que corroboren su efecto como disruptor natural. En este sentido, la quercetina pertenece al grupo de fitoestrógenos que a bajas concentraciones se ha observado que posee un comportamiento estrogénico, regulando la expresión de genes que están bajo el control de elementos de respuesta estrogénica en modelos *in vitro*. Esto se debe su afinidad por esos receptores, una vez unido a ellos, los fitoestrógenos pueden inducir un cambio conformacional induciendo o reprimiendo la expresión de genes específicos (Chen y Chien, 2014). A los compuestos con capacidad de interacción con receptores estrogénicos se les denomina disruptores endócrinos.

2.2 Disruptores endócrinos

Se define a los disruptores endócrinos como sustancias de origen natural, como la quercetina, o sintético que tienen efecto sobre los sistemas endócrinos (Arambula y Patisaul, 2018). En la **Figura 4** se muestra un diagrama general del efecto de los disruptores sobre las funciones de las hormonas naturales del organismo.



Figura 4. Efectos de los disruptores en las hormonas naturales (Arvelo et al., 2016).

A diferencia de los fitoestrógenos cuyo efecto benéfico es observado en el cuerpo humano, los disruptores endócrinos sintéticos alteran el equilibrio hormonal promoviendo la aparición de enfermedades no transmisibles incluyendo el cáncer. En la industria química se elaboran polímeros con la habilidad de interferir con hormonas estrogénicas y producir respuestas biológicas desfavorables, entre estas moléculas se encuentra el bisfenol A (BPA).

2.2.1 Bisfenol A

El BPA es un agente químico (4,40-dihydroxy-2,2-diphenylpropano) se obtiene a partir de la condensación de dos moléculas de fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico (Vandenberg et al., 2009). El BPA es un componente clave en la fabricación de muchos materiales incluyendo botellas de plástico reusables, biberones, bebidas enlatadas (Geens et al., 2011). Sin embargo, debido a que el BPA es capaz de desprenderse de los materiales bajo condiciones de temperatura y pH, puede migrar a los alimentos (Bolli et al., 2008), y por consecuencia, los consumidores incorporan este químico a su cuerpo encontrándose presente en la piel, saliva y sangre (Calafat et al., 2008; Calafat et al., 2009; Braun et al., 2011; Van Landuyt et al., 2011).

La Administración de Alimentos y Fármacos de EE. UU. y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria han determinado que la recomendación de exposición humana al BPA está por debajo de los niveles de exposición seguros (5 - 50mg/kg

peso/día) (FDA, 2012; EFSA, 2015). Sin embargo, diversos estudios han encontrado que niveles menores de BPA generan alteración en genes que promueven la aparición de enfermedades incluido el cáncer. Hussain et al., (2015), determinaron que dosis administradas de 25 µg/kg de BPA en ratones Sprague Dawley incrementan los valores de expresión del gen *hoxc6*, el cual es un indicador de cáncer de mama la promover la transformación maligna de células normales (DelInnocentes et al., 2015) y por tanto la formación de tumores (Hussain et al., 2015). En otro estudio, se empleó BPA (100nM) en células de cáncer de mama MCF7, y se observó sobreexpresión de genes oncogénicos incluyendo el *hotair*; este hallazgo se observó también en glándulas mamarias de ratones Sprague Dawley tratadas con dosis de 25µg/kg de BPA (Bhan et al., 2014). Por su parte, el uso de BPA en México no se encuentra regulado y son pocos los estudios que miden el nivel de exposición y corroboren el efecto dañino del BPA al cuerpo humano. Por citar uno de ellos, en un estudio realizado en mujeres embarazadas de la ciudad de México se logró identificar BPA en 80% de las muestras de orina en una concentración de 0.4-6.7 µg/L, lo cual se correlacionó con nacimientos prematuros (Cantonwine et al., 2010). En este sentido, se ha observado que dosis de 0.1 – 2µg/ml de BPA en células primarias de trofoblasto aumenta la concentración de proteínas y la actividad de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual es esencial en el desarrollo y maduración del feto, por lo que su alteración genera cambios en el desarrollo de la placenta y promueve complicaciones en el embarazo. Debido a lo anterior, se ha planteado que la relación entre el BPA y el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o alterar de procesos de la homeostasis hormonal, se debe en parte a su capacidad de activación de los receptores estrogénicos favoreciendo la expresión de genes y proteínas.

2.2.1.1 Efecto del bisfenol A en el sistema endócrino

El BPA se considera como un disruptor endócrino por su interferencia con la actividad hormonal debido a capacidad de unión y activación de los receptores estrogénicos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Vandenberg et al., 2009; Bergman et al., 2013). Aunado a este hecho, se ha informado que el BPA puede promover el desarrollo del cáncer e influir en la proliferación y metástasis del cáncer en órganos responsivos a

estrógenos (Vandenberg et al., 2008; Gao y Wang, 2014; Kim et al., 2015). En gónadas se ha observado que el BPA puede modular la expresión de proteínas relacionados con la promoción de cáncer, sin embargo, no solamente las gónadas se ven afectados por la presencia del disruptor endócrino, debido a que el BPA se ha asociado a la promoción de cáncer de pulmón, riñón y gastrointestinal (Zhang et al., 2014).

Por lo anterior la dieta y los factores ambientales como la quercetina y el bisfenol A, se han asociado a la prevención y/o riesgo, respectivamente, de desarrollar cáncer de colon.

2.3 El cáncer de colon y los compuestos fenólicos

El cáncer se caracteriza por el crecimiento acelerado (proliferación) y diseminado (metástasis) de células anormales (Feitelson et al., 2015). En particular, el cáncer de colon es una enfermedad maligna en la cual ocurren múltiples alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores durante el desarrollo de la enfermedad (Qi y Ding, 2017). Se desarrolla a través de etapas que incluyen lesiones en la cripta del colon, y el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas con múltiples mutaciones que afectan al balance entre la proliferación celular y la apoptosis (Orlando et al., 2008).

El cáncer colónico es un problema de salud pública debido a que representa el cuarto lugar por muerte de cáncer a nivel mundial para ambos sexos con un 19.5% de incidencia y 9% de mortalidad, (Bray, 2018, Globocan, 2020). Aunado a esto se ha sugerido que entre los factores que promueven la incidencia de cáncer de colon se destacan las dietas altas en carne roja procesada y a un estilo de vida sedentario (Kuipers et al., 2015). En contraste, diversos estudios demuestran que alimentos con alto contenido de fibra y compuestos bioactivos incluidos los polifenoles, ejercen su efecto sobre la prevención y/o inhibición del desarrollo de cáncer (Li et al., 2013). Diversos autores han reportado el efecto anticancerígeno de los polifenoles en modelos *in vitro* e *in vivo*. Ejemplo de ello, es el estudio de la genisteína en células cáncer de colon HT-29, esta isoflavona a 200 $\mu\text{mol/L}$ inhibió la migración y el crecimiento celular mediante la regulación positiva de E-cadherina, la supresión de

moléculas NF- κ B y Snail2, y la activación de la vía de las caspasas (Zhou et al., 2017). Por otro lado, en ratas F344 se observó que diferentes dosis de quercetina (0.1-10g/kg) disminuyen la incidencia, multiplicidad y tamaño de los tumores causados por el inductor de cáncer colorrectal azoximetano (Dihal et al., 2006). Estos hallazgos demuestran el potencial efecto benéfico de los polifenoles frente a la patología de cáncer colon.

2.3.1 Efecto del bisfenol A en colon

En cuanto al cáncer de colon la asociación entre el BPA y esta enfermedad ha recibido poca atención, sin embargo, hay reportes que indican que en células de epitelio de colon normal NC460, concentraciones micromolares del BPA promueven la migración de células por la estimulación de la expresión y actividad de MMP-9 mediada por RE β , sugiriendo posibles riesgos de desarrollo de cáncer (Shi et al., 2016). Además, en células de cáncer de colon SW480 sometidas a diferentes concentraciones nanomolares de BPA, se encontró que modula la expresión de 56 proteínas involucradas en la proliferación celular y estrés oxidativo. Se observó un aumento en la migración celular e invasión, ocasionando la transformación de las transiciones epiteliales a mesenquimales y el aumento de la expresión del factor de transcripción Snail, un marcador de progresión tumoral (Chen et al., 2014). A pesar de la importancia que pudiera tener el BPA en el colon, la información acerca de esta alteración no es suficiente y, por lo tanto, su mecanismo de acción hasta el momento no es totalmente claro. En vista de su uso vigente, se han buscado moléculas principalmente de origen vegetal como los polifenoles que ayuden a reducir su efecto tóxico.

III. HIPÓTESIS

La quercetina y su extracto de fermentación colónica *in vitro* presentan un efecto anticancerígeno en células de cáncer de colon humano en presencia de bisfenol A.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto anticancerígeno de la quercetina y su extracto fermentado en células de cáncer de colon humano tratadas con bisfenol A (BPA) y elucidar los mecanismos de acción moleculares implicados en la muerte celular.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener un extracto fermentado de la quercetina y cuantificar sus principales metabolitos.
- Evaluar el efecto del tratamiento con quercetina o su extracto fermentado de manera individual y en coexposición con BPA, sobre la viabilidad de células con y sin cáncer.
- Analizar el comportamiento de la quercetina y su extracto fermentado sobre la expresión de los receptores estrogénicos y de GPR30 en células de adenocarcinoma humano coexpuestas a BPA.
- Evaluar los tratamientos de quercetina y su extracto fermentado sobre la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de p53 de células de cáncer de colon coexpuestas a BPA.
 - Determinar la afinidad entre ligandos: quercetina y BPA, por los receptores estrogénicos α y β por medio de acoplamiento molecular *in silico*.
 - Identificar el mecanismo de acción de muerte celular involucrado en la inhibición de la viabilidad de las células con cáncer de colon bajo los tratamientos.

V. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados se obtuvieron de los siguientes proveedores. Quercetina (Q4951) de Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU., ácido 3,4-dihydroxifenilacético, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido *p*-cumárico, 4-metilcatecol, ácido protocatecúico, bisfenol A (239658) de Sigma-Aldrich®, pepsina, pancreatina, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), 2,2 Dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) (AAPH), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, M5655), sulfóxido de dimetilo (DMSO, D4540), Tritón X-100 (1002214179), de Sigma-Aldrich®, peróxido de hidrógeno, solución salina tamponada con fosfato (PBS), etanol, suero bovino fetal (SFB) y medio Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, 12800-058) de Gibco®.

Los kits comerciales utilizados fueron lactato deshidrogenasa o LDH (Roche®, Basilea, Suiza, 11644793001), Muse Cell Cycle Assay (Merck Millipore®, Burlington, MA, EE. UU., MCH100101).

5.1.2 Material biológico

Las líneas celulares utilizadas fueron adquiridas de la ATCC: de adenocarcinoma humano SW480 (ATCC, CCL-228) y HT-29 (ATCC, HTB-38); fibroblasto de ratón 3T3-L1 (ATCC, CL-173), colon de humano sano CCD-112CON (ATCC CRL-1541).

La saliva utilizada para simular el proceso de digestión en boca fue donada por voluntarios sanos, los cuales consumieron su alimento al menos 90 minutos antes del inicio del ensayo.

El inóculo fecal utilizado en la simulación de la fermentación colónica *in vitro* fue donado por voluntarios sin enfermedades gastrointestinales y son haber consumido antibiótico en los 3 meses previos a la toma de la muestra.

5.2 Metodología

5.2.1 Simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*

Se adaptó un método anterior para imitar las condiciones gástricas fisiológicas desde la boca hasta el colon en un sistema *in vitro* (Campos-Vega et al., 2015). Se mezcló quercetina (1 g) con saliva de voluntarios sanos (2 hombres y 2 mujeres). Posteriormente, esta mezcla se ajustó a pH 2 y se incubó con pepsina durante 2 h a 37°C para simular el estómago. Posteriormente, en la etapa de intestino delgado, se ajustó el pH a 7, se añadió pancreatina y sales Krebs-Ringer, y se incubó a 37 °C durante 30 min.

5.2.2 Simulación de fermentación colónica *in vitro*

La fermentación colónica *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Campos-Vega et al (2009). Se utilizó muestra de inóculo fecal humano, empleado como fuente de microbiota intestinal representativa del colon, que se obtuvo de 4 individuos voluntarios, hombre y mujer. La fermentación se realizó bajo una atmósfera anaerobia usando una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80) durante 6, 12 y 24h a 37°C. De la mezcla obtenida de la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* se tomó 0.5g del precipitado y 0.5ml del sobrenadante, además de 1ml de inóculo fecal previamente disuelto en PBS. Los productos de la fermentación colónica se almacenaron a -70°C y se le consideró como extracto fermentado de quercetina (FEQ). Se incluyó un control de fermentación (CF) que consistió en agua destilada sometida al mismo proceso que la quercetina. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, UAQ (Número de aprobación 03-07/05/2018). Todos los participantes firmaron el consentimiento informado (Anexo 9.1 Documento de consentimiento informado).

5.2.3 Análisis de Polifenoles por HPLC-DAD

Los polifenoles se analizaron por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), acoplada a un detector de diodos (DAD), siguiendo la metodología propuesta por Ramírez-Jiménez et al. (2014). La detección se realizó a longitudes de onda de 260, 280, 320 y 340nm y la cuantificación, realizada mediante la construcción de curvas

de calibración, se llevó a cabo utilizando el método de estándar externo con estándares puros comerciales. Los estándares disponibles fueron: quercetina, DOPAC, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido *p*-cumárico, 4-metilcatecol y ácido protocatecuico para establecer curvas de calibración para la detección y cuantificación de polifenoles. Los resultados se expresaron como μg equivalentes de estándar/ μL de muestra.

5.2.4 Determinación de la Capacidad Antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante por el método DPPH se determinó por la técnica propuesta por Fukumoto y Mazza (2000). Se añadieron 20 μl de muestra y 200 μl de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos; además se preparó un control con 20 μl del solvente usado en la muestra y 200 μl de DPPH. Las muestras se leyeron cada 10min durante 90min a una longitud de onda de 520nm espectrofotómetro de ELIZA (Thermo Scientific®, Waltham, MA, EE. UU., multiscan GO). Los valores fueron comparados contra una curva de calibración con trolox (0 - 800 $\mu\text{M}/\text{ml}$) como estándar. Los resultados se expresaron como μmol equivalentes de trolox / μl de muestra.

5.2.5 Determinación de la Capacidad Antioxidante por ORAC

La degradación de radicales por parte de las muestras se determinó usando la prueba de capacidad de absorción del radical de oxígeno (ORAC) (Ou et al., 2001). Cada una de las muestras se leyó en fluorómetro (485nm excitación/525nm emisión) hasta que se observó un 10% de descomposición de fluorescencia. Además, se usó Trolox para preparar una curva estándar. Los valores de ORAC se calculan midiendo el área neta bajo la curva de decaimiento de fluorescencia. Los resultados se expresaron como μmol equivalentes de trolox por $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de muestra.

5.2.6 Cultivo celular

Las células se mantuvieron en una cámara de bioseguridad donde se cultivaron en medio base DMEM adicionado con SFB (10%), antibióticos- antimicóticos (1%). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada 48 h hasta alcanzar la confluencia. Las células se mantuvieron bajo una atmósfera humificada con CO_2 al 5% a 37°C en

una incubadora con cámara de gasificación automática. Las líneas celulares usadas fueron: adenocarcinoma humano SW480 (ATCC, CCL-228) y HT-29 (ATCC, HTB-38); fibroblasto de ratón 3T3-L1 (ATCC, CL-173), CCD-112CON (ATCC CRL-1541).

5.2.7 Viabilidad celular y determinación de IC₅₀

La viabilidad de la línea celular de cáncer de colon HT-29 obtenida de la ATCC (HTB-38) se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se sembraron 5×10^3 células por pozo en microplaca estéril de 96 pozos en medio de cultivo adicionado con SFB al 10%. Después de 24 h de incubación, el medio se reemplazó con diferentes concentraciones de quercetina (40-180 μ M) o FEQ (5-20%) disueltas en medio suplementado con SFB al 5 %, y también se incluyó un control negativo de células sin tratamiento. Se volvió a realizar la incubación durante 48 h. Después de la incubación, se retiró el medio y se agregaron 200 μ L de solución de MTT a cada pocillo. La incubación se realizó nuevamente durante 1 h a 37°C. Pasado este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200 μ L de DMSO a cada pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min antes de leer los valores a 540 nm en un espectrofotómetro. El porcentaje de viabilidad se calculó usando la siguiente ecuación; % Viabilidad celular: $(DO_t / DO_c) * 100$. DO_t : Densidad óptica media de los cultivos tratados. DO_c : Densidad óptica media del control negativo. Se representó gráficamente el porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración de tratamiento para determinar la dosis inhibidora media (IC₅₀) mediante el cálculo de la ecuación de la recta $y=mx+b$.

5.2.8 Tratamientos

Los compuestos químicos fueron disueltos en medio cultivo suplementado con 5% de SFB, e incluyen: quercetina a IC₅₀, EFQ a IC₅₀, bisfenol A (4.4 μ M, concentración tolerable aprobada por la FDA), quercetina o mezcla de EFQ con BPA; también se incluyeron un control negativo, un control de fermentación (CF) al 1%.

5.2.9 Cuantificación de la actividad de lactato deshidrogenasa

La citotoxicidad de las células se evaluó utilizando la información descrita en el kit LDH. Las células se sembraron en una microplaca estéril de 96 pocillos (5×10^3 células/pocillo) en medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. El medio de cultivo se reemplazó 24 h después con los tratamientos, incluido un control positivo con Triton X-100 al 1%. Después de 48 h de incubación, se mezclaron 50 μ L de cada tratamiento con 100 μ L del reactivo LDH y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se midió utilizando un espectrofotómetro a 492nm. La actividad de lactato deshidrogenasa se calculó utilizando la siguiente ecuación: % Citotoxicidad: $(DO_t - DO_c) * 100 / (DO_p - DO_c)$. DO_t : Densidad óptica promedio de los cultivos tratados. DO_c : Densidad óptica promedio del control negativo. DO_p : Densidad óptica promedio del control positivo.

5.2.10 Cuantificación de DNA en las fases del ciclo celular

El contenido de DNA en las fases del ciclo celular se cuantificó utilizando la metodología del kit Muse Cell Cycle Assay. Brevemente, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) en medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Después de 24 h de incubación, el medio se reemplazó con los tratamientos. Después de 48 h de incubación, la placa se lavó con 1 mL de PBS 1X. Las células adheridas a la placa se recogieron con tripsina. Las células tripsinizadas se centrifugaron a 1800rpm durante 5 min a 30°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 2 ml de PBS 1X. Se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1mL de etanol al 70% frío. Se incubó a -20°C durante 3 h. Luego se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min a -4°C. El sedimento se lavó dos veces con 2mL de PBS 1X, y finalmente el sedimento se resuspendió en 20 μ L del reactivo y se incubó durante 30 min. La lectura del citómetro de flujo fue de 5×10^5 células (Muse™ Cell Analyzer, Millipore, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de DNA celular en las tres fases del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M).

5.2.11 Expresión génica

Para determinar la expresión de *ER α* , *ER β* y *GPR30* en las líneas celulares, primero se extrajo el ARN total de las células utilizando membranas de gel de sílice de Jena Bioscience GmbH (Jena, Alemania). Luego, la síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit Script cDNA de Jena Bioscience GmbH (Jena, Alemania) en las siguientes condiciones: 50°C durante 40 min y 70°C durante 10 min. Además, las condiciones de amplificación se estandarizaron durante la PCR de punto final utilizando GoTaq Thermo Flexi DNA polimerasa científica. Los resultados se consideran secuencias potencialmente moduladas si el cambio entre muestras de células tratadas y no tratadas fue más de 2,0 veces (inducción o inhibición). Finalmente, los ensayos de qPCR se realizaron con el kit Radiant™ Green Hi-ROX qPCR.

Cuadro 1. Secuencias de genes *ERS1*, *ERS2*, *GPR30* and Actina.

Genes	Secuencias	Temperatura de alineamiento
<i>ERS1</i>	FWD: TGCTGGCTACATCATCTCGG REV: CAGGAACTTATCCCTCATATAG	60°C
<i>ERS2</i>	FWD: TCCCACTTCGTAACACTTCCG REV: ACATTCTATAGCCCTGCTGTGA	64°C
Actina	FWD: ACGGGGTCACCCACACTGTGC REV: CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATG	62°C
<i>GPR30</i>	FWD: AGTCGGATGTGAGGTTTCAG REV: TCGTGTTGAGGGAGTGCAAG	60°C

5.2.12 Evaluación de la expresión génica de la vía de señalización *p53*

Se utilizó un microarreglo de genes para RT qPCR de la vía de señalización *p53* humana (PAHS-027ZA-6 RT² Profiler™ PCR Array, Qiagen) en las condiciones descritas por el proveedor. Brevemente, el ARN total se extrajo de las células tratadas usando membranas de gel de sílice de Jena Bioscience Brand GmbH (Jena, Alemania, PP-210S) seguido de la síntesis de DNAc usando RT 2 SYBR Green qPCR Master Mix de Qiagen Sciences, Maryland USA (catálogo 330504). Los resultados se analizaron en geneglobe.qiagen.com. Los resultados se consideran secuencias potencialmente moduladas si el cambio entre muestras de células tratadas y no tratadas fue más del doble (inducción o inhibición).

5.2.13 Análisis de acoplamiento molecular *in silico*

Para evaluar la interacción entre ligandos y receptores, se realizó un análisis de acoplamiento molecular *in silico*. Las estructuras químicas 3D de los ligandos estradiol (PubChem CID: 5757), quercetina (PubChem CID: 5280343), DOPAC (PubChem CID: 547) y BPA (PubChem: 6623) se obtuvieron de la base de datos de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> consultado el 22 de octubre de 2022). Los ligandos se crearon usando Discovery Visualizer 19.1.0.18287 (Dassault Systèmes, Vélizy — Villacoublay, Francia) y se minimizaron usando el sitio web de RPBS, AMMOS (herramienta de optimización de mecánica molecular automatizada para detección *in silico*) (<https://mobyale.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py>). Por otra parte, las estructuras 3D de los receptores de estrógenos alfa (PCG) y beta (5TOA) se descargaron de la página web de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/> consultado el 22 de octubre de 2022). De la misma forma, los receptores se prepararon utilizando Discovery Studio Visualizer. El acoplamiento y visualización de los ligandos con los receptores se realizó mediante el programa AutoDockTools versión 1.5.7 luego de preparar los ligandos y receptores como lo reporta Correa- Basurto et al., (2007). La siguiente ecuación se utilizó para calcular los valores de la constante de inhibición basados en los valores de la energía de enlace o energía libre de Gibbs: $\Delta G = -RT \ln K$.

5.2.14 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software JMP. Los resultados se expresaron como media \pm EE. Todos los datos se analizaron utilizando ANOVA y la comparación múltiple de Tukey-Kramer como *post hoc* ($p < 0,05$).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto fermentado de quercetina por HPLC y su capacidad antioxidante.

El estudio gastrointestinal *in vitro* se realizó utilizando 1g de quercetina (Q) pura que fue sometida a un protocolo que simula las concentraciones fisiológicas que ocurren en boca, estómago e intestino empleando diferentes cambios de temperatura, pH, adición de enzimas, entre otros. El resultado de la cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC se muestra en el **Cuadro 2**. Los resultados muestran que, en el extracto de fermentación colónica, la quercetina (EFQ) la concentración de Q y DOPAC aumenta conforme avanza el tiempo de incubación siendo la concentración más alta para ambas moléculas a las 24 h de fermentación. Por otro lado, de los estándares que se inyectaron en el cromatógrafo se identificaron en el EFQ los ácidos protocatecuico y 3-(4-hidroxifenil) propiónico; sin embargo, estos resultados no pudieron ser cuantificados y únicamente se logró cuantificar el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). Este metabolito que se observa en mayor concentración después de 24 h de fermentación también ha sido estudiado por otros autores. Serra et al. (2012), observaron que de 0.2 μ moles de Q tras 24 h de fermentación con microbiota colónica de rata se obtiene 4.7 μ M de DOPAC. Esto sugiere que la quercetina dentro de la mezcla con el inóculo fecal sigue siendo metabolizada por las bacterias intestinales a través del tiempo, generando la formación de metabolitos. Ejemplos de bacterias que pueden convertir a la Q en DOPAC son *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis* (Peng et al., 2014). Los cromatogramas del control de fermentación (CF) usado en estos experimentos no mostraron ningún pico de interés (resultados no incluidos). La presencia tanto de la Q como del DOPAC en el extracto de fermentación de 24 h podría conferirle actividad biológica como por ejemplo actividad antioxidante, de la cual estos compuestos ya han sido sujetos a estudio.

Cuadro 2. Polifenoles presentes en el extracto fermentado de quercetina y su capacidad antioxidante.

Muestra	Quercetina		DOPAC		Capacidad Antioxidante	
	Fermentación	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	RT	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	RT	DPPH ($\mu\text{moles}/\mu\text{L}$)
6 h	0.058 a	11.915	0.029 a	6.112	NE	NE
12 h	0.062 a	11.823	0.017 a	6.652	NE	NE
24 h	0.083 b	11.727	0.188 b	6.147	4.316 b	22.130 b
CF	0.052 a	11.470	0.006 a	6.246	0.353 c	2.021 c
Quercetina					5.102 a	21.114 a

CF: control de fermentación, DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, NE: no evaluado, RT: tiempo de retención. Los resultados representan la media de dos experimentos por duplicado + EE. La capacidad antioxidante es expresada como μmol Trolox eq/ μL . Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa ($p < 0.05$), por la prueba de Tukey.

Las moléculas antioxidantes desempeñan un papel importante en la protección del daño oxidativo causado la presencia de radicales libres. La capacidad antioxidante de la quercetina y del EFQ cuantificado por el método de DPPH son significativamente diferentes, siendo la quercetina pura la de mayor capacidad antioxidante (**Cuadro 2**). Por otro lado, los resultados de capacidad antioxidante determinada mediante el ensayo de ORAC muestran que el FEQ posee una capacidad antioxidante superior a la quercetina. La diferencia entre los resultados de los dos métodos podría deberse a que el reactivo ORAC mide la actividad antioxidante hacia el radical peroxilo diclorhidrato de 2,2'-azinobis(2-amidinopropano) usando fluoresceína, una sonda fluorescente, lo que indica la capacidad del compuesto para neutralizar los radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno, mientras que DPPH implica la transferencia de electrones. La pérdida de fluorescencia indica un aumento en el poder oxidante del radical libre (Ou et al., 2001). Por el contrario, el método DPPH se basa en la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en presencia de un antioxidante (Sirivibulkovit et al., 2018). Esto sugiere que, tanto la quercetina pura como el EFQ, al poseer una importante capacidad antioxidante, podría desencadenar procesos biológicos benéficas en el tejido colónico. Adicional a esto, observamos que el CF presenta poca capacidad antioxidante, por lo que los resultados del EFQ son debidos a la Q y/o metabolitos, más no a los componentes que se usaron para su procesamiento.

Ya se ha demostrado por otros autores la alta capacidad que tiene la Q pura de neutralizar los radicales libres mediante la donación de electrones y protones (Brett y Ghica, 2003), más nunca se había analizado en su extracto fermentado.

6.2 Efecto de la quercetina y su extracto de fermentación sobre células de colon humano y fibroblasto de ratón.

En cuanto al estudio con las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y SW480 la **Figura 5** muestra que al aumentar la concentración de Q pura en un tiempo de exposición de 48 h hay una disminución de la viabilidad celular dosis-dependiente.

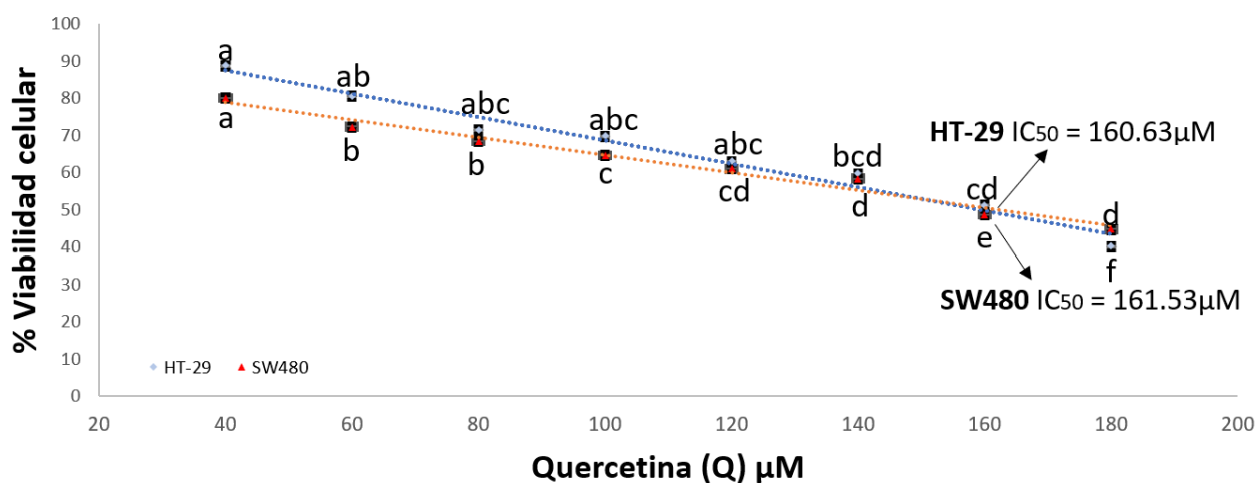


Figura 5. Curva dosis-respuesta de quercetina en células HT-29 y SW480 bajo 48 h de tratamiento. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa por línea celular ($p < 0.05$), por prueba de Tukey. Las células fueron normalizadas con el control negativo. La concentración inhibitoria media o IC_{50} se refiere a la concentración necesaria para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población bajo tratamiento.

De manera similar, la disminución de la viabilidad celular por efecto del EFQ fue dependiente de la dosis (Figura 6).

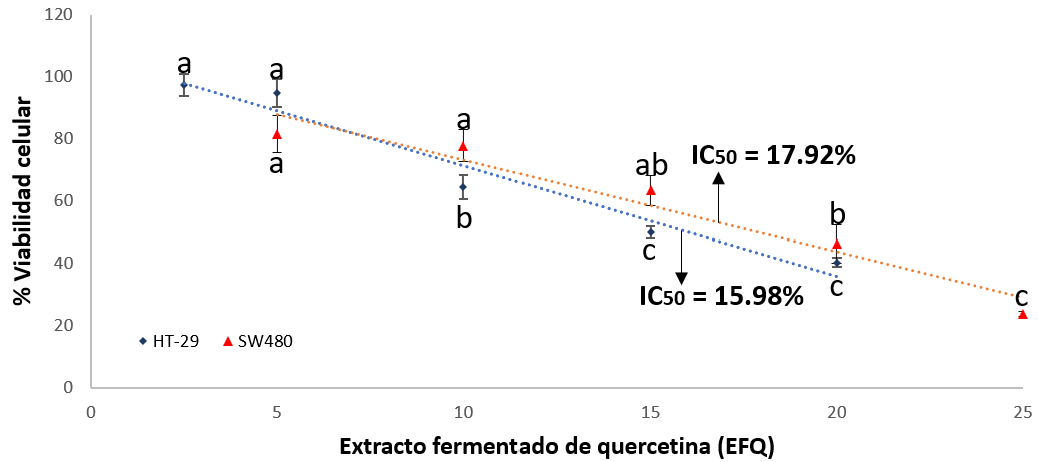


Figura 6. Curva dosis-respuesta del extracto fermentado de quercetina en células HT-29 y SW480 bajo 48 h de tratamiento. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa por línea celular ($p < 0.05$), por prueba de Tukey. Las células fueron normalizadas con el control negativo. La concentración inhibitoria media o IC_{50} se refiere a la concentración necesaria para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población bajo tratamiento.

La IC_{50} de Q en ambas líneas celulares fue similar, siendo para HT-29 de $160.63\mu M$ y en SW480 de $161.53\mu M$. Estos resultados son similares a lo reportado por Yang et al. (2016), y Shan et al. (2009), en las células HT-29 y SW480, respectivamente. El 50% de muerte en la línea celular HT-29 por efecto de 15.98% de EFQ, mientras que en SW480 la IC_{50} se encontró con el 17.92% del extracto fermentado. Al estimar el contenido de Q presente en estos porcentajes, suponiendo que solo estuviera esta molécula en el extracto fermentado, se obtiene una concentración de $43.88\mu M$ Q para la línea HT-29 y de $49.21\mu M$ Q para SW480. Estas concentraciones son menores a la IC_{50} resultante del tratamiento con Q pura observada en la **Figura 5**, por lo cual se podría sugerir que el efecto del EFQ es mayor por sobre la Q pura. Sin embargo, como observamos hay más de un metabolito presente en el EEQ por lo que podrían estar actuando de manera sinérgica o antagónica con la Q en un proceso biológico específico. El efecto inhibitorio celular del EFQ podría deberse a la presencia tanto de Q pura como de sus metabolitos producidos por reacciones entre las bacterias colónicas y la Q. Rosa et al. (2018) observaron que a una concentración de $1\mu M$ DOPAC disminuye la viabilidad de células de adenocarcinoma en alrededor del 50%. Por lo tanto, la confirmación de la presencia de Q y DOPAC

en el EFQ sugiere su posible participación en el efecto inhibitorio sobre la viabilidad de células de cáncer colónicas. Aunado a esto, los resultados de capacidad antioxidante del EFQ (mostrados anteriormente) nos indican una posible vía que contribuya al efecto anticancerígeno de ambos tratamientos. Esto debido a que el tratamiento con Q y EFQ actuarían tanto por la donación de electrones y protones como por la modulación positiva de las enzimas endógenas antioxidantes que conduciría a la célula a una despolarización de la membrana mitocondrial y liberación citocromo c que podría promover la activación de la vía de las caspasas intrínseca. De esta manera el equilibrio entre moléculas antioxidantes y radicales libres que mantiene una célula de cáncer podría descompensarse llevándola consecuentemente a su muerte.

Observando el efecto inhibitorio de la Q en células de cáncer de colon resultó imprescindible estudiar este flavonoide en una línea celular sin cáncer para conocer si el compuesto discrimina entre una línea sana o cancerosa. Los resultados del efecto de la Q sobre la línea de fibroblastos de ratón 3T3-L1 y células de colon humano CCD-112CON se muestra en la **Figura 7**. Se observó que la quercetina tiene efecto sobre la viabilidad celular dosis-respuesta, sin llegar a matar al 50% de la población celular a una concentración de 180 μM sobre 3T3-L1 y de 200 μM en CCD-112CON; lo cual es muy superior a las concentraciones determinadas de IC_{50} de Q en las células de cáncer de colon. Retomando los resultados de las IC_{50} de las líneas celulares con cáncer de colon mostradas en la **Figura 5**, la concentración de Q se estimó en alrededor del 160 μM , misma que al ser utilizada en fibroblastos resultó en la inhibición del 35% y en colon sano del 10%. Estos resultados sugieren que la respuesta de la Q es diferencial en presencia o ausencia de cáncer. Además, es importante resaltar que a nivel celular la IC_{50} de las líneas con cáncer bajo tratamiento con Q no está afectando de manera considerable a la línea sin cáncer, sin embargo, debemos tomar en cuenta que la línea 3T3-L1 no es fibroblasto de colon y proviene de otra estirpe diferente a las de cáncer y que solamente se realizó un ensayo con la línea CCD-112CON.

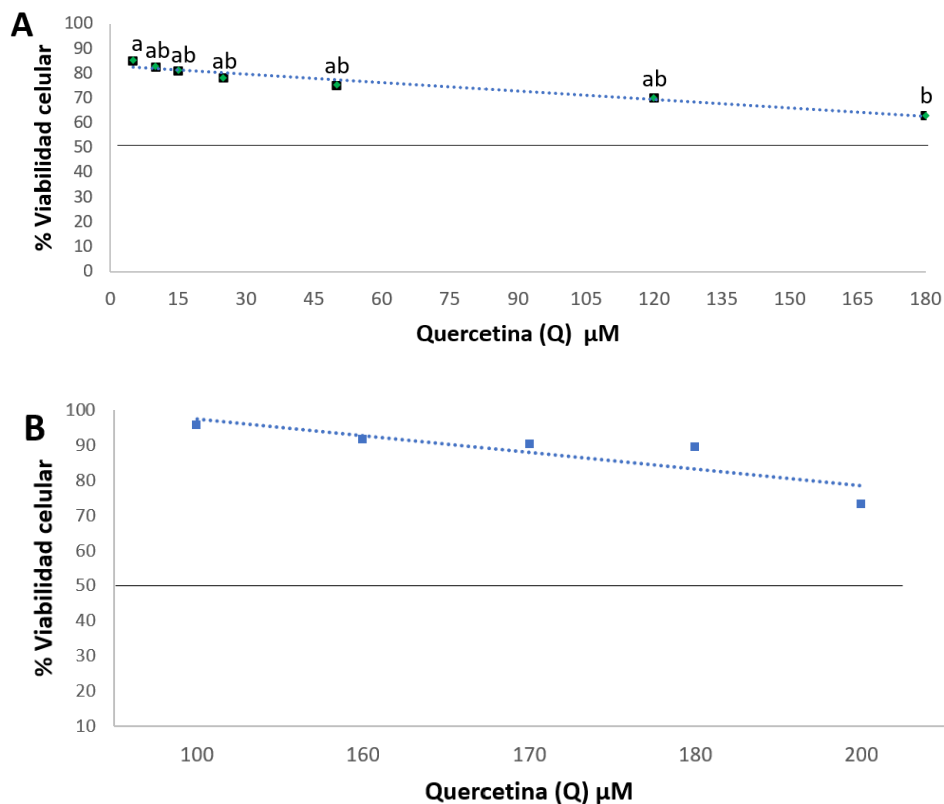


Figura 7. Curva dosis-respuesta de quercetina en células 3T3-L1 (A) y CCD-112CON (B) bajo 48 h de tratamiento. Cada valor de la curva del panel A representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. Del panel B solo se realizó un experimento. Letras diferentes indican diferencia significativa por línea celular ($p < 0.05$), por prueba de Tukey. Las células fueron normalizadas con el control negativo.

6.3 Efecto del bisfenol A sobre células de colon humano.

La viabilidad de las células HT-29 y SW480 bajo el tratamiento con bisfenol A (BPA) se observa en la **Figura 8**. La viabilidad de las células HT-29 con BPA se vio disminuida dependiente de la concentración. Esta reducción de la viabilidad podría ser debido al efecto tóxico que tiene el BPA sobre la célula llevándola a una muerte no controlada llamada necrosis. En diversos estudios utilizando células cancerosas, incluyendo las de colon, se ha visto que al aumentar progresivamente la concentración del BPA hay muerte celular por citotoxicidad (Qu et al., 2018). En este estudio se empleó la dosis tolerable permitida por la FDA, que fue de 4.4 μM . A esta concentración la viabilidad disminuyó alrededor del 10%, el proceso de muerte celular se tocará más adelante con los resultados del ensayo de lactato

deshidrogenasa. La viabilidad de las células SW480 se observó que aumenta ligeramente en relación con la concentración de BPA, alrededor de 90 a 100% aproximadamente. Estos resultados sugieren que el BPA a las concentraciones aplicadas, pudiera conferirle diversos daños a la célula de estadio II, a la cual pertenece la línea SW480, lo cual favorezca los mecanismos proliferativos.

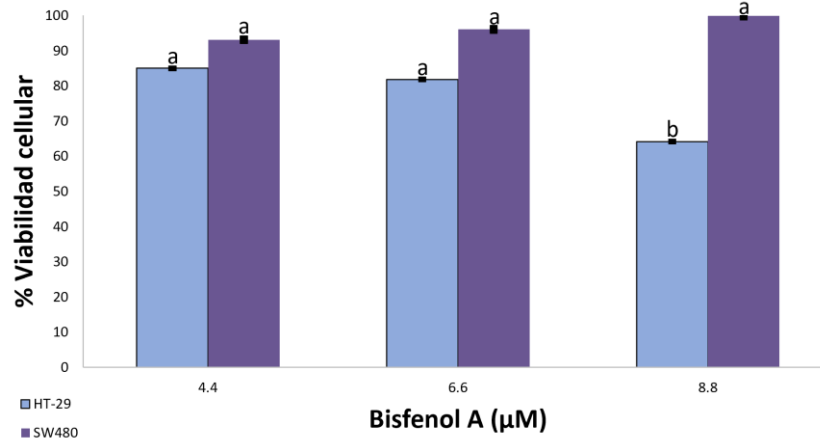


Figura 8. Efecto del BPA en células HT-29 y SW480 bajo 48 h de tratamiento. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa por línea celular ($p < 0.003$, HT-29; $p < 0.95$, SW480), por prueba de Tukey. Las células fueron normalizadas con el control negativo.

La diferencia en los resultados de viabilidad entre las líneas celulares de cáncer colónicas puede deberse a los diferentes estadios en las etapas de la carcinogénesis. Por un lado, la línea celular SW480 es una etapa intermedia en la progresión del cáncer Dukes B, mientras que la línea celular HT-29 es una etapa avanzada del cáncer con Dukes C, por lo que a nivel molecular las líneas celulares contienen distinto número de mutaciones que han adquirido a lo largo de tiempo y por ende pueden mostrar una respuesta diferente frente al BPA (Ahmed et al., 2013). Por un lado, la línea SW480 muestra aumento de la expresión de genes que desencadenan procesos proliferativos, de resistencia a la muerte y sobrevivencia BRAF y PIK3CA, mientras que las células HT-29 se inclinan por procesos que derivan en la migración como el aumento de la expresión de vimentina. De esta manera podría sugerirse el efecto tóxico que el BPA ejerce sobre la línea HT-29, mientras que en la SW480 adquiere ventaja sobre algunas modificaciones moleculares que induzcan su proliferación.

6.4 Efecto de la coexposición de la quercetina y su extracto fermentado sobre células HT-29 y SW480 tratadas con bisfenol A.

La coexposición de la Q y su extracto fermentado con BPA en ambas líneas de cáncer de colon se muestran en la **Figura 9**. Los resultados del tratamiento con la IC_{50} de Q y su extracto fermentado en ambas líneas de cáncer (**Figura 5**), así como el porcentaje de viabilidad tras el tratamiento con 4.4 μ M de BPA (**Figura 8**), se muestran similares a lo observado en la Figura 9. Por otro lado, la coexposición de Q y BPA dio como resultado un porcentaje de viabilidad de 50 - 60% en ambas líneas (**Figura 9**), los resultados sugieren que el efecto anticancerígeno de la Q predomina sobre los efectos moleculares inducidos por BPA, debido a que el BPA por sí solo no redujo de manera importante la viabilidad. Sin embargo, no hay evidencia de la coexposición de la Q con BPA en tejidos con los cuales se pueda comparar. Hwang et al. (2013), observaron que en células de cáncer de ovario el porcentaje de viabilidad tras la coexposición del BPA y el flavonoide genisteína disminuyó drásticamente, debido al efecto antiproliferativo de la genisteína.

Por otro lado, los tratamientos con el extracto fermentado solo o en coexposición con BPA redujeron la viabilidad celular en alrededor del 40%. Este efecto no se muestra en el CF por lo que los componentes presentes en este extracto son los responsables de esta disminución (**Cuadro 2**) y no aquellos compuestos utilizados para preparar el medio. Es importante resaltar que el EFQ es capaz de disminuir la viabilidad celular aún bajo la presencia del BPA. Aunado a lo mencionado en relación con la capacidad antiproliferativa de la Q, se ha visto que los compuestos provenientes de la metabolización de la Q por parte de la microbiota también cuentan con la facultad de promover la muerte de células cancerosas. En un estudio realizado por Catalán et al. (2020) observaron que el compuesto DOPAC a una concentración de 25.8 μ M fue capaz de disminuir el 50% de la viabilidad en células de cáncer de colon RKO después de 72 h de incubación. Este mismo efecto antiproliferativo fue observado por Gao et al. (2006) en células HCT116 después de 24 h de incubación se obtuvo una IC_{50} de 90 μ M. Estos autores le atribuyen su efecto anticancerígeno, por una

parte, a su capacidad antioxidante y por otro, a que actúa sobre el DNA evitando la división celular.

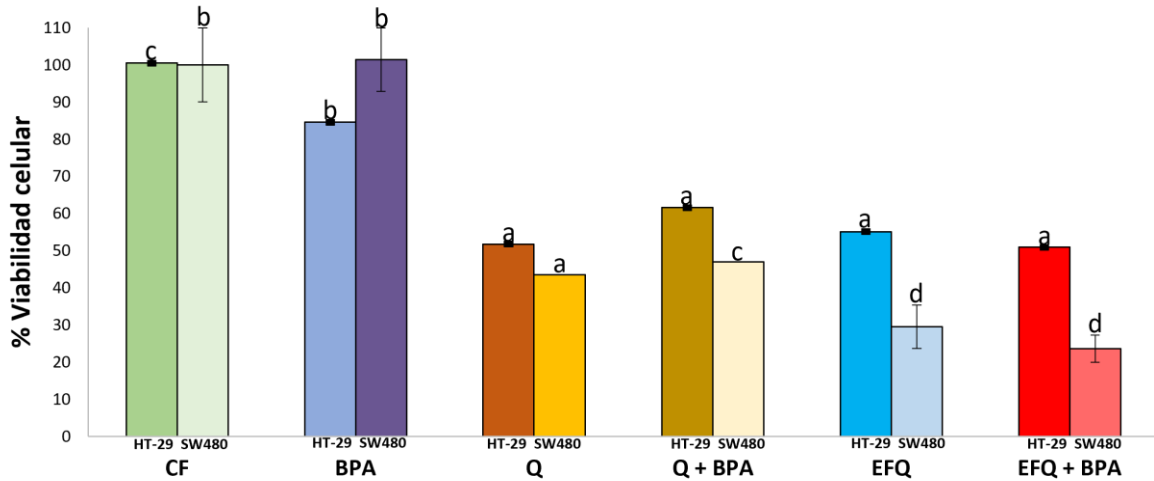


Figura 9. Efecto de la quercetina y EFQ en Células HT-29 y SW480 tratadas con BPA. Concentración de tratamientos: HT-29: Q 160 μ M, BPA 4.4 μ M, EFQ 16%; SW480: Q 162 μ M, BPA 4.4 μ M, EFQ 18%. Q: quercetina, BPA: bisfenol A, EFQ: extracto fermentado de quercetina, CF: control de fermentación. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE, de células tratadas durante 48 h con quercetina o EFQ. Letras diferentes por línea celular indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por prueba de Tukey. Las células fueron normalizadas con el control negativo.

Hasta este punto los resultados entre ambas líneas celulares se muestran similares, desafortunadamente por cuestiones técnicas se seleccionó a la línea HT-29 para continuar con los análisis; sin embargo, sería importante en el futuro evaluar los tratamientos en una línea con cáncer de colon en etapa temprana como la línea SW480.

6.5 Efecto de los tratamientos sobre las fases del ciclo celular en células HT-29.

En comparación con los demás grupos, la cantidad en el número de células tratadas con Q en coexposición con el BPA se muestra aumentada significativamente en la fase G0/G1 (**Figura 10**); además, las células bajo tratamiento con Q en la fase S del ciclo celular se observa disminuida significativamente respecto a los demás grupos. Las células tratadas con el EFQ y su coexposición con el BPA disminuyeron en la fase G0/G1, aumentaron en la fase S y solo el extracto de fermentación aumento en

la fase G2/M. Los resultados sugieren que la Q y su extracto fermentado, solos y en coexposición con BPA, promueven un arresto al ciclo celular dependiente de la fase estudiada con posterior acumulación de células con DNA fragmentado. Esto biológicamente podría implicar que las células cancerosas al perder la capacidad de reparar el daño generado por la Q inducirán su muerte por apoptosis. Yang et al. (2016) encontraron que la Q a concentración entre 100 y 200 μM y durante 48 h de incubación en células HT-29 aumentó el número de células en la fase G0/G1 del ciclo celular con consecuente reducción en la fase S del ciclo celular, en comparación al control negativo (células sin tratamiento), por lo que la Q a esas concentraciones muestra un efecto inhibitorio de la proliferación en células HT-29 mediante la detención en dicha fase. Aunado a esto, la diferencia de acumulación de células en las diversas fases del ciclo celular por efecto de la Q y su extracto fermentado podría deberse a que este último contiene metabolitos que, actuando de manera sinérgica o antagónica lleven a la célula a su arresto y posible muerte. El efecto causado por el EFQ es debido a la Q y sus metabolitos pues el CF se muestra similar al control negativo. En cuanto al tratamiento con BPA no se observó cambio alguno en comparación al control negativo, sin embargo, como veremos a continuación, el BPA podría estar desencadenando la muerte celular por citotoxicidad. Bilancio et al. (2017), encontraron que la incubación con 10 μM de BPA durante 48 h induce acumulación de células en la fase G1 y posterior acumulación en la fase S en células de cáncer de próstata LNCaP.

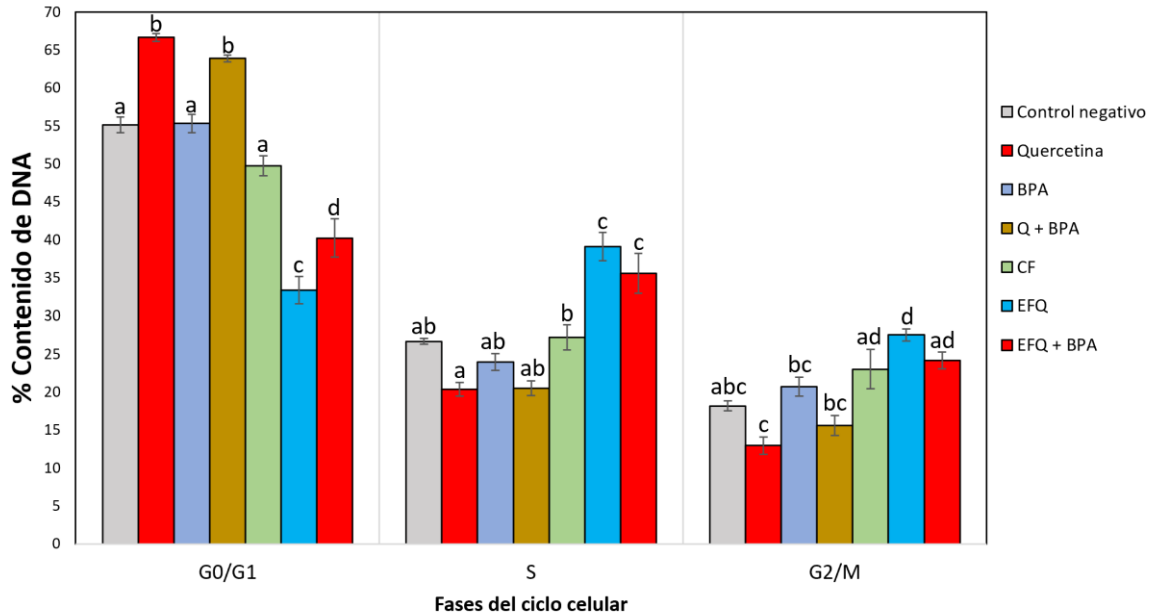


Figura 10. Contenido de DNA en las fases del ciclo celular de Células HT-29 tratadas con Q, EFQ y BPA. Concentración de tratamientos: HT-29: Q 160 μ M, BPA 4.4 μ M, EFQ 16%. Q: quercetina, BPA: bisfenol A, EFQ: extracto fermentado de quercetina, CF: control de fermentación. Cada valor representa dos experimentos independientes por duplicado \pm EE, expresado como porcentaje de DNA/500,000 células. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa entre cada fase ($p < 0.05$) por prueba de Tukey. G₀: fase de reposo, G₁: 1ra. Fase de crecimiento, S: fase de síntesis de DNA, G₂: 2da. Fase de crecimiento, M: fase de mitosis.

6.6 Efecto necrótico de la exposición con quercetina en células HT-29 expuestas a BPA.

La necrosis es un mecanismo de muerte por el cual la célula se lisa vertiendo su contenido al espacio extracelular en respuesta de un daño intenso o prolongado, lo que a su vez genera procesos inflamatorios (Khalid y Azimpouran, 2023). El efecto inductor de necrosis de los tratamientos con Q y BPA se observó por debajo del 10% (**Figura 11**). El porcentaje de citotoxicidad en el control positivo se vio aumentado debido al daño letal que muestra el tritón al 1% sobre las células HT-29. Kim et al. (2014), determinaron que una concentración de 100 μ M de Q durante 24 h en células HT-29 indujo el 5% de muerte por necrosis; además observaron que el porcentaje de muerte celular era dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Por su parte, el EFQ y su coexposición con el BPA muestran una citotoxicidad del 15%, mismo que no explica el restante 35% de la disminución de la viabilidad celular

observado anteriormente. Además, esta muerte por necrosis es debido a la Q y sus metabolitos, ya que el CF no genera esta respuesta. En cuanto al resultado con BPA, la disminución del porcentaje de células viables (**Figura 9**) podría atribuirse casi en su totalidad a la muerte por citotoxicidad. Por último, el porcentaje de muerte por necrosis producido por Q en coexposición con BPA no excede el 10%, por lo que se considera que en experimentos con líneas celulares este porcentaje de muerte no es significativo. Sin embargo, se sugiere que, aunque resulta bajo el porcentaje de necrosis, podría estar contribuyendo a la disminución en la proliferación total de dicha línea celular, junto con otros procesos de muerte celular incluyendo la necroptosis aún no evaluados. En este proceso necrótico la célula muere por un proceso regulado y controlado, manteniendo sus características morfológicas y en el cual, actúan proteínas específicas, similar al mecanismo apoptótico (Xu et al., 2018).

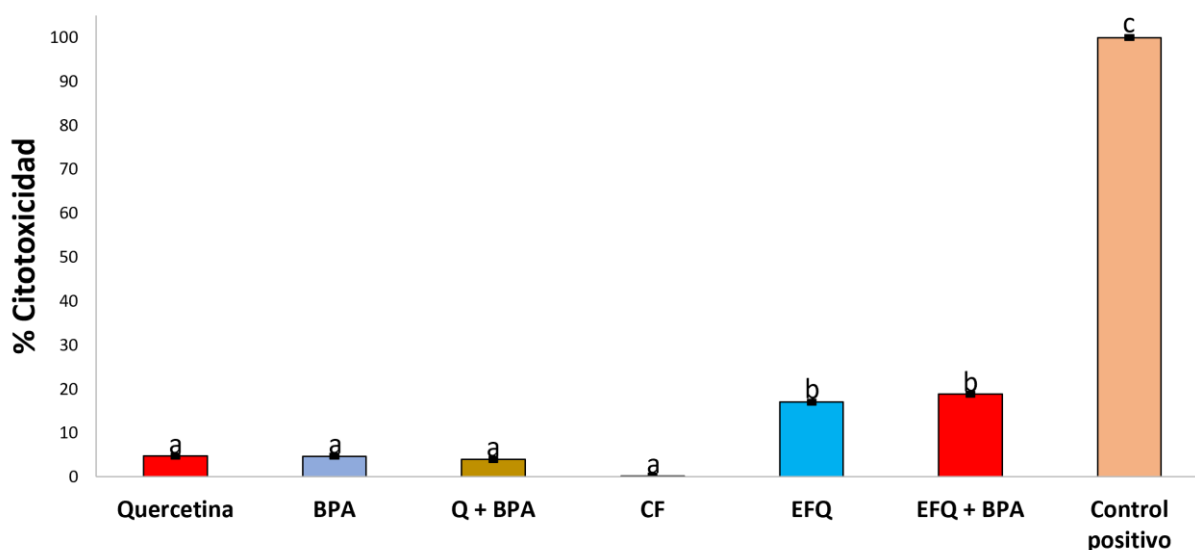


Figura 11. Efecto citotóxico de la Q y EFQ en células HT-29 tratadas con BPA. Concentración de tratamientos: HT-29: Q 160 μ M, BPA 4.4 μ M, EFQ 16%. Q: quercetina, BPA: bisfenol A, EFQ: extracto fermentado de quercetina, CF: control de fermentación. Cada valor representa tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa ($p < 0.0001$) por prueba de Tukey. Las células fueron normalizadas con el control negativo. Se usó Tritón X-100 como control positivo.

6.7 Efecto de la quercetina y su extracto de fermentación sobre los receptores estrogénicos de células HT-29 y SW480 expuestas a BPA.

La expresión de los receptores estrogénicos alfa (*ESR1*), beta (*ESR2*) y el receptor de membrana *GPR30* se puede observar en la **Figura 12**. Los resultados de la modulación en la expresión de genes *ESR2* y *GPR30* de los grupos control negativo, BPA, Q+BPA, CF, EFQ y EFQ+BPA, no mostraron diferencia significativa en comparación a los demás grupos. Por su parte, el tratamiento con Q mostró un aumento en la expresión de los genes *ESR2* y *GPR30* (+24 y +5-fold, respectivamente), en comparación a los demás grupos, incluyendo el EFQ (+6 y +2-fold, respectivamente). Esta discrepancia podría deberse a que el efecto en los genes sea exclusivamente de la quercetina y no de otro metabolito presentes en el FEQ, al haber una baja concentración de este fitoquímico en el extracto fermentado por consecuencia la respuesta génica también fue baja. Aunado a esto, los grupos Q+BPA (*ESR1* de +5-fold y *ESR2* de +6-fold), EFQ y EFQ+BPA (*ESR1* de +6-fold y *ESR2* de +8-fold) muestran una tendencia similar a la Q; lo cual podría indicar que en la célula bajo tratamiento con Q y EFQ, e inclusive bajo coexposición con el BPA, la función antiproliferativa de *ESR2* se encuentra predominante sobre la función proliferativa de *ESR1*.

Diversos estudios han mostrado en diferentes tipos cánceres, incluyendo cáncer de colon, que el receptor estrogénico alfa se encuentra sobreexpresado, mientras que el receptor estrogénico beta se encuentra regulado a la baja. En la línea celular HCT8 de cáncer de colon se observó que la sobreexpresión de *ESR2* inhibe la proliferación celular y aumenta la adhesión celular, proponiendo que el posible mecanismo de acción es mediante la disminución de la ciclina E, aumento del inhibidor de cdk p21Cip1, lo que a su vez bloquearía la progresión del ciclo celular en la fase G1-S (Martineti et al., 2005). Aunado a esto, la disminución significativa de la expresión de *ESR2* se ha relacionado con la presencia y estadio de pólipos colorrectales y tumores. En un estudio realizado por Barone et al. (2010), observaron que la reducción de la expresión de *ESR2* está asociada a tejido adenomatoso con alto nivel de displasia en comparación al tejido sano. En esta misma investigación encontraron que la disminución de *ESR2* trajo consigo reducción de la muerte celular

apoptótica y aumento en la proliferación celular. Es por ello por lo que se han buscado moléculas terapéuticas que ayuden a promover la expresión de este receptor y eviten o frenen la progresión del cáncer colónico. En este sentido, el tratamiento con Q podría inhibir la proliferación celular por medio del aumento en la expresión de *ESR2* y que a su vez podría competir con el BPA (+1-fold) debido a la tendencia observada en este estudio. Pampaloni et al. (2014), demostraron que polifenoles como la Q y la genisteína, a una concentración de 50 μM , inhiben la proliferación de células HCT8 mediante la sobreexpresión del *ESR2*. Además, en otro estudio en células de cáncer de colon DLD-1 transfectadas con *ESR2* se encontró que 1 μM de quercetina inhibe el crecimiento celular vía proapoptótica por medio de la activación de p38, caspasa-3 y escisión de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) (Bulzomi et al., 2012). Se ha observado que *ESR2* juega un papel importante sobre el tejido colónico y por ello se le considera una molécula protectora contra el desarrollo del cáncer de colon. Sin embargo, su actividad no es aislada ni individual debido a que durante la progresión del cáncer de colon la disminución de la expresión de *ESR2* es inversamente proporcional a la expresión de *ESR1*. Es por ello por lo que se propone que la proliferación celular es el resultado de un equilibrio entre alfa y beta (Principi, 2014). El aumento de la expresión del gen *ESR2* en relación con *ESR1* puede estar relacionado con la disminución observada previamente en la viabilidad celular y la detención del ciclo celular, observados la **Figura 9 y 10**, lo que podría conducir a la apoptosis, aún no evaluada. Por otro lado, la tendencia que muestra el grupo BPA es todo lo contrario, la expresión del receptor estrogénico alfa (+8-fold), se encuentra sobreexpresado en comparación al beta, por lo que a esta concentración el BPA estaría promoviendo la proliferación, misma que es mitigada por la Q (+5-fold) y el EFQ. El BPA es una molécula que imita la proliferación del 17β -estradiol en células cancerosas al unirse al *ESR1*. En células MCF-7 el BPA a una concentración de 10 μM aumentó la proliferación celular, incrementó la actividad de la ciclina D1, E1, N-cadherina, disminuyó a E-cadherina y aumentó la capacidad de migración, en comparación de células a las cuales se les añadió un inhibidor del receptor estrogénico (Kim et al., 2017). Por otro lado, Bolli et al., (2010), determinaron que el BPA a una concentración de 10 μM es capaz de

inhibir la actividad de proteínas proapoptóticas caspasa-3, PARP, inclusive en presencia de 17β -estradiol, en células DLD-1, previniendo la muerte celular y promoviendo la proliferación. En la presente investigación se ha propuesto a la Q como antagonista del BPA, sin embargo, hay otros compuestos fenólicos que han sido postulados por sus efectos potenciales. Uno de ellos la genisteína, esta molécula no solo ha exhibido su efecto antiproliferativo en células de cáncer de ovario BG-1, sino también se ha observado que inhibe la proteína ciclina D1 y promueve la actividad de la proteína p21, cuando se coloca en coexposición con el BPA (Hwang et al., 2013). Por su parte *GPR30* no se moduló en los grupos a excepción de la Q, es por lo tanto, que este gen al no ser blanco de Q+BPA (+0.6-fold) y EFQ+BPA (+1.5-fold), podría no estar contribuyendo al efecto antiproliferativo de la célula.

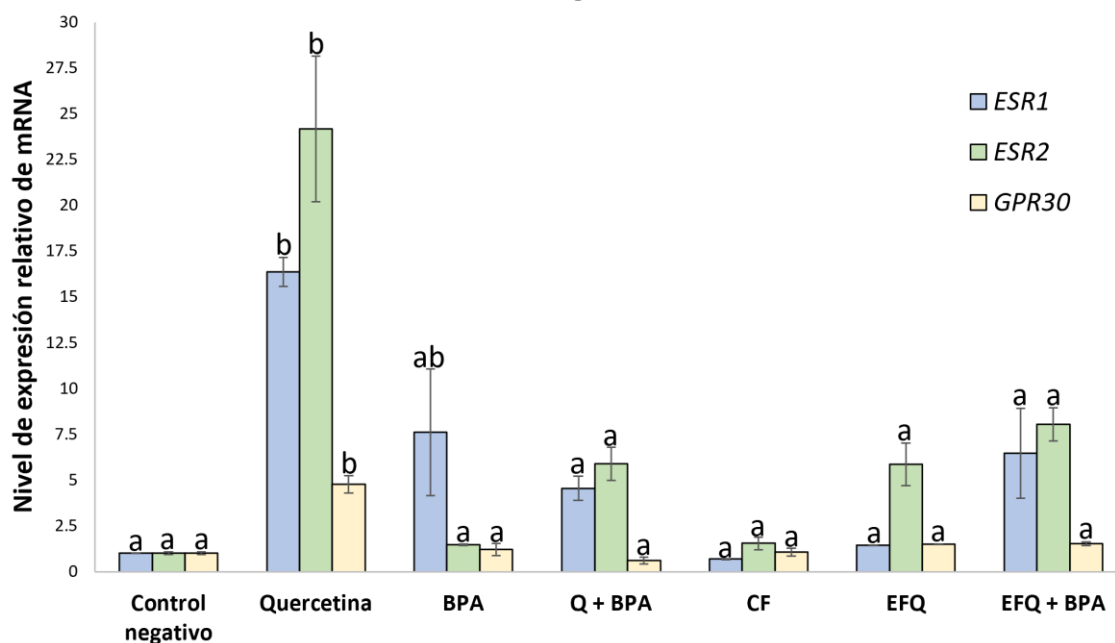


Figura 12. Efecto de la Q y EFQ en coexposición con el BPA en la expresión de receptores estrogénicos α , β y *GPR30* en células HT-29. Concentración de tratamientos: HT-29: Q 160 μ M, BPA 4.4 μ M, EFQ 16%. Q: quercetina, BPA: bisfenol A, EFQ: extracto fermentado de quercetina, CF: control de fermentación. Cada valor representa la media de un duplicado \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos por cada gen ($p < 0.04$) por prueba de Tukey. La expresión de los tratamientos fue normalizada con el gen constitutivo actina.

Los resultados obtenidos de la modulación del receptor estrogénico β por la Q y su extracto de fermentación solos o bajo coexposición con BPA en células de cáncer de colon SW480 se muestran en la **Figura 13**. Se puede apreciar que los tratamientos Q, EFQ, EFQ+BPA modulan positivamente el receptor estrogénico β . Interesantemente, el tratamiento con Q en coexposición con el BPA no fue capaz de generar una respuesta positiva sobre el receptor a diferencia de la quercetina sola, por lo que se sugiere que el BPA podría estar mitigando el efecto de este fitoquímico específicamente sobre este receptor, no obstante, la quercetina modula otras vías de señalización que un efecto global de inhibición de la viabilidad. Por otro lado, la modulación positiva del receptor por parte del EFQ podría deberse tanto a la quercetina como a sus metabolitos producidos durante su fermentación. Además, comparando los resultados obtenidos bajo la coexposición con BPA, la Q no generó una respuesta como lo hizo de forma individual, pero el EFQ si consiguió mantener el aumento de la expresión del receptor, por lo que se sugiere que los metabolitos de la quercetina en sinergia podrían ser los responsables de este efecto. Como ya se mencionó en la introducción, el receptor estrogénico β desempeña funciones mayoritariamente antiproliferativas dirigiendo al coloncito cerca del lumen o alterado hacia su muerte. La expresión de este receptor se ha observado disminuida en un contexto de cáncer de colon como una manera de sobrevivencia por parte de la célula. Es por este motivo que los resultados encontrados en este proyecto adquieren relevancia, debido a que al aumentar la expresión génica del receptor β por parte de los tratamientos con la quercetina y su extracto fermentado, podrían activarse vías de señalización que promuevan la muerte celular cancerosa.

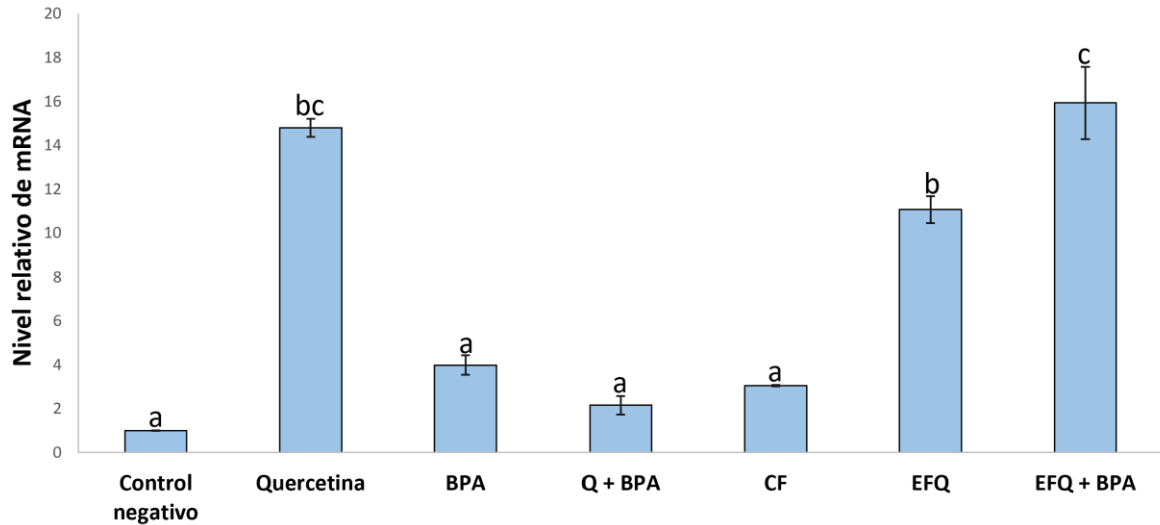


Figura 13. Efecto de la Q y EFQ en coexposición con el BPA en la expresión de receptores estrogénicos β en células SW480. Concentración de tratamientos: SW480: Q 162 μ M, BPA 4.4 μ M, EFQ 18%. Q: quercetina, BPA: bisfenol A, EFQ: extracto fermentado de quercetina, CF: control de fermentación. Cada valor representa la media de un duplicado \pm EE. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos por cada gen ($p < 0.0001$) por prueba de Tukey. La expresión de los tratamientos fue normalizada con el gen constitutivo actina.

6.8 Efecto de la quercetina y su extracto de fermentación sobre genes relacionados a la vía de señalización P53 de células HT-25 expuestas a BPA.

Se ha propuesto que la Q interviene en diferentes mecanismos de acción como inhibición de la proliferación y detención del ciclo celular, así como inducción de apoptosis. Para dilucidar los posibles mecanismos asociados con el efecto antiproliferativo de los tratamientos con Q y EFQ individuales y en coexposición con BPA, se evaluó la expresión de genes implicados en diversas vías de señalización molecular. La modulación de genes de la vía P53 se observa en el **Cuadro 3**. Para mayor comprensión se dividió de acuerdo con los principales procesos celulares involucrados. Mediante el arreglo de genes relacionados a la vía de señalización de P53 se observó que el tratamiento con Q induce la expresión de genes proapoptóticos *APAF1* (+2.28-fold), *FASLG* (+3.23-fold), *TP53AIP1* (+3.23-fold), *TNF* (+3.23-fold) y *TPG3* (+3.23-fold). El BPA inhibió la expresión de genes proapoptóticos *APAF-1* (-29.01-fold), *CASP2* (-2.80-fold), *CASP9* (-3.36-fold), *FADD*

(-119.69-fold), *FAS* (-5.53-fold), *FOXO3* (-5.53-fold). Al igual que la Q, el tratamiento con Q+BPA moduló positivamente los genes *FASLG* (+2.45-fold), *TP53AIP1* (+2.47-fold), *TNF* (+2.47-fold) y *TPG3* (+2.47-fold). EFQ indujo la expresión de *TNF* (+7.80-fold); mientras que EFQ+BPA moduló positivamente a *FASLG* (+5.00-fold), *TP53AIP1* (+5.00-fold), *TNF* (+5.00-fold) y *TPG3* (+5.00-fold). Integrando los resultados anteriores, se sugiere que existe cierta similitud entre los tratamientos con Q, EFQ y su coexposición con BPA pues hay genes cuya sobreexpresión se mantiene entre estos tratamientos, estos genes son *TNF*. En este sentido, el gen *TNF* y posterior proteína podría desencadenar junto con *FASLG* la vía extrínseca de las caspasas o vía intrínseca al modular a *APAF-1*. Por un lado, el receptor de muerte membranaral *TNFR* estimula la expresión de genes diana como el *FASLG*, el cual a su vez inicia la apoptosis tras su unión con el receptor *FAS*, lo que estimula la adaptación de *FADD* y la interacción de su región N-terminal con el precursor de caspasa-8. Una vez activada la procaspasa-8 mediante la degradación proteolítica se desencadena una señal de activación de la caspasa 3 directamente o de vía mitocondrial (Zhang y Bhavnani 2006). Por otro lado, tras dañarse el material genético, la activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak conducen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, lo que promueve la salida de proteínas incluyendo el citocromo c. Esta proteína junto con el factor activador de proteasa apoptótica 1 (Apaf-1) forman el apoptosoma, que posteriormente, activará al precursor de la caspasa-9 y esta a su vez a la caspasa 3 (Gortat et al., 2015; Yuan et al., 2011). Estudios previos demostraron un efecto anticancerígeno de Q al activar la vía intrínseca de las caspasas a través de la inducción de *BAX*, *BAD*, citocromo c y *APAF-1*, en donde Q inhibió la expresión de ciclina-D1, lo que provocó el arresto del ciclo celular (Luo et al., 2016). En este mismo estudio utilizando células de cáncer de próstata LNCaP se encontró que la Q a 100 μ M produjo una disminución de la fosforilación de las proteínas de supervivencia Akt, además de un aumento en la traslocación de Bax a la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c, activación de las procaspasas-3, -8, -9 y finalmente desencadenando la apoptosis. En células de cáncer cervicouterino HeLa se observó que la Q a 90 μ M inhibió la expresión antiapoptótica de las proteínas Akt y Bcl-2, mientras que aumentó los niveles de

citocromo c mitocondrial con despolarización del potencial de membrana mitocondrial, y la actividad de la caspasa-3. Esto indujo una disminución de la proliferación celular, arresto del ciclo celular en la fase G2/M y apoptosis (Bishayee et al., 2012). Asimismo, la Q a 160 μ M fue capaz de inducir apoptosis de células de cáncer gástrico AGS por medio de la inhibición de las proteínas mcl-1, bcl-2 y bcl-x, pero aumentó a bad, bax y bid (Shang et al., 2018). En cuanto a la vía extrínseca de las caspasas, Q no se ha estudiado en detalle, pero se ha encontrado que los fitoquímicos en general pueden actuar sobre *FAS*, *FADD* y caspasa 8 para inducir la apoptosis (Ahmed et al., 2019). Si bien no se observa un aumento en los genes de las caspasas por los tratamientos con la quercetina, EFQ+BPA, no significa que no tengan relevancia biológica. En adición a esto, los tratamientos con Q, Q+BPA y EFQ+BPA podrían inducir la muerte celular y consecuente disminución de la viabilidad observada anteriormente, mediante la modulación positiva de la expresión del gen *TP63* independiente de *p53*. En una de tantas investigaciones realizadas con Q, se observó que su efecto anticancerígeno se debía a la activación de la vía intrínseca de las caspasas por medio de la inducción de los genes *BAX*, *BAD*, citocromo c y el factor activador de la proteasa apoptótica 1 (*APAF-1*). Además, la Q inhibió la expresión de ciclina-D1, lo que generó el paro del ciclo celular (Luo et al., 2016). En cuanto a la vía extrínseca de las caspasas, la Q no ha sido evaluada a profundidad, sin embargo, se ha visto que los fitoquímicos en general son capaces de actuar sobre *FAS*, *FADD* y caspasa 8, desencadenando posteriormente la apoptosis (Ahmed et al., 2019). Mientras que la Q y su extracto fermentado muestran efecto proapoptótico, el BPA por el contrario pareciera estar inhibiéndolo mediante la disminución de la expresión de los genes *FADD*, *FAS* y vía intrínseca por la reducción en la expresión de las caspasas *CASP2* y *CASP9* y *APAF-1*. Estos resultados sugieren que el efecto global causado por la inducción de genes proapoptóticos y/o la inhibición de genes antiapoptóticos por la Q y el EFQ podrían estarse sobreponiendo al efecto contrario del BPA durante la coexposición. Debido a que el BPA no ha sido tan estudiado en colon sino en órganos sexuales, Dairkee et al. (2013), encontraron que el BPA tiene efectos antiapoptóticos al reducir la expresión de los genes *P53*, *P21* y *BAX*, en la línea T47D de cáncer de mama. Por

otro lado, se observa que Q moduló negativamente los genes que promueven la progresión del ciclo celular *CDKN1A* (-2.02-fold) y positivamente a *EGR1* (+2.62-fold), *GML* (+3.23-fold), *MYOD1* (+3.23-fold) y *TP73* (independiente de p53) (+3.23-fold). El tratamiento con Q+BPA indujo la expresión de los genes *GML* (+2.47-fold), *MYOD1*(+2.47-fold) y *TP73* (+2.47-fold). Por su parte, EFQ también inhibió la progresión del ciclo celular al modular positivamente *EGR1* (+2.63-fold), pero su coexposición con BPA inhibió los genes *CDKN1A* (-2.68-fold), *E2F3* (-2.15-fold), *NFKB1* (-2.19-fold) e indujo a *GML* (+5.00-fold), *MYOD1* (+5.00-fold), *TP73* (+5.00-fold). La modulación de los genes anteriormente mencionados por los tratamientos con Q, EFQ y su coexposición con BPA desencadenarían el arresto al ciclo celular observado en resultados anteriores. De acuerdo con varios estudios se ha visto que, dependiendo de la línea celular de cáncer colorrectal usada, será el tipo de fase de detención del ciclo celular y por tanto los genes modulados por la quercetina. Ejemplo de ello, en una investigación realizada por Yang et al., (2016), descubrieron que usando la línea HT-29, la quercetina a una concentración de 82µM y bajo 48 h se arrestaba el ciclo celular en la fase G0/G1. El tratamiento con BPA evita la detención del ciclo celular por inhibición de los genes *ATM* (-14.22-fold), *ATR* (-2.62-fold), *BRCA2* (-45.11-fold), *BTG2* (-5.55-fold), *PPM1D* (-4.83-fold), *PTEN* (-2.32-fold) y permite su progresión por inducción de *CCNH* (+2.26-fold), *E2F1* (+2.16-fold). Como se mencionaba anteriormente una de las acciones del BPA es la evasión de apoptosis, pero también promueve la proliferación celular mediante la inducción de ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas, fosforilación del retinoblastoma, inhibición de *PTEN*, entre otros (Dairkee et al., 2013; Goodson et al., 2011). Finalmente, se observa que la Q inhibe procesos angiogénicos al inducir a *ADGRB1*, evitando que la célula cancerosa tome nutrientes para sobrevivir, además evita la promoción de tumores al modular negativamente a *STAT1* (-2.06-fold), positivamente al supresor de tumores *WT1* (+3.23-fold) e inhibir la trascrición por inhibir la expresión del gen *TADA3* (-11.94-fold). El tratamiento con Q+BPA coincide con la Q al modular a *WT1*. EFQ promueve al igual que la Q la modulación de *ADGRB1* (+2.19-fold) y *STAT1* (-2.26-fold); mientras que FEQ+BPA induce a *ADGRB1* (+2.93-fold), *WT1* (+5.00-fold).

Cuadro 3. Nivel de expresión (*fold-change*) de genes relacionados a la vía de señalización de *p53* de células HT-29 tratadas con 160.63µM de Q, 16% de EFQ, 4.4µM de BPA, coexposición Q+BPA o coexposición EFQ+BPA con relación al control (regulación positiva +, regulación negativa -).

Símbolo	Descripción	Q	BPA	Q + BPA	EFQ	EFQ + BPA
		<i>Fold Change</i>				
Genes asociados con la muerte celular programada (apoptosis)						
<i>APAF1</i>	Apoptotic peptidase activating factor 1 (pro-apoptosis)	2.28	-29.02	1.52	1.37	-1.57
<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein (pro-apoptosis)	1.61	1.48	1.07	-1.14	-1.08
<i>BBC3</i>	BCL2 binding component 3 (pro-apoptosis)	1.38	-1.15	1.28	-1.42	1.10
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2 (anti-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>BCL2A1</i>	BCL2-related protein A1 (anti-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>BID</i>	BH3 interacting domain death agonist (pro-apoptosis)	-1.12	1.40	-1.65	1.07	-1.04
<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat containing 5 (anti-apoptosis)	-1.41	-6.40	1.19	1.27	1.16
<i>CASP2</i>	Caspase-2, apoptosis-related cysteine peptidase (pro-apoptosis)	1.54	-2.80	1.16	-1.07	-1.02
<i>CASP9</i>	Caspase-9, apoptosis-related cysteine peptidase (pro-apoptosis)	1.67	-3.36	1.02	1.16	1.06
<i>CRADD</i>	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain (pro-apoptosis)	-1.04	1.42	-1.36	-2.08	1.49
<i>EI24</i>	Etoposide induced 2.4 mRNA (pro-apoptosis)	-1.28	-1.75	-1.83	-1.25	-1.47
<i>FADD</i>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain (pro-apoptosis)	-7.83	-119.69	-1.25	-1.21	-1.24
<i>FAS</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6) (pro-apoptosis)	1.34	-5.53	1.57	1.22	-1.47
<i>FASLG</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6) (pro-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>FOXO3</i>	Forkhead box O3 (pro-apoptosis)	-2.59	-5.53	-1.24	-1.04	-1.15
<i>HK2</i>	Hexokinase 2 (anti-apoptosis, growth induction)	-1.02	1.00	-1.23	-1.37	-1.32
<i>IGF1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor (anti-apoptosis)	-1.00	1.31	-1.38	-1.57	-1.54
<i>KRAS</i>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (pro-apoptosis)	12.43	40.23	88.50	70.48	75.71
<i>MCL1</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) (anti-apoptosis)	1.52	-2.11	1.05	1.04	-1.81
<i>MDM4</i>	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse) (anti-apoptosis)	-1.14	-1.86	-1.27	-1.16	-1.14
<i>PIDD1</i>	P53-induced death domain protein (pro-apoptosis or survival is isoform-dependent)	1.15	-1.29	1.02	-1.35	-1.72
<i>PRKCA</i>	Protein kinase C, alpha (regulation of cell proliferation, apoptosis, differentiation, migration, adhesion, angiogenesis)	1.31	-1.38	-1.10	-1.14	-1.31
<i>SIAH1</i>	Seven in absentia homolog 1 (Drosophila) (pro-apoptosis)	-1.44	-1.10	-1.50	-1.24	-1.37
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor (anti- and pro-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	7.80	5.00
<i>TNFRSF10B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (pro-apoptosis)	-1.02	1.04	-1.19	1.08	-1.06

<i>TNFRSF10D</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain (anti-apoptosis)	1.62	-1.35	-1.09	-1.25	1.06
<i>TP53</i>	Tumor protein p53 (cell cycle regulation and apoptosis)	1.12	1.05	-1.36	-1.75	-1.73
<i>TP53AIP1</i>	Tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1 (pro-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>TP53BP2</i>	Tumor protein p53 binding protein, 2 (pro-apoptosis)	1.38	1.54	-1.03	-1.12	-1.05
<i>TP63</i>	Tumor protein p63 (pro-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>TRAF2</i>	TNF receptor-associated factor 2 (anti-apoptosis)	1.13	1.07	-1.15	-1.20	-1.11
Genes asociados con el ciclo celular						
<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia mutated (cell cycle inhibition)	1.46	-14.22	1.37	1.42	-1.18
<i>ATR</i>	Ataxia telangiectasia and Rad3 related (cell cycle inhibition)	1.24	-2.62	-1.14	1.06	-1.01
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1, early onset (cell cycle inhibition)	-2.67	1.17	-1.66	-1.35	-1.21
<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2, early onset (cell cycle inhibition)	-18.56	-45.11	-3.04	-1.24	-1.79
<i>BTG2</i>	BTG family, member 2 (cell cycle inhibition)	1.03	-5.55	-1.57	-1.44	-1.47
<i>CCNB1</i>	Cyclin B1 (cell cycle regulation)	1.54	-1.02	1.05	1.07	1.23
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1 (cell cycle regulation)	1.19	1.72	-1.20	1.30	1.06
<i>CCNG1</i>	Cyclin G1 (cell cycle regulation)	-1.08	1.22	-1.18	-1.66	-1.51
<i>CCNH</i>	Cyclin H (cell cycle regulation)	1.64	2.26	1.18	1.25	1.21
<i>CDC25A</i>	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (cell cycle regulation)	-1.24	-2.06	-1.80	-1.06	-1.36
<i>CDC25C</i>	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe) (cell cycle regulation)	1.37	1.22	1.13	-1.13	1.22
<i>CDK1</i>	Cyclin-dependent kinase 1 (cell cycle regulation)	-1.19	-6.22	-1.31	-1.32	-1.30
<i>CDK4</i>	Cyclin-dependent kinase 4 (cell cycle regulation)	-1.38	1.26	-1.60	-1.70	-1.57
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (cell cycle regulation)	-2.02	-2.58	1.24	1.84	2.08
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4) (cell cycle regulation)	2.00	-9.67	1.46	1.23	-2.68
<i>CHEK1</i>	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) (cell cycle regulation)	1.59	-6.20	-1.01	1.02	-1.19
<i>CHEK2</i>	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe) (cell cycle regulation)	1.31	-2.02	-1.16	-1.10	-1.22
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1 (cell cycle induction)	1.36	2.16	-1.11	1.08	1.01
<i>E2F3</i>	E2F transcription factor 3 (cell cycle induction)	-1.41	1.20	-1.74	-1.77	-2.15
<i>EGR1</i>	Early growth response 1 (regulation of the cell cycle, proliferation, and cell death)	2.62	1.99	-1.05	2.63	-1.07
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (cell cycle inhibition)	-14.67	1.07	-3.67	-2.49	-1.90
<i>GML</i>	Glycosylphosphatidylinositol anchored molecule-like protein (cell cycle inhibition, pro-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>MDM2</i>	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse) (cell cycle induction)	1.58	-1.65	-1.09	-1.23	-1.09
<i>MLH1</i>	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (<i>E. coli</i>) (cell cycle inhibition)	1.60	1.32	-1.02	-1.18	-1.35
<i>MSH2</i>	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>E. coli</i>) (cell cycle inhibition)	1.10	1.51	-1.43	-1.03	-1.34
<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (cell cycle inhibition)	1.36	2.06	1.06	1.06	1.06
<i>MYOD1</i>	Myogenic differentiation 1 (cell cycle inhibition)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00

<i>NF1</i>	Neurofibromin 1 (cell cycle inhibition, proliferation inhibition, survival inhibition)	1.06	1.30	-1.21	-1.20	-1.32
<i>NFKB1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (cell cycle inhibition, proliferation inhibition, survival inhibition)	-1.03	1.06	-1.57	-1.69	-2.19
<i>PPM1D</i>	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D (cell cycle inhibition)	-1.37	-4.83	-1.38	-1.29	-1.42
<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen (cell cycle induction)	1.05	1.31	-1.34	1.06	-1.25
<i>PRC1</i>	Protein regulator of cytokinesis 1 (cell cycle induction)	1.46	-1.81	-1.05	-1.12	-1.33
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog (cell cycle inhibition, proliferation inhibition, survival inhibition, migration inhibition)	-2.12	-2.32	-1.25	-1.27	-1.26
<i>PTTG1</i>	Pituitary tumor-transforming 1 (cell cycle induction)	1.89	1.11	1.56	1.52	1.52
<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1 (cell cycle inhibition)	1.29	1.41	-1.24	-1.66	-1.55
<i>RPRM</i>	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate (cell cycle inhibition)	1.02	-1.09	-1.79	-1.38	1.13
<i>TADA3</i>	Transcriptional adaptor 3 (cell cycle induction, acetylation)	-11.94	1.16	1.08	-1.28	-1.19
<i>TP73</i>	Tumor protein p73 (pro-apoptosis)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
Genes asociados con angiogenesis, inflamaci3n, autofagia, acetilaci3n, metilaci3n y supresi3n tumoral						
<i>ADGRB1</i>	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (angiogenesis inhibition)	2.18	-1.53	1.32	2.19	2.93
<i>DNMT1</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (methylation)	1.29	1.67	-1.24	-1.01	-1.11
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor (proliferation induction)	1.14	1.54	-1.16	-1.29	-1.15
<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1 (proliferation induction)	3.23	1.77	2.47	1.46	7.16
<i>HDAC1</i>	Histone deacetylase 1 (deacetylation)	1.25	1.42	-1.10	-1.35	-1.13
<i>IL6</i>	Interleukin 6 (interferon, beta 2) (pro-inflammation)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene (growth regulation)	-1.11	-4.72	-1.39	-1.34	-1.93
<i>KAT2B</i>	K(lysine) acetyltransferase 2B (acetylation)	-1.21	1.04	-1.09	-1.86	-1.09
<i>RELA</i>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) (growth regulation)	1.49	1.68	1.05	1.00	1.09
<i>SESN2</i>	Sestrin 2 (autophagy induction)	-1.50	1.09	-1.97	-1.58	-1.67
<i>SIRT1</i>	Sirtuin 1 (anti- and pro-tumorogenic)	-1.24	1.67	-1.61	-1.17	-1.04
<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (anti- and pro-tumorogenic)	-2.06	1.34	-1.92	-2.26	-1.72
<i>TSC1</i>	Tuberous sclerosis 1 (tumor suppressor)	-1.03	1.19	-1.10	-1.04	-1.11
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1 (tumor suppressor)	3.23	1.33	2.47	1.46	5.00
<i>XRCC5</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining) (DNA repair)	-1.72	1.31	-1.03	1.01	-1.02

Los n3meros en negritas indican al menos ± 2 veces el cambio comparado con el control. Como genes constitutivos se usaron β -Actina, GAPDH, and β -2-microglobulina.

6.9 Acoplamiento molecular *in silico* de quercetina y BPA por los receptores estrogénicos α y β .

Para darnos un panorama general de lo que podría estar ocurriendo en la interacción de los ligandos estudiados con los receptores alfa y beta se realizó un análisis de acoplamiento molecular *in silico* (**Figura 14**). En este estudio se seleccionaron las afinidades de unión más altas por cada interacción ligando-proteína y se observaron las estructuras 3D de los ligandos con los respectivos aminoácidos de cada receptor. En primer lugar, podemos observar que las afinidades de unión se encuentran entre -11.19 kcal/mol (Figura 14B) y -5.66 (Figura 14F). Las afinidades de unión más altas corresponden al 17- β estradiol y su interacción con ambos receptores (Figura 14A, 14B), seguido de la Q (Figura 14C, 14D), el BPA (Figura 14G, 14H) y finalmente el DOPAC (Figura 14E, 14F). El 17- β estradiol es el ligando endógeno de los receptores estrogénicos (de -10.53 kcal/mol para ER α y -11.19 kcal/mol para ER β) por lo cual no debería sorprendernos que su afinidad de unión sea la más alta. Sin embargo, este resultado nos ayuda como medio de comparación para los tratamientos propuestos. La Q fue el segundo ligando más afín para ambos receptores (de -8.21 kcal/mol para ER α y -8.83 kcal/mol para ER β), su estructura interaccionó con los aminoácidos del ER α leucina 525, 428, 387, 391, histidina 542, glicina 521, metionina 421, isoleucina 424, fenilalanina 404, ácido glutámico 353 y arginina 394. Particularmente los aminoácidos leucina 525, 391, isoleucina 424, ácido glutámico 353, arginina 394, histidina 524 y glicina 521 del ER α que interaccionan con la Q también lo hace con el 17- β estradiol, por lo que se sugiere que ambas moléculas pueden ocupar parte del mismo sitio activo. En cuanto al ER β , la Q interaccionó con los aminoácidos metionina 295, 336, 340, treonina 299, leucina 301, 298, 476, histidina 475, glicina 472, arginina 346, ácido glutámico 305 y fenilalanina 356. En este caso los aminoácidos que interaccionan tanto con Q como con 17- β estradiol fueron metionina 336, 340, histidina 475, glicina 472, arginina 345, ácido glutámico 305 y fenilalanina 356, ocurriendo el mismo fenómeno de ocupación del sitio activo. Además, podemos darnos cuenta de que la afinidad de la Q por el ER β es ligeramente más alta que por el ER α , esto genera un desbalance a favor del ER β podría activar señales intracelulares que lleven a la célula a su muerte. Esta situación

podría estar ligada a la expresión génica observada en la Figura 12, en la cual de igual manera la inducción de la expresión de *ESR2* por efecto la Q es superior al *ESR1* y esto a su vez podría activar la expresión de genes que promueven la muerte celular (**Cuadro 3**), desencadenar el arresto al ciclo celular en la fase G0/G1 (**Figura 10**) y como consecuencia disminución de la viabilidad (**Figura 5**).

En los últimos años, se han buscado moléculas de origen natural que puedan ocupar el sitio de acción de los receptores estrogénicos como lo hace 17- β estradiol. Tal es el caso del kaempferol el cual, a través de un ensayo *in silico* se observó que puede interactuar con el ER α mostrando una afinidad de unión de -7.0 kcal/mol, la cual es menor a la generada por la Q; además, de los aminoácidos con los cuales interacciona el kaempfero se observó que la leucina 525 coincide con la Q (Yani et al., 2019). En otro estudio de análisis *in silico*, se demostró que los lignanos genisteína, daidzeina, enterodiol y arctigenin son capaces de interactuar con el ER α con lo aminoácidos ácido glutámico 353, fenilalanina 404, metionina 421, histidina 524, leucina 525 y arginina 394, de los cuales todos excepto la fenilalanina, interaccionan con la Q (Aehle et al., 2011). Por otro lado, de los aminoácidos del ER α y su interacción con el compuesto DOPAC, únicamente el ácido glutámico 353 se repite en su interacción con quercetina y 17- β estradiol, es quizás por lo cual la afinidad de unión del DOPAC por este receptor no es tan potente como es con la Q y el estradiol. Esta tendencia se repite con el ER β pues únicamente el ácido glutámico 305 interacciona con el DOPAC al igual que la Q y el 17- β estradiol. A pesar de que el DOPAC no muestra alta afinidad por los receptores estrogénicos alfa y beta, el efecto del FEQ sobre la disminución de la viabilidad (**Figura 6**) el arresto al ciclo celular en la fase S y G2/M (**Figura 10**), la tendencia de aumento del *ESR1* por sobre el *ESR2* (**Figura 12**) y activación de genes responsables de la muerte celular (**Cuadro 3**), podría deberse en su mayoría a la Q, pero también a la presencia del DOPAC. Finalmente, el BPA muestra una afinidad de unión para ambos receptores superior al DOPAC, pero inferior a la Q y al 17- β estradiol. Los aminoácidos del ER α que interaccionan con el BPA y que coinciden con la Q son la fenilalanina 404, leucina 391, arginina 394, leucina 387 y ácido glutámico 353. Mientras que los aminoácidos leucina 391, 384, arginina 394, leucina 384 y ácido

glutámico del receptor alfa coinciden con su interacción con el 17- β estradiol; es decir, el BPA solo coincide en 4 aminoácidos con el 17- β estradiol al interactuar con el ER α , en contraste con los 7 aminoácidos que coinciden la Q y el 17- β estradiol. En cuanto al ER β , el BPA coincide con la Q en los aminoácidos ácido glutámico 305, metionina 340, 336, fenilalanina 356, leucina 476, glicina 472, histidina 475; y con el 17- β estradiol en los aminoácidos ácido glutámico 305, metionina 340, 336, fenilalanina 356, glicina 472 y leucina 380. Por lo tanto, el BPA coincide en 6 aminoácidos del ER β con respecto al 17- β estradiol en contraste con los 7 aminoácidos que coinciden la Q y 17- β estradiol. Es importante señalar que el BPA coincide con la Q en 5 y 7 aminoácidos en las proteínas ER α y ER β , respectivamente, por lo que se sugiere que ambas moléculas están compitiendo por el mismo sitio activo, pero es la Q la que al mostrar mayor afinidad de unión podría ocupar la cavidad y desencadenar la respuesta biológica observada en los tratamientos de coexposición Q+BPA y FEQ+BPA en los ensayos de viabilidad (**Figura 5**), análisis del ciclo celular (**Figura 10**) y expresión génica de muerte celular (**Cuadro 3**). Es importante resaltar que si bien los análisis *in silico* son una herramienta que nos ayuda a determinar la afinidad de interacción entre ligando y receptor, tiene limitaciones y, por lo tanto, es necesario desarrollar experimentos que demuestren la activación o inhibición molecular.

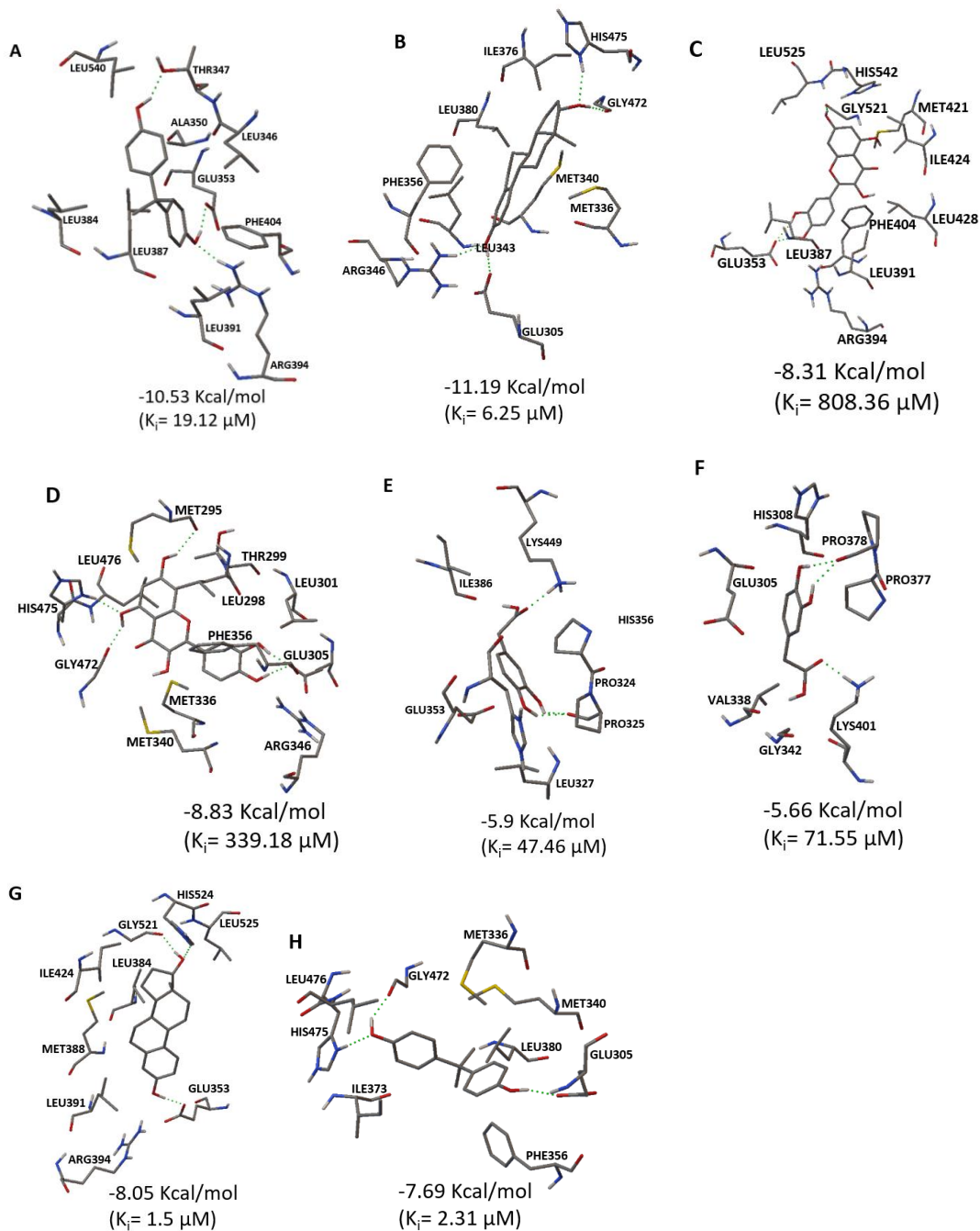


Figura 14. Análisis de acoplamiento molecular *in silico* entre ligandos y receptores. El mejor acoplamiento entre (A) 17- β estradiol-ER α , (B) 17- β estradiol-ER β , (C) Q-ER α , (D) Q-ER β , (E) DOPAC-ER α , (F) DOPAC-ER β , (G) BPA-ER α , and (H) BPA-ER β . Las imágenes representan la interacción entre ligandos y aminoácidos del receptor. El valor de ΔG indica la energía de unión expresada en kcal/mol. La constante de inhibición (K_i) por cada interacción es expresada en μ M.

Los hallazgos obtenidos en este estudio sugieren un mecanismo de acción general (Figura 15) que involucra varios procesos biológicos. Por una parte, los resultados de la expresión génica indican que los tratamientos podrían participar en las vías intrínseca y extrínseca de las caspasas; Q, Q+BPA, EFQ y EFQ+BPA promoviendo su activación con posterior apoptosis, mientras que BPA podría inhibir ambas vías y evitar la muerte celular programada. Así mismo, la citometría de flujo y la expresión génica en el ciclo celular refuerzan estos resultados. Q, Q+BPA, EFQ y EFQ+BPA desde varios puntos evitan la progresión del ciclo celular lo que podría desencadenar en la inhibición celular con su consecuente muerte; sin embargo, el BPA parece tener el efecto contrario promoviendo que la célula continúe con su ciclo celular. Esto nos ayuda entender como la Q y su FEQ ejercen efecto anticancerígeno aún en presencia de BPA. Quedan por esclarecer los mecanismos alternativos que intervienen en los procesos desencadenados por fitoquímicos para mitigar el daño causado por disruptores como el BPA.

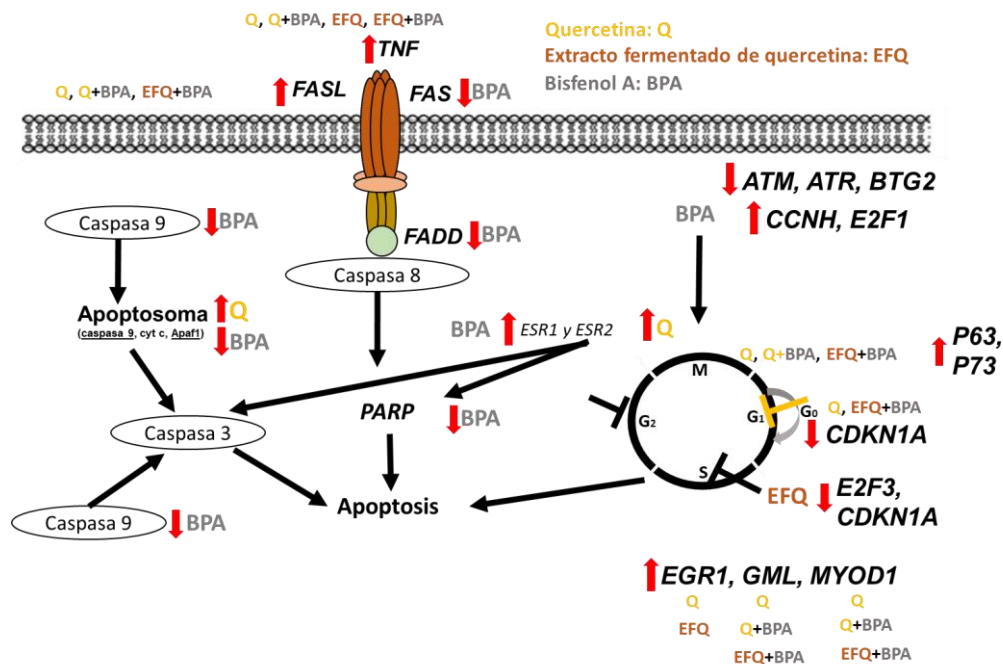


Figura 15. Mecanismo de acción propuesto que explica como Q, EFQ, Q+BPA and EFQ+BPA promueve la inhibición celular evitando el efecto del BPA en células HT-29. Letras amarillas indican los procesos realizados por la Q, en café por EFQ, y en gris por el BPA. Flechas rojas que apuntan hacia arriba indican regulación positiva y las flechas hacia abajo indican regulación negativa. Las palabras resaltadas en negro corresponden a los resultados encontrados en este estudio.

VII. CONCLUSIONES

El metabolito que se logró cuantificar en el EFQ fue el DOPAC además de la quercetina. La capacidad antioxidante por medio de DPPH y ORAC se cuantificó en el EFQ de 6, 12 y 24 h, mostrando diferencias entre concentraciones la Q pura y el EFQ a las 24 h, esto denota los principios que utiliza cada técnica. La Q y DOPAC mostraron capacidad antioxidante que se sugiere está contribuyendo al efecto anticancerígeno total en las células estudiadas. Los resultados del estudio *in vitro* muestran que la Q inhibe la viabilidad de células de cáncer de colon HT-29 y SW480 dependiente del aumento de la concentración, con una IC₅₀ de alrededor de 160 µM bajo 48 h de tratamiento. Esta concentración en células 3T3-L1 y CCD-112CON causa inhibición de la viabilidad en un 35% y 10%, respectivamente. El EFQ en las líneas HT-29 y SW480 inhibe la viabilidad celular dosis-respuesta con una IC₅₀ de 15.98% y 17.92%, respectivamente. El BPA a la concentración de 4.4 µM y durante una incubación por 48 h induce viabilidad en células SW480 y la inhibe en HT-29, entre un 10 a 15%. La coexposición de Q y EFQ con el BPA, sobre las líneas de cáncer de colon inhiben la viabilidad similar a lo encontrado en los resultados únicamente de quercetina y EFQ. Esto demuestra que la quercetina inhibe la viabilidad celular de manera individual y en coexposición con BPA. De acuerdo con los resultados la Q y EFQ solos o en coexposición con el BPA induce arresto al ciclo celular en distintas fases. En cuando a la respuesta génica, los resultados muestran que la Q es capaz de modular positivamente la expresión del receptor estrogénico β antiproliferativo y GPR30 en células HT-29, y en SW480 al igual que el EFQ y EFQ+BPA, lo que podría conducir a la muerte celular asociada a la disminución de la viabilidad. Aunado a esto, se observó en general que los tratamientos con Q y EFQ solos o en coexposición con BPA, modulan positivamente la expresión de receptores asociados a la apoptosis y arresto al ciclo celular; mientras que BPA inhibió la expresión de genes proapoptóticos y aquellos que reprimen al ciclo celular. Mediante este estudio se observó el poder anticancerígeno de la Q y su extracto fermentado en células de cáncer de colon aún en presencia del BPA, mediante estudios celulares y moleculares. Finalmente, el análisis *in silico* reveló que la Q tiene mayor afinidad de unión por los ERα y ERβ que el BPA, mientras que el DOPAC fue la molécula con

menor afinidad de unión por los receptores. La quercetina mostró mayor afinidad de unión por el ER β que por el ER α , esto sugiere que este disruptor natural podría desencadenar vías de muerte celular mediante su fuerte interacción con el receptor proapoptótico beta y a su vez evitando que el BPA ejerza efecto sobre el receptor antiapoptótico alfa cuando se colocan en coexposición ambas moléculas. Aún quedan por esclarecer mecanismos alternos que intervengan en procesos desencadenados por fitoquímicos para mitigar el daño causado por disruptores como el BPA.

VIII. REFERENCIAS

- Abdelmoaty, M. A., Ibrahim, M. A., Ahmed, N. S., & Abdelaziz, M. A. (2010). Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. *Indian journal of clinical biochemistry*. *IJCB*, 25(2), 188–192. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0034-x>
- Aehle, E., Müller, U., Eklund, P. C., Willför, S. M., Sippl, W., & Dräger, B. (2011). Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, 72(18), 2396–2405. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.013>
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Ahmed, K., Zaidi, S. F., Cui, Z. G., Zhou, D., Saeed, S. A., & Inadera, H. (2019). Potential proapoptotic phytochemical agents for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Oncology letters*, 18(1), 487–498. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10349>
- Arambula, S. E., and Patisaul, H. B. (2018). Endocrine disrupting chemicals and behavior. *Encycl. Endocr. Dis.* 1, 812–820. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65191-7>
- Arvelo, Francisco, Sojo, Felipe, & Cotte, Carlos. (2016). Contaminación, disruptores endocrinos y cáncer. *Investigación Clínica*, 57(1), 77-92.
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological chemistry*, 390(3), 191–214. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>
- Bao, D., Wang, J., Pang, X., & Liu, H. (2017). Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(7), 1122. <https://doi.org/10.3390/molecules22071122>
- Barone, M., Scavo, M. P., Papagni, S., Piscitelli, D., Guido, R., Di Lena, M., Comelli, M. C., & Di Leo, A. (2010). ER β expression in normal, adenomatous and carcinomatous tissues of patients with familial adenomatous polyposis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 45(11), 1320–1328. <https://doi.org/10.3109/00365521.2010.487915>
- Bergman, A., Heindel, J. J., Kasten, T., Kidd, K. A., Jobling, S., Neira, M., Zoeller, R. T., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., Kortenkamp, A., Muir, D., Drisse, M. N., Ochieng, R., Skakkebaek, N. E., Byléhn, A. S., Iguchi, T., Toppari,

- J., & Woodruff, T. J. (2013). The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. *Environmental health perspectives*, 121(4), A104–A106. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205448>
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2011). USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3. US Department of Agriculture: Beltsville, MD, USA, 159.
- Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K. I., Bobzean, S. A., Perrotti, L. I., & Mandal, S. S. (2014). Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 141, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.002>
- Bilancio, A., Bontempo, P., Di Donato, M., Conte, M., Giovannelli, P., Altucci, L., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2017). Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation. *Oncotarget*, 8(70), 115620–115631. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23360>
- Bishayee, K., Ghosh, S., Mukherjee, A., Sadhukhan, R., Mondal, J., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2013). Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell proliferation*, 46(2), 153–163. <https://doi.org/10.1111/cpr.12017>
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M. J., Oberritter, H., Schulze, M., Stehle, P., & Watzl, B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European journal of nutrition*, 51(6), 637–663. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0380-y>
- Bolli, A., Galluzzo, P., Ascenzi, P., Del Pozzo, G., Manco, I., Vietri, M. T., Mita, L., Altucci, L., Mita, D. G., & Marino, M. (2008). Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals. *IUBMB life*, 60(12), 843–852. <https://doi.org/10.1002/iub.130>
- Bolli, A., Bulzomi, P., Galluzzo, P., Acconcia, F., & Marino, M. (2010). Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB life*, 62(9), 684–687. <https://doi.org/10.1002/iub.370>
- Braun, J. M., Kalkbrenner, A. E., Calafat, A. M., Bernert, J. T., Ye, X., Silva, M. J., Barr, D. B., Sathyanarayana, S., & Lanphear, B. P. (2011). Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environmental health perspectives*, 119(1), 131–137. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002366>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

- worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brett, A. and Ghica, M.-E. (2003). Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, 15, 1745-1750. <https://doi.org/10.1002/elan.200302800>
- Bulzomi, P., Galluzzo, P., Bolli, A., Leone, S., Acconcia, F., & Marino, M. (2012). The pro-apoptotic effect of quercetin in cancer cell lines requires ER β -dependent signals. *Journal of cellular physiology*, 227(5), 1891–1898. <https://doi.org/10.1002/jcp.22917>
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental health perspectives*, 116(1), 39–44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>
- Calafat, A. M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L. T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., & Hauser, R. (2009). Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environmental health perspectives*, 117(4), 639–644. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800265>
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of food science*, 74(7), T59–T65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, R., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., Oomah, B.D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77(2), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>.
- Cantonwine, D., Meeker, J. D., Hu, H., Sánchez, B. N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-García, A., Fortenberry, G. Z., Calafat, A. M., & Téllez-Rojo, M. M. (2010). Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental health: a global access science source*, 9, 62. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-62>
- Catalán, M., Ferreira, J., & Carrasco-Pozo, C. (2020). The Microbiota-Derived Metabolite of Quercetin, 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid Prevents Malignant Transformation and Mitochondrial Dysfunction Induced by Hemin in Colon Cancer and Normal Colon Epithelia Cell Lines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4138. <https://doi.org/10.3390/molecules25184138>
- Chen, F. P., & Chien, M. H. (2014). Phytoestrogens induce apoptosis through a mitochondria/caspase pathway in human breast cancer cells. *Climacteric: the*

journal of the International Menopause Society, 17(4), 385–392.
<https://doi.org/10.3109/13697137.2013.869671>

- Chen, B. H., Park, J. H., Ahn, J. H., Cho, J. H., Kim, I. H., Lee, J. C., Won, M. H., Lee, C. H., Hwang, I. K., Kim, J. D., Kang, I. J., Cho, J. H., Shin, B. N., Kim, Y. H., Lee, Y. L., & Park, S. M. (2017). Pretreated quercetin protects gerbil hippocampal CA1 pyramidal neurons from transient cerebral ischemic injury by increasing the expression of antioxidant enzymes. *Neural regeneration research*, 12(2), 220–227. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.200805>
- Chirumbolo S. (2010). The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflammation & allergy drug targets*, 9(4), 263–285. <https://doi.org/10.2174/187152810793358741>
- Correa-Basurto, J., Flores-Sandoval, C., Marín-Cruz, J., Rojo-Domínguez, A., Espinoza-Fonseca, L. M., & Trujillo-Ferrara, J. G. (2007). Docking and quantum mechanic studies on cholinesterases and their inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 42(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.08.015>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dairkee, S. H., Luciani-Torres, M. G., Moore, D. H., & Goodson, W. H., 3rd (2013). Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics, and cell death in non-malignant human breast epithelial cells. *Carcinogenesis*, 34(3), 703–712. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs379>
- Darband, S. G., Kaviani, M., Yousefi, B., Sadighparvar, S., Pakdel, F. G., Attari, J. A., Mohebbi, I., Naderi, S., & Majidinia, M. (2018). Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6544–6560. <https://doi.org/10.1002/jcp.26595>
- DelInnocentes, P., Perry, A. L., Graff, E. C., Lutful Kabir, F. M., & Curtis Bird, R. (2015). Characterization of HOX gene expression in canine mammary tumour cell lines from spontaneous tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 13(3), 322–336. <https://doi.org/10.1111/vco.12062>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Dihal, A. A., de Boer, V. C., van der Woude, H., Tilburgs, C., Bruijntjes, J. P., Alink, G. M., Rietjens, I. M., Woutersen, R. A., & Stierum, R. H. (2006). Quercetin, but not its glycosidated conjugate rutin, inhibits azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in F344 rats. *The Journal of nutrition*, 136(11), 2862–2867. <https://doi.org/10.1093/jn/136.11.2862>

- Doğan, Z., Kocahan, S., Erdemli, E., Köse, E., Yılmaz, I., Ekincioğlu, Z., Ekinci, N., & Turkoz, Y. (2015). Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. *Cytotechnology*, 67(6), 1031–1038. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9742-z>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilsland, A., Amedei, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*, 35 Suppl(Suppl), S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Food And Drug Administration. (2012). Nutrition Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application. U.S. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contact-application>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y., Lu, J., Bensoussan, L., Seeram, N. P., Heber, D., & Henning, S. M. (2006). Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *The Journal of nutrition*, 136(1), 52–57. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.52>
- Gao, X., & Wang, H. S. (2014). Impact of bisphenol a on the cardiovascular system - epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *International journal of environmental research and public health*, 11(8), 8399–8413. <https://doi.org/10.3390/ijerph110808399>
- Geens, T., Goeyens, L., & Covaci, A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(5), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005>
- Global Cancer Observatory. (2020). The International Agency for Research on Cancer (IARC). (n.d.). <https://gco.iarc.fr/>
- Glowacki, S., Synowiec, E., & Blasiak, J. (2013). The role of mitochondrial DNA damage and repair in the resistance of BCR/ABL-expressing cells to tyrosine kinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16348–16364. <https://doi.org/10.3390/ijms140816348>
- Goodson, W. H., 3rd, Luciani, M. G., Sayeed, S. A., Jaffee, I. M., Moore, D. H., 2nd, & Dairkee, S. H. (2011). Activation of the mTOR pathway by low levels of

- xenoestrogens in breast epithelial cells from high-risk women. *Carcinogenesis*, 32(11), 1724–1733. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr196>
- Gortat, A., Sancho, M., Mondragón, L., Messeguer, À., Pérez-Payá, E., & Orzáez, M. (2015). Apaf1 inhibition promotes cell recovery from apoptosis. *Protein & cell*, 6(11), 833–843. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0200-2>
- Hussain, I., Bhan, A., Ansari, K. I., Deb, P., Bobzean, S. A., Perrotti, L. I., & Mandal, S. S. (2015). Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(6), 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.02.003>
- Hwang, K. A., Kang, N. H., Yi, B. R., Lee, H. R., Park, M. A., & Choi, K. C. (2013). Genistein, a soy phytoestrogen, prevents the growth of BG-1 ovarian cancer cells induced by 17 β -estradiol or bisphenol A via the inhibition of cell cycle progression. *International journal of oncology*, 42(2), 733–740. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1719>
- Khalid N, Azimpouran M. Necrosis. [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>
- Kim, J. Y., Kim, E. H., Park, S. S., Lim, J. H., Kwon, T. K., & Choi, K. S. (2008). Quercetin sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis via Sp1-mediated DR5 up-regulation and proteasome-mediated c-FLIPS down-regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 105(6), 1386–1398. <https://doi.org/10.1002/jcb.21958>
- Kim, H. J., Kim, S. K., Kim, B. S., Lee, S. H., Park, Y. S., Park, B. K., Kim, S. J., Kim, J., Choi, C., Kim, J. S., Cho, S. D., Jung, J. W., Roh, K. H., Kang, K. S., & Jung, J. Y. (2010). Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8643–8650. <https://doi.org/10.1021/jf101510z>
- Kim, G. T., Lee, S. H., Kim, J. I., & Kim, Y. M. (2014). Quercetin regulates the sestrin 2-AMPK-p38 MAPK signaling pathway and induces apoptosis by increasing the generation of intracellular ROS in a p53-independent manner. *International journal of molecular medicine*, 33(4), 863–869. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1658>
- Kim, Y. S., Hwang, K. A., Hyun, S. H., Nam, K. H., Lee, C. K., & Choi, K. C. (2015). Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway. *Chemical research in toxicology*, 28(4), 662–671. <https://doi.org/10.1021/tx500443p>
- Kim, J. Y., Choi, H. G., Lee, H. M., Lee, G. A., Hwang, K. A., & Choi, K. C. (2017). Effects of bisphenol compounds on the growth and epithelial mesenchymal

- transition of MCF-7 CV human breast cancer cells. *Journal of biomedical research*, 31(4), 358–369. <https://doi.org/10.7555/JBR.31.20160162>
- Konrad, M., & Nieman, D. C. (2015). Evaluation of Quercetin as a Countermeasure to Exercise-Induced Physiological Stress. In M. Lamprecht (Ed.), *Antioxidants in Sport Nutrition*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Koppula, P., Zhuang, L., & Gan, B. (2021). Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein & cell*, 12(8), 599–620. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00789-5>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- Li, F., Li, S., Li, H. B., Deng, G. F., Ling, W. H., Wu, S., ... & Chen, F. (2013). Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1298-1309. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.016>
- Liu, Y., Li, X., Zhou, X., Wang, J., & Ao, X. (2022). FADD as a key molecular player in cancer progression. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 28(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00560-y>
- Luo, C. L., Liu, Y. Q., Wang, P., Song, C. H., Wang, K. J., Dai, L. P., Zhang, J. Y., & Ye, H. (2016). The effect of quercetin nanoparticle on cervical cancer progression by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via JAK2 suppression. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 82, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.029>
- Lv, H., Zhen, C., Liu, J., Yang, P., Hu, L., & Shang, P. (2019). Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3150145. <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>
- Martineti, V., Picariello, L., Tognarini, I., Carbonell Sala, S., Gozzini, A., Azzari, C., Mavilia, C., Tanini, A., Falchetti, A., Fiorelli, G., Tonelli, F., & Brandi, M. L. (2005). ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocrine-related cancer*, 12(2), 455–469. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00861>
- Matson, J. P., & Cook, J. G. (2017). Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *The FEBS journal*, 284(3), 362–375. <https://doi.org/10.1111/febs.13898>

- Meng, Q., Qian, Z., Li, X., Li, D., Huang, W., Zhao, J., Li, S. (2012). Free radical scavenging activity of Eagle tea and their flavonoids. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(3), 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.02.012>
- Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K., & Bhat, H. K. (2008). Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environmental health perspectives*, 116(4), 426–433. <https://doi.org/10.1289/ehp.10538>
- Muñoz-Reyes, D., Morales, A. I., & Prieto, M. (2021). Transit and Metabolic Pathways of Quercetin in Tubular Cells: Involvement of Its Antioxidant Properties in the Kidney. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(6), 909. <https://doi.org/10.3390/antiox10060909>
- Obeng E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 81(4), 1133–1143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Orlando, F. A., Tan, D., Baltodano, J. D., Khoury, T., Gibbs, J. F., Hassid, V. J., Ahmed, B. H., & Alrawi, S. J. (2008). Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. *Journal of surgical oncology*, 98(3), 207–213. <https://doi.org/10.1002/jso.21106>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Pampaloni, B., Palmiini, G., Mavilia, C., Zonefrati, R., Tanini, A., & Brandi, M. L. (2014). In vitro effects of polyphenols on colorectal cancer cells. *World journal of gastrointestinal oncology*, 6(8), 289–300. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v6.i8.289>
- Pauff, J. M., & Hille, R. (2009). Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. *Journal of natural products*, 72(4), 725–731. <https://doi.org/10.1021/np8007123>
- Peng, X., Zhang, Z., Zhang, N., Liu, L., Li, S., & Wei, H. (2014). In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Food & nutrition research*, 58, 10.3402/fnr.v58.23406. <https://doi.org/10.3402/fnr.v58.23406>
- Principi, M., Barone, M., Pricci, M., De Tullio, N., Losurdo, G., Ierardi, E., & Di Leo, A. (2014). Ulcerative colitis: from inflammation to cancer. Do estrogen receptors have a role?. *World journal of gastroenterology*, 20(33), 11496–11504. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11496>
- Qi, L., & Ding, Y. (2017). Screening of Tumor Suppressor Genes in Metastatic Colorectal Cancer. *BioMed research international*, 2017, 2769140. <https://doi.org/10.1155/2017/2769140>

- Qu, W., Zhao, Z., Chen, S., Zhang, L., Wu, D., & Chen, Z. (2018). Bisphenol A suppresses proliferation and induces apoptosis in colonic epithelial cells through mitochondrial and MAPK/AKT pathways. *Life sciences*, 208, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.040>
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food chemistry*, 161, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.008>
- Rosa, L. S., Jordão, N. A., da Costa Pereira Soares, N., deMesquita, J. F., Monteiro, M., & Teodoro, A. J. (2018). Pharmacokinetic, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Phenolic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cells Using In Vitro and In Silico Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10), 2569. <https://doi.org/10.3390/molecules23102569>
- Serra, A., Macià, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N., & Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food chemistry*, 130(2), 383-393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.055>
- Shan, B. E., Wang, M. X., & Li, R. Q. (2009). Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer investigation*, 27(6), 604–612. <https://doi.org/10.1080/07357900802337191>
- Shang, H. S., Lu, H. F., Lee, C. H., Chiang, H. S., Chu, Y. L., Chen, A., Lin, Y. F., & Chung, J. G. (2018). Quercetin induced cell apoptosis and altered gene expression in AGS human gastric cancer cells. *Environmental toxicology*, 33(11), 1168–1181. <https://doi.org/10.1002/tox.22623>
- Shi, T., Zhao, C., Li, Z., Zhang, Q., & Jin, X. (2016). Bisphenol a exposure promotes the migration of NCM460 cells via estrogen receptor-mediated integrin β 1/MMP-9 pathway. *Environmental toxicology*, 31(7), 799–807. <https://doi.org/10.1002/tox.22090>
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 34(7), 795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- Suryadinata, R., Sadowski, M., & Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience reports*, 30(4), 243–255. <https://doi.org/10.1042/BSR20090171>
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Schaeberle, C. M., Ucci, A. A., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice.

- Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.), 26(3-4), 210–219.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.09.015>
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*, 30(1), 75–95.
<https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- van Erk, M. J., Roepman, P., van der Lende, T. R., Stierum, R. H., Aarts, J. M., van Bladeren, P. J., & van Ommen, B. (2005). Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *European journal of nutrition*, 44(3), 143–156.
<https://doi.org/10.1007/s00394-004-0503-1>
- Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P., & Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 27(8), 723–747. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>
- Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U. M., Frank, J., & Busch, C. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(11-12), 1171–1178.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.03.020>
- Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., & Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition. *European journal of pharmacology*, 649(1-3), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.020>
- Wang, P., Heber, D., & Henning, S. M. (2012). Quercetin increased the antiproliferative activity of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in prostate cancer cells. *Nutrition and cancer*, 64(4), 580–587.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2012.661514>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of cell biology*, 217(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 622–646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>
- Xu, Y., Zhang, J., Ma, L., Zhao, S., Li, S., Huang, T., & Chu, Z. (2018). The Pathogenesis of Necroptosis-Dependent Signaling Pathway in Cerebral Ischemic Disease. *Behavioural neurology*, 2018, 6814393.
<https://doi.org/10.1155/2018/6814393>

- Yang, L., Liu, Y., Wang, M., Qian, Y., Dong, X., Gu, H., Wang, H., Guo, S., & Hisamitsu, T. (2016). Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis. *Molecular medicine reports*, 14(5), 4559–4566. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5818>
- Yani, S., Opik, T., Siti, R., Ida, K., Epa, P. (2019). In silico analysis of kaempferol as a competitor of estrogen on estrogen receptor alpha of endometrial cancer In silico analysis of kaempferol as a competitor of estrogen on estrogen receptor alpha of endometrial cancer. *Journal of Physics: Conference Series*, 1402. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/6/066109>
- Yuan, S., Yu, X., Asara, J. M., Heuser, J. E., Ludtke, S. J., & Akey, C. W. (2011). The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3. *Structure* (London, England: 1993), 19(8), 1084–1096. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.001>
- Zhang, K. S., Chen, H. Q., Chen, Y. S., Qiu, K. F., Zheng, X. B., Li, G. C., Yang, H. D., & Wen, C. J. (2014). Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 68(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.003>
- Zhang, Y., & Bhavnani, B. R. (2006). Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC neuroscience*, 7, 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-49>
- Zhang, X. A., Zhang, S., Yin, Q., & Zhang, J. (2015). Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacognosy magazine*, 11(42), 404–409. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.153096>
- Zhou, P., Wang, C., Hu, Z., Chen, W., Qi, W., & Li, A. (2017). Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-mesenchymal via a Notch1/NF-κB/slugg/E-cadherin pathway. *BMC cancer*, 17(1), 813. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3829-9>

IX. ANEXO

9.1 Documento de consentimiento informado.

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

**CARTA CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

Proyecto de investigación: Evaluación del efecto anticancerígeno de la quercetina y su extracto fermentado en células de colon humano tratadas con bisfenol A.

Responsable del proyecto: Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Alumna: Nataly García Gutiérrez; teléfono: 4421139927; correo:
nat_gagu5487@hotmail.com

Sede donde se realizará el estudio: Departamento de investigación y posgrado de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

1. invitación

Por medio de este documento, me gustaría invitarlo a participar como donador de muestra de heces en el proyecto de investigación titulado Evaluación del efecto anticancerígeno de la quercetina y su extracto fermentado en células de colon humano tratadas con bisfenol A. Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

2. Justificación del estudio

La quercetina es un compuesto de origen natural encontrado en frutas y verduras, al cual se le han atribuido propiedades benéficas a la salud. Se conoce que tras la digestión gastrointestinal y fermentación colónica del alimento podemos encontrar a la quercetina. Esta al entrar en contacto con la pared intestinal puede llegar a favorecer la inhibición de células cancerígenas observadas en estudios *in vitro*. Aunado a esto, se ha visto que la metabolización de la quercetina puede generar la

formación de otros compuestos con características biológicas similares a su precursor; sin embargo, el proceso fermentativo en estos estudios no se ha realizado usando bacterias provenientes de la materia fecal humana. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas que ayuden a entender que le ocurre a la quercetina durante la fermentación colónica usando modelos *in vitro* no invasivo que nos acerquen a un proceso fisiológico.

3. Beneficios del estudio.

Este estudio permitirá conocer los metabolitos secundarios de la quercetina producidos a partir de la fermentación colónica *in vitro* de la microbiota del ser humano.

4. Objetivos del procedimiento

Como parte de los objetivos por cumplir dentro del proyecto de investigación, se plantea realizar una fermentación colónica *in vitro* como paso final del modelo de simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*. Para poder cumplir con dicho objetivo es necesario contar con bacterias fermentativas las cuales solamente las podemos encontrar de forma fisiológica en la materia fecal de los seres humanos. Por lo que surge la necesidad de donación de heces fecales por parte de voluntarios sanos.

5. Descripción general del procedimiento

La muestra fecal donada deberá ser la primera del día, de tal manera que se le solicitará acudir a las instalaciones de la facultad de química a las 7:00 am del día indicado por el investigador a cargo. Una vez en las instalaciones se le permitirá usar el sanitario donde se le proporcionará un vaso estéril para muestra fecal y se le pedirá deje una muestra de aproximadamente 4 gramos. Al término, el investigador tomará la muestra para su posterior uso. Si está de acuerdo en participar, le pediremos que escriba su nombre y firme el formato de Consentimiento Informado al final de este documento.

6. Manejo de las muestras

Las muestras obtenidas no se etiquetarán con ningún dato que permita revelar la identidad del donante.

7. Riesgos

La donación de la muestra no presenta ningún riesgo para el participante.

8. ¿Dónde se llevará a cabo esta investigación?

Esta investigación se llevará a cabo en las instalaciones de la Facultad de Química dentro de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica.

9. ¿Por qué he sido invitado a participar en esta investigación?

Ha sido invitado a formar parte de esta investigación, porque cumple con las características enlistadas a continuación (criterios de inclusión):

Los participantes son incluidos si:

- No cuentan con enfermedades gastrointestinales.
- Llevan una dieta omnívora.
- No hayan consumido algún antibiótico al menos 3 meses antes de que se realice el estudio.

9. ¿Estoy obligado a participar?

Su participación es **voluntaria, anónima y confidencial**; no tiene que participar forzosamente. No habrá impacto negativo alguno si usted decide no participar en la investigación.

10. Aclaraciones:

- a) Esta investigación ha sido revisada y aprobada por el Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- b) Su decisión de participar en la presente Investigación es completamente voluntaria.
- c) En el transcurso de la Investigación, usted podrá solicitar información actualizada sobre la misma, al investigador responsable.
- d) La información obtenida en esta investigación será mantenida con estricta confidencialidad conforme la normatividad vigente.
- e) Se le garantiza que usted recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios u otros asuntos relacionados con la presente investigación.

11. FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Fecha / /2018

Yo, _____, manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada Evaluación del efecto anticancerígeno de la quercetina y su extracto fermentado en células de colon humano tratadas con bisfenol A.

No omito manifestar que he sido informado(a) clara, precisa y ampliamente, respecto de los procedimientos que implica esta investigación, así como de los riesgos expuestos.

He leído y comprendido la información anterior, y todas mis preguntas han sido respondidas de manera clara y a mi entera satisfacción, por parte del investigador a cargo de Nátaly García Gutiérrez.

NOMBRE Y FIRMA PARTICIPANTE	[NOMBRE Y FIRMA INVESTIGADOR PRINCIPAL	[
------------------------------------	----------	--	----------

TESTIGOS

NOMBRE Y FIRMA
PARENTESCO
DOMICILIO

NOMBRE Y FIRMA
PARENTESCO
DOMICILIO