

“Efecto del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)  
sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis en células SW480”

2024

Ana Karen Rojas Flores



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO



“Efecto del extracto de fermentación de garambullo  
(*Myrtillocactus geometrizans*) sobre la expresión de proteínas  
involucradas en apoptosis en células SW480”

Opción de titulación

Tesis

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

Presenta:

LN Ana Karen Rojas Flores

Dirigido por:

Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Co-dirigido por:

Dra. Guadalupe Soledad López Álvarez

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Enero 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto del extracto de fermentación de garambullo  
(Myrtillocactus geometrizans) sobre la expresión de  
proteínas involucradas en apoptosis en células SW480

**por**

Ana Karen Rojas Flores

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

**Clave RI:** MEMAC-135740



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO



“Efecto del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)  
sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis en células SW480”

Opción de titulación

Tesis

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

Presenta:

LN Ana Karen Rojas Flores

Dirigido por:

Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Co-dirigido por:

Dra. Guadalupe Soledad López Álvarez

Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda  
Presidente

Dra. Guadalupe Soledad López Álvarez  
Secretario

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié  
Vocal

Dra. Mardey Liceth Cuéllar Núñez  
Vocal

Dr. Aarón Kuri García  
Suplente

Centro Universitario  
Consejo Universitario  
Enero 2024

## RESUMEN

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) es una fruta silvestre mexicana recientemente estudiada. Se ha demostrado que dicha fruta contiene gran cantidad de compuestos bioactivos caracterizados por su alta capacidad antioxidante. También se ha confirmado que disminuye la viabilidad de células de cáncer de colon, mediante el arresto del ciclo celular, conduciendo a procesos de muerte como apoptosis y necrosis. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del extracto de fermentación de garambullo (EFG) (IC50 15% durante 24 h) sobre la expresión de 35 proteínas relacionadas con apoptosis a través de un arreglo de anticuerpos en células de adenocarcinoma de colon SW480. Los resultados del inmunoensayo se compararon estadísticamente contra un control de células sin EFG. Entre los resultados más relevantes, se encontró un aumento de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (16%) y Bcl-x (34%) y la disminución de citocromo C (24%) y Smac/Diablo (16%). Así mismo, disminuyó caspasa-3 escindida (35%), por lo que se sugiere que no se produjo una permeabilidad mitocondrial relacionada directamente con la vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado, encontramos una sobreexpresión del receptor de muerte TRAIL R2/DR5 (16%) y proteína adaptadora FADD (16%) que participan en la vía extrínseca de apoptosis y la vía de necroptosis. Por otra parte, también una disminución de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) como XIAP (10%), survivina (16.5%) y livina (12%). En conjunto, estos resultados sugieren que la muerte apoptótica inducida por el EFG pudiera ocurrir por la vía extrínseca de apoptosis y necroptosis. Sin embargo, al ser este trabajo de investigación el primero que explora la relación del EFG y la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis en las células SW480, es importante continuar con estudios que permitan conocer más a fondo la activación de las vías sugeridas.

**Palabras clave:** Cáncer de colon, digestión gastrointestinal *in vitro*, garambullo, apoptosis, proteínas.

## SUMMARY

Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) is a recently studied Mexican wild fruit. This fruit has been shown to contain many bioactive compounds characterized by their high antioxidant capacity. It has also been confirmed that it decreases the viability of colon cancer cells, by arresting the cell cycle, leading to death processes such as apoptosis and necrosis. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of garambullo fermentation extract (EFG) (15% in 24 h) on the expression of 35 proteins related to apoptosis of colon adenocarcinoma cells (SW480) through of an array of antibodies. The results of the sandwich immunoassay were statistically compared against a control of untreated cells. These show the increase in antiapoptotic proteins Bcl-2 (16%) and Bcl-x (34%) and the decrease in cytochrome C (24%) and Smac/Diablo (16%). Likewise, cleaved caspase-3 decreased, suggesting that mitochondrial permeability related to the intrinsic apoptosis pathway did not occur. On the other hand, overexpression of the death receptor TRAIL R2/DR5 (16%) and adapter protein FADD (16%) was shown, which participate in the extrinsic pathway of apoptosis and the necroptosis pathway. There was also a decrease in inhibitor of apoptosis proteins (IAP) such as XIAP (10%), survivin (16.5%) and livin (12%). Together, these results suggest that EFG-induced apoptotic death could occur through the extrinsic pathway of apoptosis and necroptosis. However, as it is the first work that explores the relationship between EFG and protein expression in SW480 cells, it is important to continue with more studies that allow for a deeper understanding of the activation of these suggested pathways.

**A mis padres, mi esposo y hermanos**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría, permitiendo dedicarme a tiempo completo a este proyecto. Agradezco a Dios que pude regresar a Querétaro y realizar este proyecto que ya tenía en mente años atrás.

A mis padres que aunque físicamente no se encuentran en este mundo, me dejaron muchas enseñanzas entre ellas el interés en seguir educándome y esforzándome por mejorar profesionalmente. A mi esposo que me vio en diferentes facetas durante este proyecto y me impulso a terminar esta meta que inicié. A mis hermanas y hermanos que han estado presentes apoyándome para poder realizar mis estudios y siendo mis guías cuando mis padres ya no podían hacerlo.

Respecto a mi inicio en el posgrado tuve la alegría de conocer a mi directora de tesis la Dra. Haydé Vergara que me aceptó en su equipo y me cobijó como parte de sus chicas del colon, ayudándome a retomar mi interés en la ciencia, aclarando mis dudas sobre el proyecto, apoyándome con toda la cuestión académica, burocrática y hasta social de esta maestría, sintiéndome con confianza de poder acercarme a ella en los problemas que se fueran suscitando y poder dar término a esta meta tan anhelada. Agradezco también a mi codirectora Dra. Guadalupe López que me apoyo en técnicas de laboratorio y que tuvo la paciencia en explicarme lo necesario para avanzar, brindándome sus conocimientos y experiencias a lo largo de esta nada fácil carrera que es la ciencia.

Agradezco a mi comité tutorial la Dra. Ana Tusie que me ayudo a mejorar mis conocimientos de biología molecular y de sus agradables clases, a la Dra. Liceth Cuellar y Dr. Aarón Kuri que me ayudaron a generarme nuevos retos en la búsqueda de conocimiento de mi proyecto cuando les exponía mi tema.

A mis compañeros de escuela y grupo de investigación por darme de su tiempo y explicarme dudas, así como experiencias que podían servirme para mejorar en el posgrado: Kenny, Dainelys, Yan, Sara, Mary, Luis, Fátima, Edel y sin olvidar al Dr. Iván Luzardo por su asesoría y apoyo en mi proyecto.

Finalmente puedo decir que aprender y mejorar sobre conocimientos de la ciencia es algo que genero muchos sentimientos encontrados hasta llegar a sentirme perdida, pero a la vez ver lo maravilloso de aprender algo nuevo o entender el porqué de lo que sucede en nuestro cuerpo cuando se produce una enfermedad como el cáncer de colon.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>1.1 Cáncer</b> .....	13
<b>1.2 Cáncer de colon</b> .....	13
<b>1.3 Genética molecular del cáncer de colon</b> .....	13
<b>1.4 Apoptosis</b> .....	14
<b>1.4.1 p53</b> .....	16
<b>1.4.2 p21/WAF1</b> .....	17
<b>1.4.3 Proteínas de la familia BCL-2</b> .....	17
<b>1.4.4 BH3</b> .....	18
<b>1.4.5 Receptores de TNF que contienen dominio de muerte</b> .....	19
<b>1.4.6 Caspasas ejecutoras</b> .....	20
<b>2 Garambullo</b> .....	21
<b>2.1 Composición nutricional y fisicoquímica</b> .....	22
<b>2.2 Fibra dietética</b> .....	24
<b>2.3 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i></b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	27
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	27
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	27
<b>4.1 Materiales</b> .....	28
<b>4.1.1 Material biológico</b> .....	28
<b>4.1.2 Material químico</b> .....	28
<b>4.1.3 Equipos</b> .....	28
<b>4.2 Metodología</b> .....	29
<b>4.2.1 Simulación de los procesos digestivos y fermentación <i>in vitro</i></b> .....	29
<b>4.2.1 Fermentación colónica in vitro de la FND</b> .....	30
<b>4.2.3 Condiciones de mantenimiento de cultivo celular</b> .....	31
<b>4.2.4 Ensayo de viabilidad celular MTT</b> .....	32
<b>4.2.5 Extracción de proteínas</b> .....	32
<b>4.2.6 Determinación de proteínas totales</b> .....	33



4.2.7 Electroforesis.....	33
4.2.8 Análisis de matriz de apoptosis humana .....	34
4.2.9 Análisis bioinformático de proteínas moduladas por EFG .....	34
4.3 Análisis estadístico de la información .....	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
5.1 Fermentación colónica .....	34
5.2 Viabilidad celular.....	36
5.3 Cuantificación de proteínas totales .....	37
5.4 Electroforesis .....	38
5.5 Análisis de proteínas relacionado con la apoptosis humana en lisados celulares	39
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
3.3 Bibliografía.....	48
<b>6. FIRMAS DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL E INVESTIGADORES .....</b>	<b>61</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>61</b>
7.1 Formato de Consentimiento informado para donantes de saliva .....	61
7.3 Formato de manipulación y eliminación de forma segura los residuos RPBI .....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Contenido de compuestos bioactivos del garambullo .....	243
<b>Cuadro 2.</b> Composición nutricional y fisicoquímica del garambullo .....	24
<b>Cuadro 3.</b> Indicaciones de preparación de muestras para iniciar la simulación de fermentación colónica.....	31
<b>Cuadro 4.</b> Valores de pH obtenidos durante la fermentación colónica <i>in vitro</i> .....	35
<b>Cuadro 5.</b> Proteínas extraídas en ensayo BCA .....	38
<b>Cuadro 6.</b> Análisis bioinformático de proteínas con STRING .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1 Secuencia de las alteraciones genéticas etiopatogénicas en el cáncer ..	14
Figura 2. Cascadas de señalización de la apoptosis con dos vías principales.....	16
Figura 3. Garambullo en estado maduro, cosechado .....	22
Figura.4 Fotomicrografías representativas de células SW480. ....	37
Figura 5. Curva de calibración BCA con los patrones de albúmina.....	38
Figura 6. Perfil de electroforesis con tinción con Comassie .....	39
Figura7.Gráfico de proteínas expresada de control vs EFG .....	40
Figura 8. Vías de señalización activadas con el tratamiento del EFG .....	44
Figura 9. Muestra el análisis proteómico de proteínas moduladas por EFG .....	45

## ABREVIATURAS

APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCA	Ácido bicinconínico
BF	Blanco de fermentado
CCR	Cáncer colorrectal
EFG	Extracto fermentado de garambullo
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
FCA	Focos de criptas aberrantes
DMEM	Dulbecco Modified Eagles Minimal
SFB	Suero Fetal Bovino
FND	Fracción no digerible
FNDFG	Fracción no digerible de Fermentado de Garambullo
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria media
PBS	Buffer fosfato salino
SFB	Suero Fetal Bovino
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

## 1. INTRODUCCIÓN

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) es un fruto endémico de México perteneciente a la familia de las cactáceas, que se produce en zonas áridas y semiáridas del país como Querétaro, San Luis Potosí, Hidalgo y Estado de México (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). Se cosecha desde mayo a septiembre, se recolecta en etapa madura y se han desarrollado varias presentaciones como helados, mermelada, vino, entre otros (Hernández-López *et al.*, 2008).

Actualmente se ha estudiado su composición nutraceútica y compuestos bioactivos que incluye polifenoles, betalaínas y fibra dietaria que pueden llegar al colon, en donde son metabolizados por la microbiota intestinal, produciendo compuestos como ácidos grasos de cadena corta que se les han atribuido beneficios a la salud (Sánchez-Recillas *et al.* 2022), como contrarrestar efectos relacionados al cáncer de colon (CC). El CC es el tercer cáncer más común en el mundo y la segunda neoplasia más letal para los dos sexos. (Bolaños-Carrillo *et al.*, 2015) y su incidencia y mortalidad han ido en aumento en los últimos años a nivel mundial y nacional (OMS, 2021). La mayoría de los factores de riesgo para el CC están relacionados con el estilo de vida, principalmente la alimentación, de modo que los hábitos poco saludables aumentan las posibilidades de desarrollar dicha enfermedad hasta en un 70% (OMS, 2021). El CC se ha visto que puede ser prevenible a través de buenos hábitos alimenticios y varios grupos de investigación se han concentrado en estudiar los compuestos bioactivos que posee el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), describiéndose propiedades antiinflamatorias y citotóxicas (Sauro-Calixto *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no existen reportes concretamente sobre las proteínas involucradas en apoptosis en células SW480 tratadas con el EFG

## **1.1 Cáncer**

Según la OMS (2021) el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y se define como una enfermedad que se caracteriza por la multiplicación rápida de células anormales en cualquier parte del cuerpo, que se extienden y pueden invadir otros órganos.

En México, se registraron 90,123 muertes por tumores malignos en el 2021, registrando una la tasa de defunciones de 7.06 por cada 10 mil habitantes ( INEGI (2021).

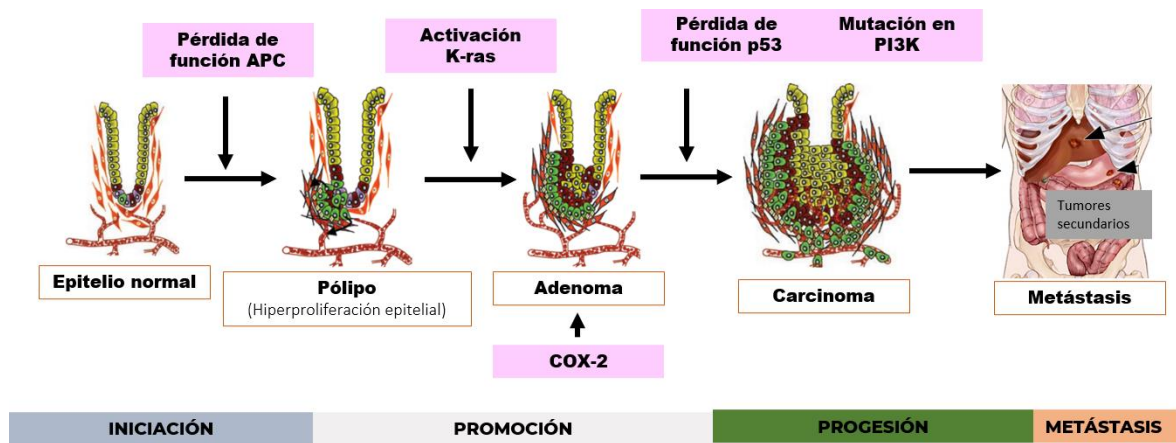
## **1.2 Cáncer de colon**

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo cáncer más común en América de acuerdo con datos de la OPS (2020), generando 1.4 millones de muertes y se estima que en 2040 la incidencia aumentará a 6 millones de muertes anual (OPS, 2021). El CCR en nuestro país ocupa el 3er lugar en cáncer más frecuente, generando un aumento en su incidencia de acuerdo con la OMS (2021). El CCR es un proceso que puede ser desencadenado por factores genéticos, epigenéticos y ambientales, afectando tanto a mujeres y hombres, con una sintomatología de dolor abdominal, anemia y evacuaciones con sangre, y que al presentarse éstos en un estado tardío generan metástasis ganglionar. La mayoría de los cánceres de colon son esporádicos y se generan inicialmente por una lesión displásica en un tiempo de 6-8 años (Kronberg, 2011). American Cancer Society (2018) señaló que existe la posibilidad (75%-90) de una cirugía en las etapas I y II con una extirpación de la parte afectada.

## **1.3 Genética molecular del cáncer de colon**

La progresión de la carcinogénesis desde la mucosa colónica hasta el carcinoma se describió por Fearon y Volgestein, que incluyen mutaciones de cuatro a cinco genes para formar un tumor maligno, ocurriendo de una manera secuencial (Fearon

& Vogelstein 1990). La vía de inestabilidad cromosómica (CIN) es la que se presenta en mayor porcentaje (70-85%) respecto a la carcinogénesis caracterizada por células aneuploides y pérdida de heterocigocidad (Garribba *et al.*, 2023). En ésta, se genera el desarrollo de focos de criptas aberrantes (FCA), activando la vía de señalización de Wnt, generando una mutación en el gen de la Poliposis Coli Adenomatosa (*Apc*); posteriormente mutaciones en el protooncogén *Ras*, así como una alteración en *Tp53*, específicamente en el cromosoma 18q, y finalmente activando una mutación en PIK3CA (Pino & Chung 2010). En la Figura 1 se muestra el desarrollo de alteraciones en el epitelio celular hasta llegar a metástasis y las modificaciones implicadas en el desarrollo de cáncer de colon.



**Figura. 1** Secuencia de las alteraciones genéticas etiopatogénicas en el cáncer de colon.  
(Modificado de Korcaya & Wicha, 2010)

## 1.4 Apoptosis

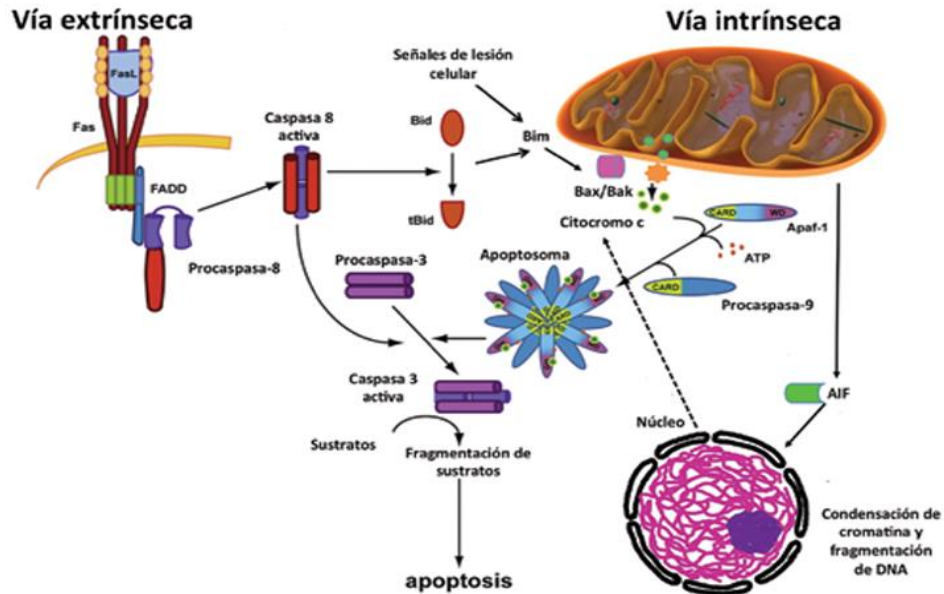
La apoptosis es una forma de muerte celular programada, que se requiere para mantener la homeostasis de los tejidos por medio de la eliminación selectiva de células dañadas o envejecidas. Una familia de proteasas intracelulares especializadas desencadena la apoptosis entre ellas están las caspasas 8 y 10; las cuales reciben señales detalladas, impulsan una cascada de procesos que activan

la división de proteínas esenciales para el funcionamiento celular, como son las proteínas citoesqueléticas y proteínas nucleares (Singh & Bosé, 2015).

Existen dos cascadas de apoptosis como vías principales: extrínseca e intrínseca (Figura 3). La vía extrínseca se desarrolla principalmente en citoplasma también llamada “vía mediada por receptores” y la vía intrínseca se desarrolla en la mitocondria (Jin & El-Deiry, 2005). La vía extrínseca es activada por un ligando específico que se une a un receptor de muerte en la superficie celular, entre ellos: los Factores de Necrosis Tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), Fas (Apo-1), Dr3, Dr4 (TRAILR1), D5 (TRAILR2) (Fragoso *et al.*, 2014). Inicia con el reclutamiento de proteínas adaptadoras como FADD o TRADD y la unión de su activación, con procaspasa 8 o 10 para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (Sosa, 2012). En este complejo DISC, la pro-caspasa 8 se activa mediante hidrólisis parcial, para así hidrolizar y activar a las caspasas 3 y 7, que culminarán en la proteólisis del sustrato, desencadenando la muerte celular (Palacios *et al.* 2011).

La vía intrínseca se inicia dentro de la célula y es activada por estímulos internos como estrés celular, daño al ADN, privación de factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno (Becerra y Pimienta 2009). Las proteínas de la familia Bcl-2 se activan produciendo un poro en la membrana externa de la mitocondria (Machado y Eliécer, 2012). La permeabilidad de la membrana mitocondrial (PMM) está regulada por la familia Bcl-2, en específico por Bcl-2 y Bax que inhiben o activan la PMM respectivamente (Rea-Boutrois *et al.* 2008). La proteína p53 se activa por daño al ADN, a su vez activando Bax/Bak e iniciando la traslocación de Bax a la mitocondria, formando el poro que provoca la liberación del citocromo C al citosol, el cual se une al factor 1 de activación de proteasa apoptótica (Apaf-1) y a Smac/Diablo (Singh & Bosé 2015), que en presencia de ATP atrae la procaspasa-9 para su activación en el apoptosoma. La caspasa-9 hidroliza a la procaspasa-3 para activarla en caspasa-3 y 7, y así iniciar la apoptosis (Palacios *et al.*, 2011).





**Figura 2.** Cascadas de señalización de la apoptosis con las dos vías principales: extrínseca e intrínseca (Quijano 2016).

### 1.4.1 Proteína p53

El gen que codifica la proteína p53 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (7p1.3) y está formado por 11 exones (Muñoz *et al.*, 2018). La proteína p53 se considera una proteína supresora de tumores, reparadora del daño al ADN y otros daños celulares, e induce la expresión de genes diana generando una detención del ciclo celular y provocando apoptosis. La mutación de p53, así como su acumulación generan un daño constante en el ADN y activación de NF- $\kappa$ B por procesos proinflamatorios provocando la inflamación crónica y el desarrollo de cáncer de colon (Josse y Bours, 2016).

La proteína inactiva de p53 se localiza en el citoplasma a bajas concentraciones con una vida media de 20 minutos, por lo que es necesario que reciba señales o modificaciones para generar una proteína funcional. Algunos de los estímulos como el estrés celular (Silva *et al.*, 2005) promueven que p53 active transcripcionalmente

a un grupo de genes diana, incluyendo Puma, Bax, Noxa, Pig3 y Killer/DR5 (Riley *et al.*, 2008). Dentro de estos, el más crucial es Puma, ya que su pérdida genera cambios apoptóticos parecidos a la falta de p53. Estudios actuales indican que p53 puede regular la apoptosis por una vía independiente. Como resultado del estrés celular u oxidativo, una fracción de p53 se transloca a la mitocondria, donde interactúa con las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL y Bcl-2 para inhibir sus funciones y de esta manera generar la liberación del citocromo C de las mitocondrias, induciendo finalmente la apoptosis (Liu *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la vía de señalización de p53 es disfuncional en aproximadamente el 80% de tumores humanos, debido a mutaciones y otros mecanismos, por lo que se considera a p53 como un objetivo principal de estudio en la terapia del cáncer (Liu, 2021).

#### **1.4.2 Proteína p21**

La proteína p21 esta codificada por el gen supresor WAF1/CIP1, es considerada supresora tumoral, y es inducida por la proteína p53 (Gómez *et al.* 2008). Se ha demostrado su participación en la reparación y replicación del ADN, así como modulación de apoptosis (Negri *et al.*, 2008). Se ha visto que p21 puede ser un regulador de apoptosis con base al nivel de estrés genotóxico, estado de p53, localización celular o tipo de célula, adquiriendo así propiedades oncopromotoras u oncosupresoras, y esto dependerá del entorno competente o deficiente de p53 (Georgakilas *et al.*, 2017). La proteína p21 tiene una vida media de 30 min, dando lugar a su degradación en el proteosoma (Sheaff *et al.*, 2000; Bloom *et al.*, 2003).

#### **1.4.3 Proteínas de la familia BCL-2**

Los linfomas de células B2 llamados BCL-2 se encuentran relacionados en la vía apoptótica. Se clasifican en tres subgrupos: antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-W, Bcl-xL, a-

1 y Mcl-1), efectores proapoptóticos (Bax, Bak y Box) y proteínas proapoptóticas, únicamente BH3 (Bid, Bim, Bad, Puma y Noxa) (Shaimas-Din *et al.*, 2011).

BCL-2 es una familia de proteínas cuya función es regular los procesos de permeabilización mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis, así como la dimerización y enlaces con otras proteínas. Su activación inicial es en el citosol generando la liberación del citocromo C, que a su vez se une al Factor 1 activador de la proteasa apoptótica o APAF-1 y de la caspasa-9, este complejo es llamado apoptosoma. El apoptosoma regula proteínas como SMAC/Diablo que son liberadas de la mitocondria e interceptan la acción de los inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP), presentando un dominio BIR (Baculovirus iap repeats), siendo este responsable de la unión de caspasas y de IAP para desencadenar la apoptosis (Shubach *et al.*, 2015).

#### 1.4.4 BH3

Las proteínas BH3 (Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa y Bmf) son de la familia de BCL-2, ayudan a la iniciación de apoptosis, propagando señales de muerte celular tanto intrínsecas como extrínsecas. Las BH3 inician la apoptosis activando a Bax y Bak y suprimiendo las proteínas antiapoptóticas en el retículo endoplásmico y mitocondria, previniendo la muerte constitutiva (Singh & Bosé, 2015).

Estas proteínas se clasifican en “activadores” de Bax y Bak, que son Puma, Bim y Bid, y también como “sensibilizadores” que son Bad y Noxa. Bim es un activador de apoptosis, uniéndose a proteínas antiapoptóticas (MCL-1 y Bcl-XL), generando la liberación del secuestro de Bak. Otras proteínas son activadas por daño al ADN, como son Bim, Puma y Noxa, las cuales son dependientes de la proteína p53 (Labi *et al.*, 2006). Puma por el contrario es independiente de la apoptosis *in vivo*, (Gallenne *et al.*, 2009), generando la activación de diferentes proteínas a partir de su liberación en sitios de captura, como son Bim y Bmf, estas se encuentran en citoesqueleto inactivas y al liberarse generan la unión e inactivación del factor antiapoptótico. Bim participa en los movimientos de los microtúbulos y con ayuda

de Puma retira las citocinas de los linfocitos para la activación de Bax (Shubach *et al.*, 2015). La activación de Bad se genera por su desfosforilación, causada por ausencia de señales de supervivencia, permitiéndole alejarse de la proteína 14-3-3 $\beta$  (proteína citosólica adaptadora) y llegar a mitocondria para generar la apoptosis (Fletcher y Huang, 2006).

#### **1.4.5 Receptores de TNF que contienen dominio de muerte**

La familia de receptores de TNF con dominio de muerte (DD) tienen interacción proteína-proteína estructuralmente conservado en citoplasma (Croft, 2009). Constituyen a un grupo multifuncional que permite la activación de vías de señalización celular para supervivencia, apoptosis, necroptosis, diferenciación celular y respuestas inflamatorias (Kawasaki & Taira, 2002). La clasificación de estos receptores es: TNFR-1, Fas, DR3, DR4, DR5 y DR6 que interactúan con otras proteínas adaptadoras para iniciar la muerte celular (Wilson *et al.*, 2009). Dos receptores de muerte DR4 y DR5 posee un dominio de muerte citoplasmático que sirve para reclutamiento de proteína adaptadora FADD (proteína asociada a Fas) (Shlyakhtina *et al.*, 2017).

Anteriormente se creía que la apoptosis era la única forma en la que participaban estos receptores de dominio de muerte (Vanden *et al.*, 2014). Con el paso del tiempo se descubrió que los estímulos que inducen la apoptosis a través de esta vía activan también la necroptosis de la familia de TNF, incluido TNF $\alpha$  y FasL (Chen *et al.*, 2017). Las investigaciones indican que TNF puede inducir la muerte independiente o dependiente de caspasas mediante la activación de RIPK1 (Vandenabeele *et al.*, 2010).

Se reconoce que las vías de señalización de muerte celular programada comparten componentes comunes, entre ellos estímulos de muerte que desencadenan complejos moleculares presentes en la vía y esto puede suceder por separado o simultáneamente (He *et al.*, 2009). Actualmente, se sigue investigando a fondo la ejecución por necroptosis. Al estudiar la línea celular HT-29 con TNF-  $\alpha$  se ha

identificado MLKL como un sustrato crítico para activación de RIPK3 al estímulo de esta vía (Vandenabeele *et al.*, 2010).

#### 1.4.6 Caspasas ejecutoras

Las caspasas pertenecen a la familia de cisteína-proteasas, también llamadas verdugos (Nguyen *et al.*, 2021), del cual deben su nombre por Cisteína-Aspartato proteasas, por su actividad como proteasas que ataca residuos (extremo C-terminal) y actúa a nivel del enlace peptídico (Armenteros *et al.*, 2019). Son las caspasas 3, 6 y 7 que requieren de una proteólisis para activarse (Jordan, 2003). La caspasa 3 de esta familia se vincula directamente a apoptosis, aumentando la vulnerabilidad de la célula a su muerte y se ha identificado en diferentes tipos de tumores como ameloblastomas, cáncer de colon, pulmón y linfoma. (García-García *et al.* 2006). La caspasa 3 y 7, también llamadas caspasas efectoras son responsables de iniciar la fase de degradación de apoptosis, como la fragmentación del ADN, la formación de ampollas de membrana y la contracción celular; específicamente la caspasa 3 inhibe la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y es necesaria en la destrucción correcta de la célula dañada, relacionada con la vía intrínseca (Brentnall *et al.*, 2013).

La caspasa 7 puede activarse en condiciones de muerte celular excesiva y/o inflamación (Lamkanfi *et al.*, 2010). Algunos estudios con fármacos quimioterapéuticos indican que las células *in vitro* e *in vivo* con deficiencia de caspasa 3 pueden inducirse a apoptosis inhibiendo el complejo XIAP: p19/p12-CASP7 (Guicciardi *et al.*, 2013). Los estudios por Jänicke y cols. (1998) en la línea celular de carcinoma MCF-7 mostraron sensibilidad a la inducción de apoptosis inducida por TNF sin la fragmentación del ADN, aún con pérdida de función de caspasa 3 (exón 3). Por lo que se pudo observar que caspasa 3 no es esencial para la apoptosis inducida por TNF. Donde se caracterizaba por la ruptura de la membrana plasmática, despolarización mitocondrial, activación de caspasas 8, 9 y 7 y la escisión de PARP (Yang *et al.*, 2011).

La caspasa 6 comparte un predominio corto común con caspasa 3 y 7, pero aún está en investigación su funcionalidad en cáncer (Watanabe *et al.*, 2008). Se ha visto mayor expresión en colon fetal y adulto en comparación a otros tejidos humanos (Grossmann *et al.*, 1998). También se encontró un aumento de esta caspasa en tumores de colon de ratón WT, sin embargo no generó influencia en la formación o aumento de tamaño en los tumores con tratamiento de azoximetano (AOM) /sulfato de sodio dextrano (DSS) (Foveau.*et al.*, 2014).

La American Society of Clinical Oncology (2019) indicó que varios estudios reafirman la importancia de una alimentación adecuada en la prevención del desarrollo del cáncer, destacando alimentos naturales con propiedades antioxidantes y con contenido de fibra y fitoquímicos. Por lo tanto, el estudio de alimentos que presenten funcionalidad biológica aporta evidencia de propiedades que ayuden a la prevención y/o inhibición del desarrollo del cáncer de colon.

## **2 Garambullo**

El garambullo es un fruto conocido científicamente como *Myrtillocactus geometrizans*, es una especie perteneciente a la familia *Cactácea* y se encuentra en la vegetación silvestre de tierras altas de México, teniendo una buena adaptación en regiones árida y semiáridas como Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, entre otros (Guzmán-Maldonado *et al.*,2010).

En los últimos años se ha incrementado la demanda en el consumo de frutos que contengan compuestos fitoquímicos, que es sabido proporcionan beneficios a la salud, como en la prevención de enfermedades como el cáncer de colon, así como sus efectos antiproliferativos (Arredondo *et al.*, 2020). Respecto al garambullo, se conoce que tiene propiedades nutraceuticas y se ha estudiado su consumo que ha estado presente a nivel de pueblos y comunidades, principalmente en zonas rurales (Corzo-Ríos *et al.* 2017)

En nuestro país el consumo de cactáceas como alimento está arraigado a nuestra cultura y costumbres, aprovechando desde el tallo, el fruto y las semillas. El estudio de alimentos naturales ha contribuido históricamente al descubrimiento de fármacos como fuentes de moléculas activas, así como a minimizar los efectos adversos del cáncer y su tratamiento. Por ello se ha intensificado la búsqueda de compuestos bioactivos durante los últimos años, que permitan avanzar contra el cáncer, abriendo camino a alimentos naturales como el garambullo (Andrade y Rodríguez, 2022). La Figura 3 muestra garambullos cosechados de temporada.



**Figura 3.** Garambullo en estado maduro, cosechado y obtenido de Agrosíntesis (2018).

### **2.1 Composición nutricional y fisicoquímica del garambullo**

Dentro de las propiedades que presenta el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), se ha demostrado que ayudan en el tratamiento de la diabetes y prevención del cáncer (Corzo *et al.* 2017). El garambullo contiene proteínas, ácido linoleico y vitaminas como ácido ascórbico y carotenoides (Muñoz, 2010). También se ha descrito que contiene gran cantidad de fitoquímicos como las betalaínas que son pigmentos naturales considerados de gran importancia por su actividad antioxidante, así como flavonoides y polifenoles (Pereira-Zaragoza *et al.*, 1997).

Existen otras moléculas que contiene el garambullo, como son los compuestos fenólicos que son producidos a partir del metabolismo secundario del fruto, y ayudan a su crecimiento y reproducción. Estos se han encontrado en mayor concentración

en frutos de madurez con equivalencia a la zarzamora (Nava, 2010) y frambuesa (Herrera *et al.* 2011). A continuación, se muestra en el Cuadro 1, la composición nutricional y fisicoquímica del garambullo con valor por cada nutriente de 100 g en peso fresco (pf), y en el Cuadro 2 algunos fitoquímicos encontrados en garambullo.

<b>CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS</b>	
<b>TABLA NUTRICIONAL</b>	
<b>COMPUESTO</b>	<b>CONTENIDO (g/100g garambullo)</b>
Energía (kcal/kJ)	83/346
Carbohidratos	16.3
Proteínas	2.1
Lípidos	1
Fibra total	0.8
<b>VITAMINAS (mg/100g)</b>	
Carotenoides	4.34-2.44
δ-tocoferol	0.025-0.023
Ácido L-ascórbico	105.5-89.1
Ácido Isoascórbico	8.6-8.4
<b>LÍPIDOS (mg)</b>	
Ácido palmítico	1.4-1.1
Ácido esteárico	0.7-0.4
Ácido oleico	2.3-0.8
Ácido linoleico	4.4-3.6
Ácido linolénico	0.6-0.5
<b>MINERALES (mg/100g)</b>	
Calcio	44
<b>OTROS COMPONENTES</b>	
Humedad %	79.6
pH	3.63-3.47

Cuadro 1. Composición nutricional y fisicoquímica del garambullo de un peso neto 100g de fruta fresca. Teniendo un alto contenido de proteína en comparación a arándanos y frambuesas. Adaptación de Nava (2010), Muñoz (2010).



<b>COMPUESTOS FENÓLICOS (mg)</b>		
	Compuestos fenólicos totales (g)	8.8-5.3
	Ácido cinámico	60.3-27.4
	Ácido cloragénico	1.3-1.2
	Catequina	8.1-7.79
	Epicatequina	7.3-6.7
	Ácido vanílico	16.9-15.7
	Ácido cafeico	7.9-4.8
	Ácido p-hidroxibenzoico	11.4-10.09
	Ácido sinápico	2.4
	Ácido ferúlico	518.9-340.9
	Miricetina	1.7-1.4
	Ac gálico	8.8
<b>BETALAÍNAS (mg)</b>		
	Betalaínas totales	23.3-14.3
	Betacianinas	22.6-9.5
	Betaxantinas	8.1-4.3

**Cuadro 2.** Contenido de compuestos bioactivos del garambullo en un peso neto de 100g de fruta fresca cosechada del Estado de Guanajuato. Adaptación de Nava (2010), Muñoz (2010).

## **2.2 Fibra dietética**

El contenido de fibra del garambullo contiene 4 veces más el contenido de fibra en comparación con la tuna, por lo tanto, puede convertirse en una fuente de fibra dietaria (Guzmán-Maldonado *et al.* 2010). La fibra dietética (FD) está compuesta por componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales y frutos, entre ellos está la celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina, se sabe que son compuestos no digeribles por el sistema digestivo humano (Badui-Dergal, 2013). La FD se clasifica como soluble (viscosa), la cual es fermentada en colon por bacterias (mucilagos,  $\beta$ -glucanos, pectinas, gomas y hemicelulosas) y la FD insoluble en agua (no viscosa), que es limitada su fermentación en colon (Fernández-Miranda, 2010).

La FD es un coadyuvante de la salud, particularmente en problemas nutricionales. La FD soluble tiene acciones sobre el metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y es un potencial anticarcinogénico. La FD ayuda a la retención de agua en la matriz estructural generando una mezcla con poca viscosidad, que permite un aumento de la masa fecal acelerando el tránsito intestinal, y otro beneficio es que disminuye el contacto con potenciales carcinogénicos en la mucosa del colon (Escudero y González, 2006). Por recomendaciones de la FAO/OMS, la FD debe consumirse como un mínimo de 25g/día.

La fibra funcional tiene otros polisacáridos no amiláceos o carbohidratos análogos, entre ellos: el almidón resistente, oligosacáridos (inulina y disacáridos), macronutrientes como proteínas y lípidos resistentes a la agresión de enzimas digestivas y compuestos bioactivos como carotenos, fitoesteroles o polifenoles (Zarzuelo y Gálvez 2010). La fibra es un componente complejo con características resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del intestino delgado, y al llegar al intestino grueso es atacada por la microbiota colónica, produciéndose ácidos grasos de cadena corta (AGCC), así como dióxido de carbono, metano e hidrógeno (Trejo-Márquez *et al.*, 2016).

Los principales AGCC incluyen el propionato, acetato y butirato con una concentración superior a 100 nM (Ganapathy *et al.*, 2013). Los AGCC influyen en la protección y disminución de desarrollar cáncer de colon, regulando las proteínas Bax, p21, Bcl-2 y la hiperacetilación de histonas. Anteriormente se ha visto que una alimentación alta en fibra puede prevenir el desarrollo de cáncer debido a la formación de AGCC, principalmente el butirato por acción de la microbiota (O'keefe, 2016). Posterior a la entrada celular, el butirato puede suprimir el crecimiento tumoral mediante la detención del ciclo celular y en una concentración de 1-10 mmol/l aumenta la diferenciación celular reduciendo la proliferación de células cancerosas e induciendo la muerte celular programada (Mirzaei *et al.*, 2021).

Diversos estudios han demostrado que el garambullo posee actividad antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena *in vitro*, sugiriendo que este efecto

ha sido a través del butirato (Gómez-Maqueo *et al.*, 2020). El butirato es la principal fuente de energía de las células epiteliales intestinales, por lo que una disminución en la producción de butirato se ha relacionado con trastornos del colon, generando una estimulación de macrófagos como Th17 relacionados con tumores que inducen la producción de citocinas inflamatorias (IL-17, IL-23, IL-6) que promueven el crecimiento y progresión del tumor (Wang y Karin, 2013). Por otra parte, los compuestos fenólicos también son metabolitos presentes/reportados en el garambullo, los cuales tienen una capacidad antioxidante y bioactividad *in vitro*, ayudando a la reducción del síndrome metabólico (Gómez-Maqueo *et al.*, 2020).

### **2.3 Digestión gastrointestinal *in vitro***

Durante los últimos 30 años, se ha desarrollado el método de digestión *in vitro* para reemplazar experimentos con animales y humanos, permitiendo utilizar alimentos en diversas condiciones (Marze, 2022). Los modelos *in vitro* de digestión se han utilizado para evaluar los cambios estructurales, digestibilidad y la obtención de componentes de los alimentos en condiciones gastrointestinales simuladas. Los alimentos más utilizados para la simulación de la digestión son plantas, carnes y alimentos a base de emulsión, que requieren enzimas digestivas para su procesamiento (pepsina, pancreatina, tripsina,  $\alpha$ -amilasa, lipasa, sales biliares, entre otras) (Hur *et al.*, 2011).

Actualmente el método de digestión gastrointestinal *in vitro* es ampliamente utilizado con alimentos funcionales de origen vegetal altos en compuestos fenólicos. Para examinar los atributos digestivos de dicha simulación, es necesario agregar enzimas digestivas como pepsina, tripsina, pancreatina, peptidasa, quimiotripsina,  $\alpha$ -amilasa y lipasa, así como ajustar el pH (Qin *et al.*, 2022). En general, los modelos de digestión *in vitro* simulan las diferentes partes del sistema gastrointestinal: boca, estómago, intestino delgado y colon. Para conocer el mecanismo de transporte que ocurre en la fase intestinal, es importante utilizar las sustancias específicas utilizadas en cada fase como enzimas, electrolitos, saliva, membranas naturales;

así como el uso de fuerzas mecánicas que imitan la motilidad fisiológica en el tracto gastrointestinal y el uso de una línea celular epitelial (Dima *et al.* 2020). En la última fase colónica de los modelos *in vitro* suelen utilizarse inóculos fecales de voluntarios permitiendo obtener una microbiota colónica para la creación de metabolitos secundarios del proceso de fermentación (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis en células de cáncer de colon humano SW480.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Obtener un extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) por medio de la simulación *in vitro* de los procesos de digestión y fermentación colónica.
- Determinar la viabilidad celular de las células SW480 con el extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)
- Cuantificar la presencia de proteínas relacionadas con apoptosis con el tratamiento del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) en células SW480.

### **4. METODOLOGÍA**

El desarrollo de estos experimentos se realizó en el Centro de Investigación Biomédica Avanzada (CIBA) en la Facultad de Medicina Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro.

## 4.1 Materiales

### 4.1.1 Material biológico

Línea celular SW480 (ATCC Manassas, VA, USA)

### 4.1.2 Material químico

- Ácido clorhídrico, pepsina hiel de buey pancreatina, solución Krebs-Ringer, peptona de caseína, extracto de levadura, cloruro de sodio, fosfato dibásico, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de calcio dihidratado, bicarbonato de sodio, clorhidrato de cisteína, sales biliares, Tween, vitamina K1, hematina, hidróxido de sodio, fosfato de sodio, rafinosa y filtro de Nylon (HNWP04700); Sigma-Aldrich Co. (St. Lois, MO, USA).
- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (12800-058) Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Ma. USA)
- Suero Fetal Bovino (SFB) (A4766801) Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Ma. USA)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (70011044) 10X Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Ma. USA)
- Tripsina (15090046) Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Ma. USA)
- Inhibidor de proteasas Halt™ 100x (78430) Thermo Fisher
- RIPA buffer 250 ml: Tris 1M (AM9855G), cloruro de sodio (NaCl) (S9888), 1% Tritón X100 (9036-19-5), ácido clorhídrico (HCL) (087617), EDTA (17892) y agua destilada estéril
- Kit de ensayo de proteínas BCA de ABP Biosciences (Beltsville, MD, USA.)
- Electroforesis de proteínas: Tris, glicerina, SDS, Acrilamida/Bisacrilamida, TEMED, persulfato de amonio y para el peso molecular de Prestained Protein Ladder (BG00364, Bio Basic, Ontario, Canadá). Tinción de Coomassie (G-250, Serva, Heidelberg, GER).
- Kit de matriz de apoptosis humana de perfilador de proteoma (895943, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)

### 4.1.3 Equipos

- Lector de microplaca iMark™ Bio-Rad

- Cámara de electroforesis Mini-Protean III de Bio-Rad
- Fotodocumentador con cámara de quimioluminiscencia ChemiDoc Bio-Rad XRS+

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Simulación de los procesos digestivos y fermentación *in vitro*

La técnica permitió simular el proceso digestivo *in vitro* de la boca, estómago, intestino delgado hasta su fermentación colónica (técnica adaptada por Campos-Vega *et al.* 2009 y 2015). Se solicitó la participación de cuatro individuos normopeso, con los siguientes requisitos: no haber consumido alimento los últimos 90 min y no cepillarse los dientes durante ese tiempo, mantener una dieta omnívora, no haber sido diagnosticado con enfermedades gastrointestinales, no presentar caries y no haber consumido antibiótico durante los últimos tres meses. Los participantes firmaron un consentimiento informado. Se inició con la recolección de su saliva con 5 ml de agua destilada para el blanco. Posteriormente masticaron 1 gramo de muestra 15 veces/15 s, descargando el contenido en un vaso de precipitado con 5 ml de agua destilada (se repitió el procedimiento con el blanco y la muestra 5 veces). Finalizado el procedimiento, se mezclaron las suspensiones de cada muestra y blanco en un solo vaso precipitado, de los cuales se obtuvo 75 ml de muestra y 75 ml de blanco. Para la fase del estómago se agregó 7.04 ml de HCl 2N para bajar el pH a 2.0 y después se agregó la pepsina 0.824g (previamente disuelta en HCl 20mM), dejándolo en agitación durante 2 h a 37°C.

Para la simulación de la fase intestinal se ajustó el pH a 7.6 y se agregó el extracto intestinal con hiel de buey 22.5 mg y 19.5 mg de pancreatina, disueltos en 37.5 ml solución de Krebs-Ringer. La suspensión fue transferida a un recipiente que contenía una membrana de diálisis de filtración de 7 cm de largo, que fue cerrada por ambos lados para posteriormente incubarla por 30 min a 37°C. De este último

proceso se obtuvo la fracción no digerible (FDN) que se encontraba dentro de la membrana de diálisis de filtración.

#### 4.2.1 Fermentación colónica *in vitro* de la FND

Finalmente se realizó la última fase de la simulación del proceso digestivo, con la técnica de fermentación colónica *in vitro* adaptado por Campos-Vega *et al.* (2015). Se utilizaron tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal que contenía (g/L): peptona de caseína 1g, extracto de levadura 1g, cloruro de sodio 0.05g, fosfato de potasio dibásico 0.02g, fosfato de potasio monobásico 0.02g, sulfato de magnesio heptahidratado 0.005g, cloruro de calcio dihidratado 0.005g, bicarbonato de sodio 1g, clorhidrato de cisteína 0.25g, sales biliares 1g, Tween-80 1g, Vitamina K1 5 ul y hematina 0.025g, previamente diluida en 5ml de hidróxido de sodio (NaOH). Se ajustó el pH a 7.0. Luego se filtró con un filtro Nylon de 0.45 µm.

Al siguiente día se hizo la recolección del inóculo fecal de dos voluntarios (3g de materia fresca por cada individuo) como fuente de microbiota colónica humana. Las características de los voluntarios se mencionan a continuación: no presentar enfermedades gastrointestinales, no haber consumido al menos en los últimos tres meses antibióticos y no tener una dieta vegetariana. Los 6 g de materia fecal se homogenizaron con 27 ml de solución de fosfato de sodio 1M a un pH de 7.0.

**Cuadro 3.** Indicaciones de preparación de muestras para iniciar la simulación de fermentación colónica.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS				
<b>Control</b>	9 mL de medio basal	1 mL de inóculo fecal	100 mg de rafinosa	—
<b>Blanco</b>	9 mL de medio basal	1 mL de inóculo fecal	200 µL de muestra blanco	—
<b>Muestra</b>	9 mL de medio basal	1 mL de inóculo fecal	100 µL de FND líquida	100 mg de FND sólida

Conforme al Cuadro 3, los tubos que contenían medio basal se les agregó un 1 ml del homogenizado fecal y se les adicionó la FND. Los tubos fueron agitados en vórtex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37°C y pH 7.0.

La fermentación se realizó durante 24 h, utilizando como control de sustrato fermentable la rafinosa. El pH se midió a las 0, 6, 12 y 24 h de la fermentación. Al finalizar el periodo de fermentación se realizó la centrifugación para separar sólidos de líquidos siendo considerado el sobrenadante como el extracto de fermentación de garambullo (EFG), el cual se almacena a -70°C sellándolos con parafilm y protegiéndolos de la luz para su posterior utilización.

#### **4.2.3 Condiciones de mantenimiento de cultivo celular**

La línea celular utilizada fue de adenocarcinoma humano SW480, tipo B en la escala de Dukes, en la cual se encuentran expresados los siguientes oncogenes: c-myc, K-ras, H-ras y N-ras, con mutación en p53 (codón 273) y sus niveles de proteína corresponden 20 veces más altos que otras líneas celulares (LoVo) (ATCC, 2020; Rochette *et al.*, 2005).

Las células humanas SW480 fueron mantenidas con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco Permormance Plus) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (ThermoFisher). El medio de cultivo fue renovado cada 72 horas. Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Cuando las células se encontraban próximas a la confluencia (80% aproximadamente), fueron subcultivadas: eliminando primero el medio, lavando con PBS 1X y posteriormente despegando por incubación con tripsina-EDTA durante 3-5 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la tripsina con 1 ml de DMEM y se resuspendió varias veces y se transfirió la solución resultante en tubos con DMEM fresco. Finalmente se sembraron en placas de 60mm (Corning) para su utilización en los experimentos correspondientes.



#### **4.2.4 Ensayo de viabilidad celular con MTT**

Se evaluó el efecto del extracto de fermentación de garambullo (EFG) sobre la viabilidad celular usando el ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 3(4,5 - dimetiltiazol -2ii)-2,5. difeniltetrazolio) (Sigma Aldrich). Las células SW480 ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) se cultivaron en una placa de 96 pocillos durante 24 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al siguiente día se eliminó el DMEM y se agregaron los siguientes tratamientos: EFG al 15% disuelto en DMEM con SFB al 2% (utilizando la IC<sub>50</sub> reportada en el trabajo de maestría de Maldonado-Cano 2023 y un control negativo sin EFG en DMEM con SFB al 2%).

los tratamientos se retiraron 24 h después para agregar 200 ul de solución MTT / PBS 1X a una concentración de 0.5 mg/ml dejando incubar la placa durante una hora a 37°C. Posteriormente se retiró el reactivo y se agregó 150 ul de DMSO para disolver los cristales de formazán. Finalmente se leyó la absorbancia a 540 nm en un GloMax®- Multi + Microplate Multimode Reade (FCN, Juriquilla). Para confirmar la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) se graficó el porcentaje de viabilidad celular interpolando con la curva de calibración.

#### **4.2.5 Extracción de proteínas**

Se sembraron células SW480 ( $8 \times 10^6$ ) en 4 placas de 100 mm con DMEM +10% SFB y se mantuvieron en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 24 h, al siguiente día se retiró el medio y se dividió en dos grupos:

- Tratamiento con EFG: Se agregó IC<sub>50</sub> de EFG en DMEM + 2% SFB
- Control negativo: Solo DMEM con 2% SFB

Se mantuvieron las placas con tratamiento de EFG y control negativo durante 24 h, posteriormente se retiró el medio a los dos grupos y se realizó un lavado con PBS 1X. Para la extracción de proteínas se agregó tampón RIPA (1ml) junto con inhibidor de proteasas (10µl) (Thermo Fisher) a cada placa a una temperatura de 4°C para realizar un raspado a cada placa. Las lisados celulares se centrifugaron a 14000

rpm por 10 min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf de 0.5 ml y se almaceno a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.6 Determinación de proteínas totales**

La determinación de proteínas totales se determinó con el ensayo de ácido bicinonónico (BCA) (BCA Pierce <sup>TM</sup> (23223), ABP Biosciences) en el cual se produce la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  por proteína en un medio alcalino con la detección del cobre ( $\text{Cu}^{1+}$ ) por BCA, generando una coloración azul claro que al unirse a la proteína estándar como albúmina se genera la coloración púrpura por la unión de dos moléculas con el cobre. Se midió la concentración en una placa de 96 pozos y para ello se realizó una curva de calibración de albumina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 0, 1.25, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En la placa se mezcló 10  $\mu\text{L}$  de cada concentración y 200  $\mu\text{L}$  de BCA (componente A+B) luego se mezcló e incubó a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y se leyó a 562 nm en el equipo Tecan Infinite M200 PRO (Smith, P. & Krohn, 1985).

#### **4.2.7 Electroforesis**

Una vez determinada la concentración de proteínas, se separaron en un gel de electroforesis por el método SDS-PAGE. Se usaron geles de poliacrilamida al 10%, cargando 20 ug de proteína de los siguientes grupos: NT1 (Grupo control 1), NT2 (Grupo control 2), GT1 (Grupo 1 con EFG), GT2 (Grupo 2 con EFG). Las proteínas fueron separadas bajo condiciones de corriente eléctrica constante, amperaje y tiempo: 150 volts, 0.07 mA en 60 min, respectivamente. El gel se corrió en una cámara de electroforesis mini protean III de BioRad (BioRad, Hercules, CA, USA). La tinción se hizo con azul de Coomassie G-250 (Serva, Heidelberg, GER) durante 12 h y finalmente se destiñó el gel con la solución desteñidora, dejándose en agitación por 2 horas con lavados cada 20 minutos, hasta observar el gel transparente con las proteínas marcadas.

#### **4.2.8 Análisis de matriz de apoptosis humana**

Se utilizó una matriz de perfiles de proteoma, basada en un kit de arreglo de apoptosis humano que detecta 35 proteínas relacionadas con apoptosis (895943, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Éste contiene anticuerpos de captura detectados por duplicado en membrana de nitrocelulosa que se unen a las proteínas diana específicas presentes en la muestra en el cual se agregaron 250 µl de proteína en cada membrana separadas en grupos como se describió anteriormente. La detección se realizó con anticuerpos biotinilados y se visualizaron con la estreptavidina-HRP. Finalmente se agregó Chemi Reagent Mix para detectar puntos inmunorreactivos y las imágenes fueron capturadas ChemiDoc Bio-Rad XRS+ (UVP, USA).

#### **4.2.9 Análisis bioinformático de proteínas moduladas por EFG**

Para la realización del análisis bioinformático se utilizó la plataforma STRING® para indicar una red de interacción de las proteínas moduladas por el EFG en células SW480, estimando los procesos biológicos y las vías de señalización involucradas.

#### **4.3 Análisis estadístico de la información**

Los resultados son expresados con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para calcular diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Se utilizó el software GraphPad Prism versión 9.2.0 (283).

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1 Fermentación colónica**

El colon es reconocido como un órgano que desempeña un papel importante en la salud gastrointestinal por la presencia de microbiota intestinal (Arbizu y Nurko, 2016)

ya que ésta puede fermentar residuos de alimentos resistentes a la digestión por enzimas entéricas, permitiendo la liberación de AGCC como el butirato principalmente con propiedades antineoplásicas y suprimiendo la carcinogénesis modulando la expresión génica y epigenética (O’Keefe, 2016). Actualmente se sabe que los cambios de pH durante la fermentación colónica *in vitro* es un indicador indirecto de la producción de AGCC por la fermentación de sustratos fermentables reportado por Agudelo y col. (2018). El Cuadro 4 nos indica los cambios en el pH durante el tiempo de fermentación de las muestras blanco, control y con EFG. Durante la medición del pH en los diferentes tiempos de fermentación, observamos cambios en el pH de las muestras.

**Cuadro 4.** Valores de pH obtenidos durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible fermentada de garambullo (FNDFG).

Muestra	0 H	6H	12 H	24 H
<b>FNDFG</b>	<b>6.70 ± 0.07<sup>2</sup></b>	<b>6.32 ± 0.03<sup>4bc</sup></b>	<b>6.48 ± 0.03<sup>4bc</sup></b>	<b>6.76 ± 0.05<sup>23c</sup></b>
<b>Blanco</b>	<b>6.71 ± 0.01<sup>2</sup></b>	<b>6.57 ± 0.01<sup>4ac</sup></b>	<b>6.65 ± 0.05<sup>4ac</sup></b>	<b>6.80 ± 0.03<sup>23c</sup></b>
<b>Control</b>	<b>6.73 ± 0.02<sup>234</sup></b>	<b>4.5 ± 0.02<sup>134ab</sup></b>	<b>4.09 ± 0.02<sup>124ab</sup></b>	<b>3.82 ± 0.01<sup>123ab</sup></b>

Los datos obtenidos se muestran como la media ± desviación estándar de tres repeticiones. Los números nos indican diferencias significativas <0.05 entre filas y la letra indica diferencias significativas por columna (ANOVA, prueba *post hoc* de Tukey p<0.05). Control (rafinosa).

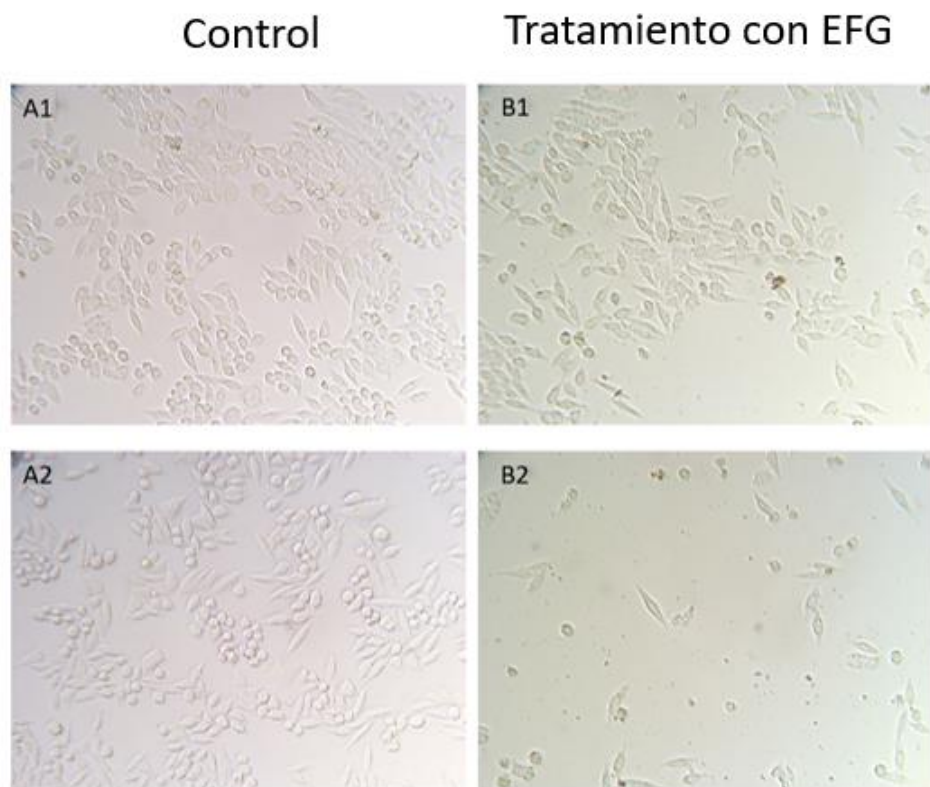
La degradación de las fibras dietéticas por exoenzimas conlleva a obtener una mayor cantidad de AGCC que crean un medio ligeramente ácido con valores entre pH 5.5 y 6.5 (Zimmer *et al.*, 2012). Nuestros resultados no muestran un descenso evidente en el nivel de pH conforme al tiempo, sin embargo, en un estudio realizado dentro de nuestro grupo de laboratorio (datos no publicados) se pudo observar que la producción de AGCC a partir de la fermentación del garambullo produce mayor cantidad de ácido butírico que de ácidos acético y propiónico. Se ha reportado que el ácido acético es el que mayormente contribuye a la acidificación del medio por fermentación de fibras, por lo que podemos sugerir que la fermentación de nuestro

EFG también está produciendo mayor cantidad de ácido butírico, aunque los resultados en la disminución de pH no fueron estadísticamente significativos.

## **5.2 Viabilidad celular**

La línea celular SW480 se trató con 15% del EFG durante 24 h y se analizó la tasa de supervivencia celular. Los resultados confirmaron que el EFG disminuyó 51.1 % la viabilidad celular de las células SW480 de una manera dependiente de la dosis en comparación con células sin tratamiento ( $p < 0.05$ ) corroborando la  $IC_{50}$  de 15% anteriormente reportada en nuestro grupo de investigación.

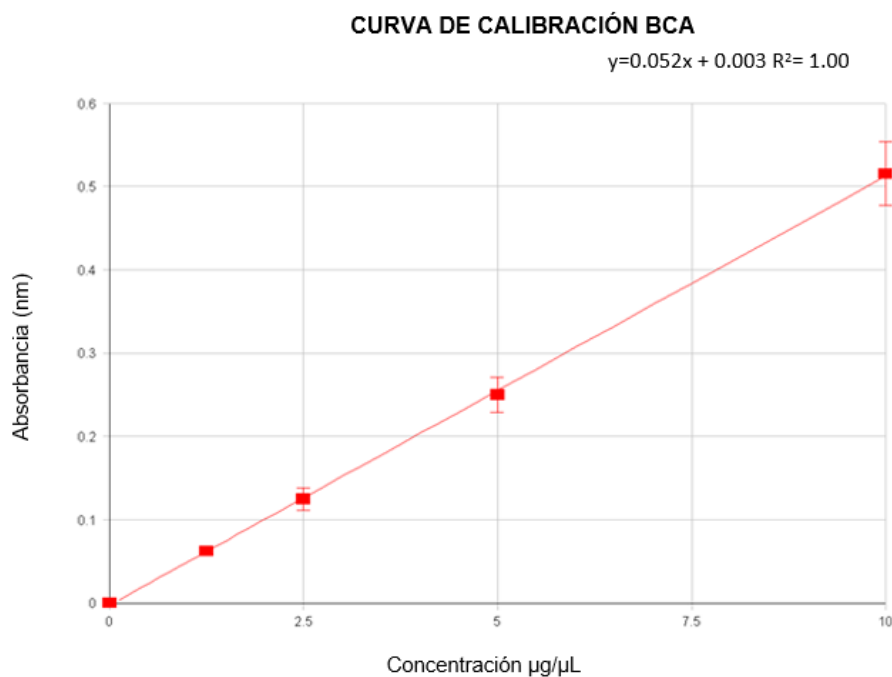
Se obtuvieron imágenes de las células previas a la extracción de proteínas totales de la línea celular SW480, para visualizar las diferencias del grupo control sin EFG y con tratamiento de EFG a las 24 h. Como se muestra en la Figura 4 (B1 y B2) no se pueden apreciar a simple vista cambios en la morfología de las células, pero si se observa una diferencia en la densidad celular en los campo captados, en comparación a células sin EFG (figura A1 y A2). Estas imágenes se tomaron con un aumento de 25X bajo microscopio óptico (Microscopio LUZEREN y software VELAB).



**Figura 4.** Fotografías representativas de células SW480 de grupo control y tratamiento con EFG durante 24 h. A1 y A2 nos muestran células con morfología y arquitectura celular normal de la línea celular SW480 vs las células tratadas con EFG en B1 y B2 con una aparente densidad celular menor.

### 5.3 Cuantificación de proteínas totales

En el ensayo colorimétrico BCA, se realizó la curva estándar para posteriormente obtener las concentraciones de nuestras proteínas del grupo control sin EFG (-) y con tratamiento de EFG obteniendo la siguiente gráfica:



**Figura 5.** Curva de calibración BCA con los patrones de albúmina de suero bovino con las concentraciones (10, 5,2.5, 1.25 y 0 µg/µL) obteniendo una R= 1.

El Cuadro 5 indica las concentraciones obtenidas de los grupos control (-) y de tratamiento con EFG:

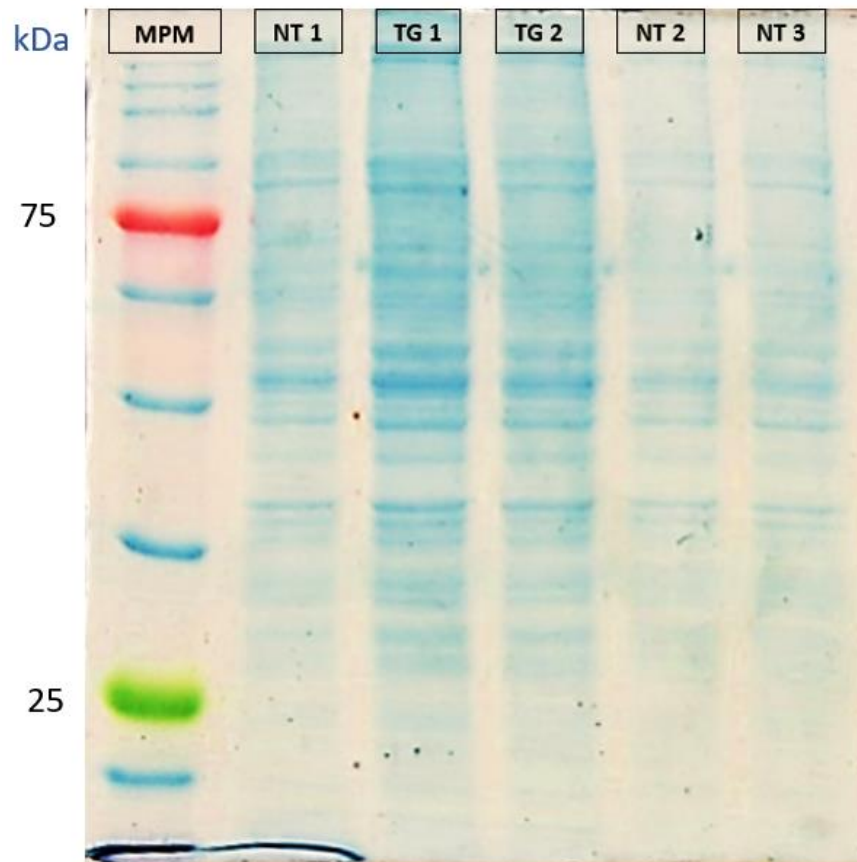
Grupos	Concentración de proteína
Control (-) NT 1	2.11 µg/µL
Control (-) NT 2	2.68 µg/µL
Tratamiento TG 1	1.55 µg/µL
Tratamiento TG 2	1.71 µg/µL

**Cuadro 5.** Se obtuvieron las concentraciones de la extracción de proteínas realizadas al control sin EFG (-) y tratamiento con EFG en el cual se observa un promedio de concentración de proteína de 1.50 a 2.50 µg/µL.

## 5.4 Electroforesis

Para verificar la presencia de las proteínas totales previamente cuantificadas por el método de BCA, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, cargando 20 µg de muestra de cada grupo, agregando el marcador de peso molecular en el

primer carril del gel. La Figura 7 nos muestra las proteínas corridas durante la electroforesis, corroborando la integridad de estas en todos los grupos. Posteriormente se procedió a realizar los arreglos de proteínas para determinar el efecto del tratamiento con EFG a nivel molecular en las células SW480.



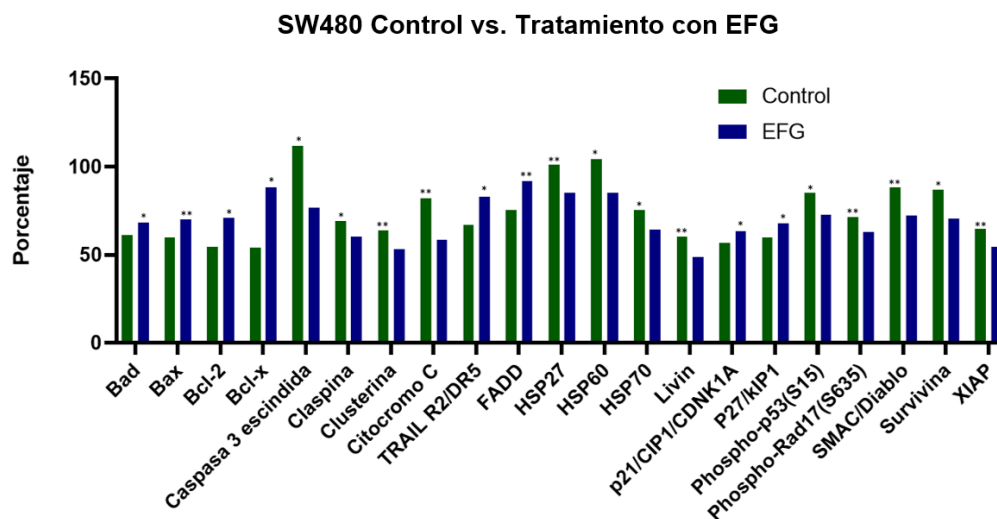
**Figura 6.** Perfil de electroforesis con tinción con Coomassie con tratamientos de EFG (TG) y grupo control sin EFG (NT). MPM, Marcador de peso molecular; NT1, Grupo control (-) TG1, Tratamiento al 15%; TG2, Tratamiento al 15%. NT1, Grupo control. NT3, Grupo control. Tiempo de tinción 12 h.

### **5.5 Análisis de proteínas involucradas con la apoptosis en la línea celular SW480**

Este análisis se realizó mediante inmunodetección de 35 proteínas relacionadas con apoptosis. La Figura 8 muestra los valores de los cambios obtenidos de las diferentes proteínas provenientes de células tratadas (15 % EFG) durante 24 h vs



las no tratadas (grupo control sin EFG) en la línea celular SW480. El EFG moduló la expresión de 21 proteínas, observándose un aumento 8 proteínas y una disminución de 13 proteínas.



**Figura 7.** Efecto del tratamiento con EFG (IC<sub>50</sub> 15%) en células SW480 durante 24 h vs grupo sin EFG (grupo control). Los datos se expresan como media ± DE (n=2). Las diferencias entre células control y con tratamiento se analizaron con la prueba t de student, \* p < 0,05 y \*\* p < 0,01 con el software GraphPad Prism 8.

El análisis de proteínas relacionadas con apoptosis reveló una regulación positiva de Bcl-2 en un 16% y un 34% de Bcl-x en comparación de 10% de Bax y 7% de Bad dando como sugerencia que la muerte apoptótica inducida por el EFG ocurre mediante vía apoptótica extrínseca sin la utilización de la vía mitocondrial, teniendo como resultado una regulación negativa de citocromo C de 24% y SMAC/Diablo de 16%.

Simultáneamente se evidenció un aumento de la expresión de Bcl-2/Bcl-x que disminuye la oligomerización y la actividad de formación de poros en la mitocondrias por proteínas Bax/Bad (Watson, 2004). En comparación con lo reportado anteriormente por Hwang y cols. (2007) mostraron que Bcl-2 está regulado negativamente en células HT-29 por genisteína, sin embargo la fracción no digerible no contiene esta isoflavona. También se ha informado una disminución de Bcl-2 con

la utilización de extractos fenólicos de bayas reportado por Wu y cols. (2007). Dichas diferencias pueden estar asociadas a que los extractos utilizados reportados en otros estudios no han pasado por una fermentación colónica en comparación a la fracción no digerible. En otras investigaciones (Lozano-Casablanca *et al.*, 2023) evaluaron las proteínas expresadas presentes en las vías apoptóticas y se comprobó un aumento de Bcl-2/Bcl-x, concluyendo que estas proteínas disminuyen la oligomerización y la actividad de formación de poros en mitocondrias generando una regulación negativa de citocromo C y SMAC/Diablo. De acuerdo con un metaanálisis realizado por Huang y col. (2017) indican que el aumento en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 se relaciona con una mejor supervivencia en pacientes con B de Dukes, demostrando que la falta de expresión de esta proteína se correlaciona con invasión, metástasis y recurrencia al CC.

Por otra parte, el EFG redujo los niveles de proteínas de la familia IAP como XIAP (10%), livina (12%) y survivina (16.5%), esta disminución se asocia con la activación de apoptosis y la inducción de la expresión de p27 que se encuentra regulado positivamente sugiriendo que al aumentar esta proteína se genera una inhibición de ciclo celular, disminuyendo la proliferación y motilidad de las células cancerígenas (Myung *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2006). En estudios realizados por Pereira y cols. (2018) al analizar el efecto del ácido clorogénico de *Achillea millefolium L.* en células HCT-15 se vio una reducción de expresión de XIAP y pro-caspasa 3. Cabe señalar que el EFG contiene dicho compuesto bioactivo. Estas proteínas son reguladores negativos de las actividades de caspasas 3, 7 y 9 y al encontrarse disminuidas podemos sugerir que la regulación negativa de caspasa 3 escindida se dio por la supresión de estímulos apoptóticos de la vía intrínseca (Mace *et al.*, 2010).

Otra de las proteínas que se vio sobreexpresada es p21 que está involucrada en el ciclo celular, conduciendo una desregulación de la transición G2/M, resultando en defectos mitóticos e inestabilidad genómica de la célula cancerosa, lo que coincide con los resultados de Maldonado-Cano y cols. (2022), que encontró un arresto al ciclo celular en esa etapa inducido por el EFG en el mismo linaje celular. Se sugiere

así la generación de la activación de apoptosis donde p21 puede ser activada a través de mecanismos dependientes e independientes de p53 (Mullan *et al.*, 2006). p53 es importante como factor transcripcional de p21 y su mutación está relacionada con la disminución de expresión de p21, (Matsuda *et al.*, 2017). Se ha observado que las bayas (específicamente extractos) pueden generar un aumento de expresión de p21, p27, p16 induciendo un arresto del ciclo celular que puede inducir a apoptosis generado por estrés oxidativo (Kristo *et al.*, 2016), sugiriendo así el resultado de la disminución de p53 que se encuentra mutado en esta línea celular.

Anteriormente, nuestro grupo de trabajo había determinado que el EFG activa la cascada de apoptosis (Maldonado-Cano *et al.*, 2023) con el análisis de citometría de flujo y Anexina V. Por lo que se propone que la vía modulada por el EFG es la vía extrínseca, dada la sobreexpresión de TRAIL R1/DR5 (16%) y FADD (16%), permitiendo la activación de esta vía. Sugiriendo que la inducción a la apoptosis es mediada por la caspasa 7 ejecutora. Anteriormente se creía que esta caspasa era funcionalmente redundante con caspasa 3, pero se ha demostrado que esta caspasa conduce a la apoptosis o inflamación de manera independiente a caspasa 3 (Lamkanfi y Kanneganti, 2010).

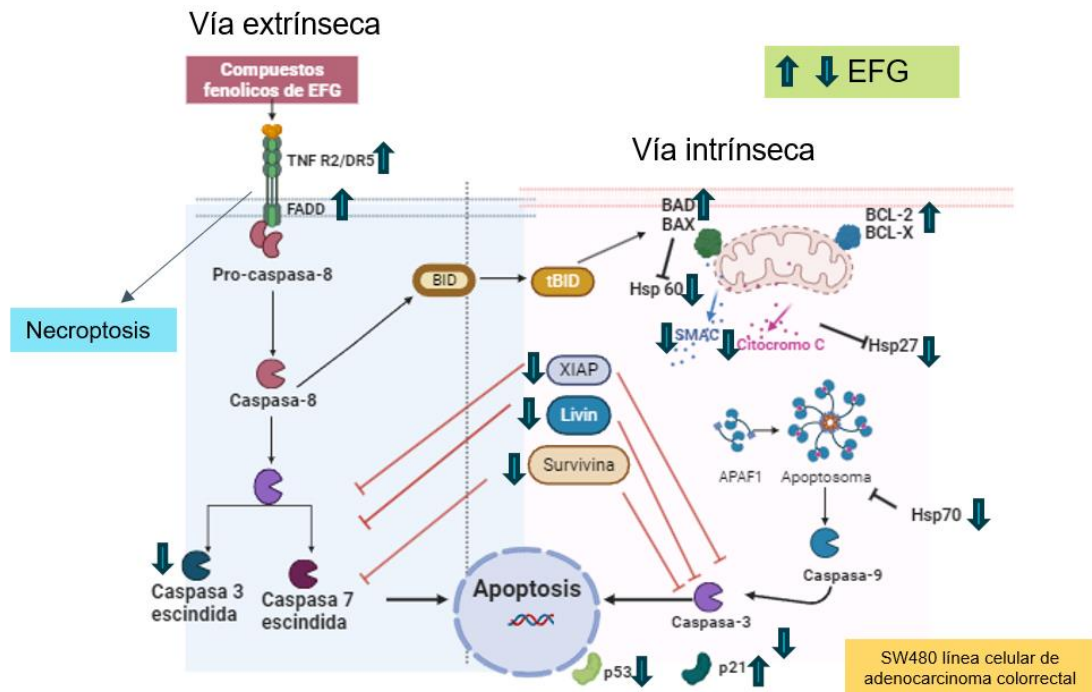
En un estudio realizado por Arango-Varela y cols. (2021) se evaluó el efecto de un extracto de baya andina (*Vaccinium meridionale*) en células SW480 sobre la inducción de apoptosis, obteniendo como resultado el aumento del 40.6% de este tipo de muerte celular, sin permeabilización de la membrana mitocondrial, sugiriendo una apoptosis extrínseca. Posteriormente se realizó un análisis proteómico para verificar la expresión de proteínas con tratamiento del jugo de baya andina (*Vaccinium meridionale*) donde se ejerce una disminución de pro-caspasa 3 y caspasa 3 escindida, sugiriendo que la apoptosis no es el principal mecanismo de muerte celular inducido por este extracto (Arango-Varela *et al.*, 2022). Por otro lado en estudios con punicalagina los investigadores encontraron una reducción de la

actividad de caspasas 3/7, caspasa 8 y 9 a las 72 h de tratamiento en células HCT116, sugiriendo otro mecanismo de muerte además de la apoptosis (Ganesan et al., 2020).

Los resultados por Maldonado-Cano (2022) mostraron que la apoptosis no es la única muerte celular inducida por EFG, también se vio activada la necrosis sugiriendo una regulación directa sobre moléculas involucradas. Dicho estudio sugirió la activación de otro tipo de muerte celular resultado de un proceso que imita las características de la apoptosis y necrosis: necroptosis. En el presente estudio se demostró la activación de receptores específicos (TRAIL R2/DR5 y FADD ambos con un aumento del 16% respecto al control sin EFG) modulados por el EFG y que nos sugieren la activación del proceso llamado necroptosis.

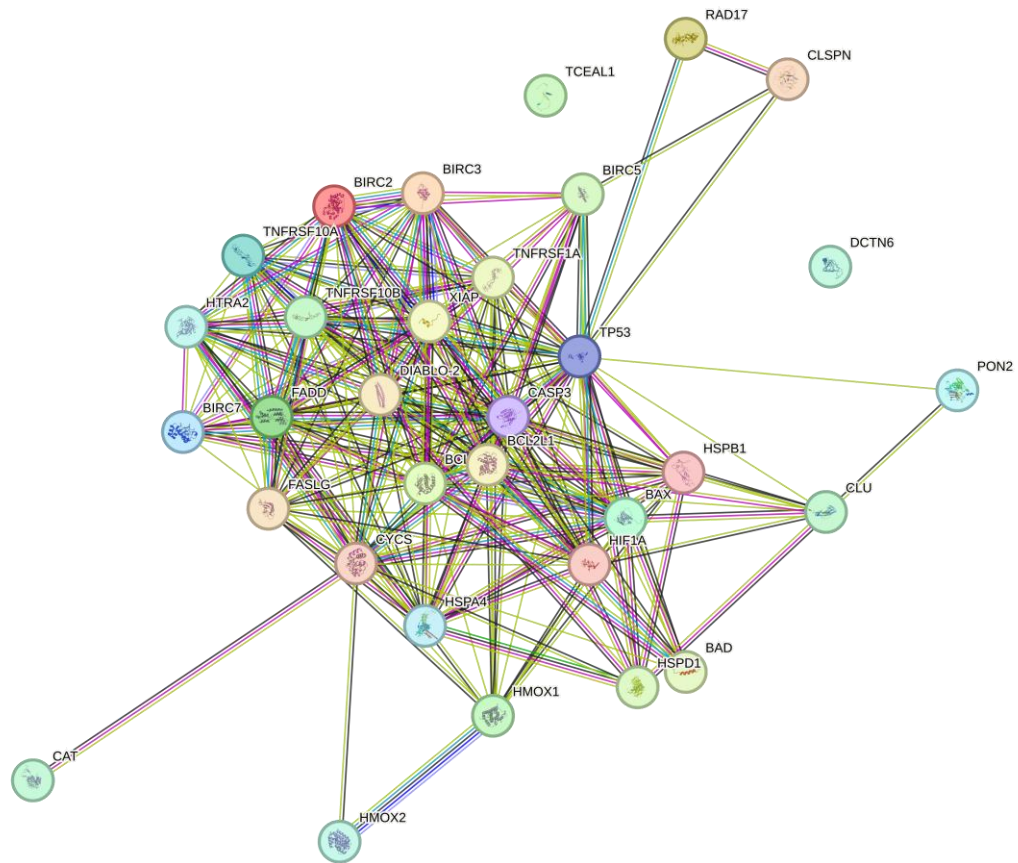
En el estudio de Arango-Varela y cols. (2022) se reportó una activación de necrosis y apoptosis en células SW480 tratadas con el jugo de bayas andinas (*Vaccinium meridionale*), comprobándose igualmente la activación de necroptosis con el análisis bioinformático de las principales funciones moleculares y la activación de mecanismos asociados con HIF-1 $\alpha$ .

En la Figura 8 se muestra un resumen general de los mecanismos involucrados. El tratamiento con EFG aumentó las proteínas TRAIL, FADD, pero disminuyó a caspasa-3 escindida lo que podría sugerir activación de apoptosis por vía extrínseca, mediada por caspasa 7, ya que también inhibió proteínas antiapoptóticas (XIAP, survivina, livin, Hsp70, Hsp 27, Hsp60). También se mostró una activación de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-x y una disminución de citocromo C, Smac/Diablo lo que sugiere una apoptosis sin permeabilidad mitocondrial (intrínseca). Se sugiere que la actividad anticancerígena del EFG es debido a los extractos fenólicos presentes que tienen un efecto directo sobre los receptores de TNF.



**Figura 8.** Se muestra el resumen general de los mecanismos involucrados en la apoptosis en células SW480 tratadas con el EFG. Las flechas indican un aumento o disminución de las proteínas seleccionadas. Gráfico realizado con Biorender.com EFG: Extracto de fermentación de garambullo. (Lozano-Casablanca *et al.*, 2023).

Se realizó un análisis de red de interacción de proteína-proteína (PPI) en la base de datos STRING® (Szklarczyk *et al.*, 2023). STRING es una base de interacciones de proteínas conocidas y previstas que incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales). En la Figura 9 se muestran los 32 nodos de la red (círculos de colores) que representan proteínas. Las líneas de colores entre los nodos (bordes) indican los diferentes tipos de interacción entre estas. Por vecindad de genes (línea verde), fusión de genes (línea roja), coocurrencia de genes (línea azul), extracción de textos (línea amarilla), coexpresión (línea negra), homología de proteínas (línea azul claro).



**Figura 9.** Muestra el análisis proteómico de proteínas moduladas por EFG predichas en STRING® para la línea celular SW480. (Szklarczyk, D. et al.,2023).

El análisis bioinformático de los procesos biológicos, vías de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) y ontología de genes se presentan en el **Cuadro 6**. Como se observó en el tratamiento con EFG predijeron la actividad del receptor TNF y la unión de TRAL, lo que sugiere una preferencia del EFG por procesos apoptóticos extrínsecos. La mayoría de los procesos biológicos se asociaron a regulación de proceso apoptótico y vía de señalización apoptótica extrínseca a través de receptores del dominio de la muerte. La apoptosis es el principal proceso de desarrollo por el tratamiento del EFG, como lo predice la vía KEGG y como una segunda posible vía la necroptosis. Y finalmente en la ontología

de genes predijo la actividad reguladora e inhibidora de la endopeptidasa tipo cisteína implicada en la apoptosis, unión de proteína chaperona, unión a enzimas.

**Cuadro 6.** Procesos biológicos, vías KEGG y oncología de genes tras el análisis STRING® de proteínas moduladas por EFG en células SW480. Análisis de interacción proteicas. (Szkłarczyk, D. et al.,2023). FDR: Tasa de descubrimiento falso. KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto.

<b>Proceso biológico</b>	<b>FDR</b>	<b>Proceso biológico</b>	<b>FDR</b>
Proceso apoptótico	1.49x 10 <sup>-18</sup>	Respuesta al estrés	4.25x10 <sup>-11</sup>
Regulación del proceso apoptótico	2.13x10 <sup>-17</sup>	Regulación de actividad catalítica	6.53x10 <sup>-11</sup>
Vía de señalización apoptótica	3.90x10 <sup>-17</sup>	Regulación de proteólisis	7.62x10 <sup>-11</sup>
Vía de señalización apoptótica intrínseca	1.06x10 <sup>-15</sup>	Regulación de función molecular	7.62x10 <sup>-11</sup>
Actividad reguladora de endopeptidasa tipo cisteína	7.36x10 <sup>-14</sup>	vía de señalización apoptótica extrínseca	3.24x10 <sup>-12</sup>
Vía de señalización apoptótica extrínseca a través de receptores del dominio de la muerte	1.24x10 <sup>-13</sup>	Regulación positiva del proceso apoptótico	1.70x10 <sup>-11</sup>
<b>Vía KEGG</b>	<b>FDR</b>	<b>Vía KEGG</b>	<b>FDR</b>
Apoptosis	5.05x10 <sup>-26</sup>	Cáncer colorrectal	9.67x10 <sup>-08</sup>
Apoptosis- múltiples especies	1.89x10 <sup>-25</sup>	Resistencia a los medicamentos de platino	2.71x10 <sup>-19</sup>
Vías en el cáncer	5.62x10 <sup>-14</sup>	Vía de señalización del TNF	1.48x10 <sup>-05</sup>
Necroptosis	2.03x10 <sup>-12</sup>	Vía de señalización p53	2.08x10 <sup>-11</sup>
<b>Ontología de genes</b>	<b>FDR</b>	<b>Ontología de genes</b>	<b>FDR</b>
Actividad reguladora de la endopeptidasa tipo cisteína implicada en la apoptosis	4.89x10 <sup>-07</sup>	Actividad inhibidora de la endopeptidasa tipo cisteína implicada en la apoptosis	1.28x10 <sup>-06</sup>
Vinculación de dominio BH3	0.00027	Actividad de homodimerización de proteínas	0.0192
Fijación TRAIL	0.0109	Vinculación a p53	0.0306
Unión a proteína chaperona	0.0185	Actividad molecular de la función reguladora	0.0239
Unión a enzimas	4.29x10 <sup>-05</sup>	Unión de la proteína ligasa de ubiquitina	0.0192

## 6. CONCLUSIONES

En el presente estudio se implementó la simulación gastrointestinal *in vitro* utilizando microbiota fecal humana permitiendo así la obtención de un extracto de fermentación de garambullo, por lo que podría decirse que la digestión *in vitro* fue un método de menor costo, rápido y reproducible para dilucidar la obtención de metabolitos relacionados en este ensayo con la inhibición de células cancerígenas.

Se confirmó el efecto inhibitorio del EFG, dosis-dependiente, sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma humano, obteniendo también una  $CL_{50}$  del 15%.

El EFG genera cambios en la presencia de proteínas involucradas en apoptosis en la línea celular SW480. Este estudio sugirió la participación de la muerte celular por el proceso conocido como necroptosis, debido al aumento de los receptores de muerte TNF relacionados con las dos vías.

Replicar esta investigación sobre proteínas relacionadas con necroptosis nos proporcionará una mejor comprensión sobre las diferentes posibles vías de muerte celular, ya que los ensayos actuales solo estaban enfocados en apoptosis. Estudios adicionales, como el potencial mitocondrial, podrían confirmar que la vía intrínseca no puede ser activada bajo el tratamiento del EFG.

La combinación de alimentos naturales como el garambullo y el medicamento para el tratamiento de cáncer de colon, puede ayudar a reducir los efectos secundarios y dosis del tratamiento farmacológico, teniendo como resultado un beneficio para la salud del paciente que disminuyan los riesgos de la enfermedad. Este estudio cuenta con ciertas limitaciones ya que sería recomendable evaluar proteínas relacionadas con la muerte celular (necroptosis), junto con un análisis bioinformático y conocer la red de interacciones de proteínas, estimando los procesos biológicos involucrados.



### 3.3 Bibliografía

- Agrosíntesis. (5 de septiembre de 2018). Desarrollan transformación y conservación del garambullo. *Agrosíntesis*, 2. Obtenido de <https://www.agrosintesis.com/desarrollan-transformacion-y-conservacion-del-garambullo/>
- Afrin S, Giampieri F, Gasparini M, Forbes-Hernandez TY, Varela-López A, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*. 2016 Jan 30;21(2):169. doi: 10.3390/molecules21020169. PMID: 26840292; PMCID: PMC6273426.
- Agudelo CD, Luzardo-Ocampo I, Campos-Vega R, Loarca-Piña G, Maldonado-Celis ME. (2018) Bioaccessibility during In Vitro Digestion and Antiproliferative Effect of Bioactive Compounds from Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) Juice. *J Agric Food Chem*. 7358-7366. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01604.
- Álvarez-Díaz, S., Preaudet, A., Samson, A.L. (2021). Necroptosis is dispensable for the development of inflammation-associated or sporadic colon cancer in mice. *Cell Death Differ* **28**, 1466–1476. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00673-z>
- American Cancer Society. (2018). <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-y-sintomas.html>
- American Society of Clinical Oncology. (2019). Diet and cancer risk. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/prevenci%C3%B3n-y-vida-saludable/alimentaci%C3%B3n-y-el-riesgo-de-c%C3%A1ncer>
- Andrade, C. y Rodríguez, M. (2022). Productos naturales y cáncer de colon asociado a colitis. *UNAM*.
- Arredondo, J.F., Pérez-López, A., Guerra-Ramírez, D. (2020). Caracterización física y bioquímica de frutos de garambullo (*Myrtillocatus geometrizans*). *Química, etnobotánica, economía y finanzas*.

- Badui-Dergal, S. (2013). *Química de alimentos* (Vol. 5). Pearson. Obtenido de chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://itscv.edu.ec/wp-content/uploads/2019/06/QUIMICA-DE-LOS-ALIMENTOS-4ta-Edicion.pdf
- Becerra, V. y Pimienta, H. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia médica*, 40(1).
- Benítez R., De Winter A., Fernández M., Wantiez L. (2019). *Universidad Salamanca*. <http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/Caspasas/index.html>
- Bolaños-Carrillo MA, Ventura-Gallegos JL, Saldivar-Jiménez AD, Zentella-Dehesa A, Martínez-Vázquez M. (2015) Effect of Sterols Isolated from Myrtillocactus geometrizans on Growth Inhibition of Colon and Breast Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. doi: 10.1155/2015/589350.
- Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell*. 71-82. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00755-4. PMID: 14532004.
- Brennall, M., Rodríguez-Menocal, L., De Guevara, RL., Cepero & Boise, L. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*. doi.org/10.1186/1471-2121-14-32
- 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), 59-65. doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x
- Campos-Vega, R.; Oomah, K. Vázquez-Sánchez D. López-Barrera G. Loarca-Piña S. & Mendoza-Díaza B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research Internacional*, 2-29. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.024
- Chen H, Yuan J. (2017) Necroptosis and Cancer. *Trends Cancer*. 294-301. doi: 10.1016/j.trecan.2017.03.002.

- Corzo-Ríos, L., Bautista-Ramírez, M.E., Mercedes, Y. y Torres-Bustillos, L.G. (2017). Frutas de cactáceas: Compuestos bioactivos y sus propiedades nutraceuticas. *Propiedades Funcionales de hoy*, 35-66. doi:10.3926 / oms.360
- Costea T, Hudiță A, Ciolac OA, Gălățeanu B, Ginghină O, Costache M, Ganea C, Mocanu MM.(Nov 2018) Chemoprevention of Colorectal Cancer by Dietary Compounds. *Int J Mol Sci*. 28. doi: 10.3390/ijms19123787.
- Christofferson DE, Yuan J. (2010) Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 263-8. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.003.
- Croft M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. 271-85. doi: 10.1038/nri2526.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 112-9. doi: 10.1038/nchembio711.
- Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. *Food Science*, 2862-2884. doi:10.1111/1541-4337.12623
- Escudero, P. y Gonzalez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición hospitalaria*, 21(2), 61-72.
- Fernández-Miranda, C. (2010). La fibra dietética en la prevención del riesgo cardiovascular. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 30(2), 4-12.
- Fearon ER, Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1;61(5):759-67. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
- Fletcher, J.I., & Huang, D.C. (2006). BH3-only proteins: orchestrating cell death. *Cell death differ*, 1268-71. doi:10.1038/sj.cdd.4401995
- Foveau B, Van Der Kraak L, Beauchemin N, Albrecht S, LeBlanc AC. (2014) Inflammation-induced tumorigenesis in mouse colon is caspase-6 independent. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0114270.

- Fragoso, M., Vargas, G., Jiménez, S. Reyes, O. y Ramírez, J. (2014). El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 334-44. Obtenido de [https://www.anmm.org.mx/GMM/2014/n4/GMM\\_150\\_2014\\_4\\_334-344.pdf](https://www.anmm.org.mx/GMM/2014/n4/GMM_150_2014_4_334-344.pdf)
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.F., Vallette, F.M., Manon, S., & Juin, P. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *Cell biology*, 185(2), 279-290. doi:10.1083/jcb.200809153.
- Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Martin, P. M., & Singh, N. (2013). Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. *Pharmacol*, 869-874. doi:10.1016/j.coph.2013.08.006
- Ganesan T, Sinniah A, Chik Z, Alshawsh MA. Punicalagin Regulates Apoptosis-Autophagy Switch via Modulation of Annexin A1 in Colorectal Cancer. *Nutrients*. 2020 Aug 13;12(8):2430. doi: 10.3390/nu12082430.
- García-García, Ma., González-Moles, & Bascones, A. (2006). Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. *Avances en odontoestomatología*. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852006000500002](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852006000500002)
- Garribba L, De Feudis G, Martis V, Galli M, Dumont M, Eliezer Y, Wardenaar R, Ippolito MR, Iyer DR, Tijhuis AE, Spierings DCJ, Schubert M, Taglietti S, Soriani C, Gemble S, Basto R, Rhind N, Fojier F, Ben-David U, Fachinetti D, Doksani Y, Santaguida S. (March 2023) Short-term molecular consequences of chromosome mis-segregation for genome stability. *Nat Commun*. 11;14 doi: 10.1038/s41467-023-37095-7.
- Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*. (4):310-319. doi: 10.1016/j.molmed.2017.02.001.
- Gomez, C., Drummond, S., Guimarães, C., Andrade, C., Mesquita, R., & Gomez, R. (2008). P21/WAF1 and cyclin D I variants and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 151(6), 151-156. doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00604.x

- Gómez-Maqueo, A., Escobedo-Avellaneda, Z., & Welte-Chanes, J. (2020). Phenolic Compounds in Mesoamerican Fruits—Characterization, Health Potential and Processing with Innovative Technologies. *Internacional Journal of molecular sciences*. doi:10.3390/ijms21218357
- Grossmann J, Mohr S, Lapentina EG, Fiocchi C, Levine AD. (1998) Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1117-24. doi: 10.1152/ajpgi.1998.274.
- Guicciardi ME, Gores GJ. (2013) Unshackling caspase-7 for cancer therapy. *J Clin Invest*. 2013 Sep;123(9):3706-8. doi: 10.1172/JCI71440. PMID: 23979156; PMCID: PMC3754280.
- Guzmán-Maldonado, S., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., & Brat, P. (2010). Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry*, 381-386. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.039
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1100-11. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021.
- Hernández-López, D., Vaillant., Reynoso-Camacho, R. and Guzman-Maldonado, S. (2008). *Myrtillocactus* (Cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruit. *Fruits*, (63)5:269-276. doi:10.1051/fruits:2008042.
- Herrera, M., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R., & Guzman-Maldonado, S. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129, 1744-1750. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.06.042
- Hur, S., Lim, B., Decker, E., & McClements, J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036

- Huang Q, Li S, Cheng P, Deng M, He X, Wang Z, Yang CH, Zhao XY, Huang J. (2017) High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* (27):5018-5033. doi: 10.3748/wjg.v23.i27.5018.
- Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM, Park OJ. (2007) Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* doi: 10.1016/j.canlet.2006.03.030. Epub 2006 Jun 21. PMID: 16797120.
- INEGI. (4 de Febrero de 2021). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer.* [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.* 9357-60. doi: 10.1074/jbc.273.16.9357.
- Jin, Z., & El-Deiry, W. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Cell*, 139-163. doi:10.4161/cbt.4.2.1508
- Jordán J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica.* <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13049112>
- Josse C., & Bours, V. (2016). MicroRNAs and Inflammation. *Adv Exp Med Biol.*, 56. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2\_3.
- Kawasaki H, Taira K. (2002). A functional gene discovery in the Fas-mediated pathway to apoptosis by analysis of transiently expressed randomized hybrid-ribozyme libraries. *Nucleic Acids Res.* 3609-14. doi: 10.1093/nar/gkf476.
- Kristo AS, Klimis-Zacas D, Sikalidis AK. (2016). Protective Role of Dietary Berries in Cancer. *Antioxidants (Basel).* 37. doi:10.3390/antiox5040037.
- Kronberg, U. (julio 2011). *Estrategias de prevención y detección precoz del cáncer de colon y recto en individuos de riesgo promedio y alto riesgo.* *Revista Médica Clínica Las Condes*, 493-498. doi 10.1016/S0716-8640(11)70455-2

- Labi V, Erlacher M, Kiessling S, & Villunger A. (2006). BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer. *Cell death differ*, 1325-38. doi:10.1038/sj.cdd.4401940
- Lamkanfi M, Kanneganti TD. (2010) Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 21-4. doi: 10.1016/j.biocel.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
- Liu, J. (2021). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Trends in Cell Biology*, 32(1), 30-44. doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001
- Liu, J., Zhang, C. & Feng, Z. (2014). Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46(3), 170-179. doi.org/10.1093/abbs/gmt144
- Lozano-Casabianca GA, Arango-Varela SS, Maldonado-Celis ME. (2023) Induction of Apoptosis and Decrease of Autophagy in Colon Cancer Cells by an Extract of Lyophilized Mango Pulp. *Int J Environ Res Public Health*. 4165. doi: 10.3390/ijerph20054165.
- Machado, J. y Eliécer, A. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Revista médica de ciencias médicas de Mayabeque*, 18(2). Obtenido de <http://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/572>
- Mace PD, Shirley S, Day CL. (2010) Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ*. 46-53. doi: 10.1038/cdd.2009.45.
- Maldonado-Cano, Y, Vergara-Castañeda, H, García-Solís, P, Hernández-Puga, G y Campos-Vega, R. (2023). Evaluación del efecto antiproliferativo y antioxidante del extracto de la fermentación del garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre células de cáncer de colon humano SW480. 40. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4335>.
- Maldonado, M., & Francis, R. (2010). Pro-apoptotic effects of apple procyanidins in human colon cancer cells and their derived metastatic cells. *Vitae*, 17(3), 337-347.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0121-40042010000300012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042010000300012)

- Martens, S., Bridelance, J., Roelandt, R. (2021). MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator. *Cell Death Differ* **28**, 1757–1772. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00785-0>
- Marze, S. (2022). Méthodes in vitro pour l'étude de la digestion des aliments. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 57(2), 139-147. doi:10.1016/j.cnd.2022.01.003
- Matsuda T, Kato T, Kiyotani K, Tarhan YE, Saloura V, Chung S, Ueda K, Nakamura Y, Park JH. (2017) p53-independent p21 induction by MELK inhibition. *Oncotarget*. 57938-57947. doi: 10.18632/oncotarget.18488.
- Mirzaei, R., Afaghi, A., Babakhani, S., Sohrabi, M. R., Hosseini-Fard, S. R., Babolhavaeji, K., Khani Ali Akbari, S., Yousefimashouf, R., & Karampoor, S. (julio de 2021). Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 139. doi:10.1016/j.biopha.2021.111619
- Muñoz, I., Hernández, A. y Adserias, J.F. (2018). *Elaboración de guiones para el estudio interactivo de la relación estructura-función de proteínas*. Obtenido de <http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/SupresorTumoralp53/index.html>
- Muñoz, M. (2010). *Composición de alimentos*. México: Mc Graw Hill.
- Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. (2006) The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*. 5854-63. doi: 10.1038/sj.onc.1209872.
- Myung DS, Park YL, Chung CY, Park HC, Kim JS, Cho SB, Lee WS, Lee KH, Lee JH, Joo YE. (2013) Expression of Livin in colorectal cancer and its relationship to tumor cell behavior and prognosis. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0073262.
- Nava, C. (2010). *Caracterización físicoquímica del fruto de garambullo (Myrtillocactus geometrizans)*. Queretaro: Universidad Autonoma de Querétaro.



- Negri FV, Campanini N, Camisa R. (2008). Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer*. 143-147.
- Newton K, Wickliffe KE, Dugger DL, Maltzman A, Roose-Girma M, Dohse M, Kőmúves L, Webster JD, Dixit VM. (2019) Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature*. 428-431. doi: 10.1038/s41586-019-1548-x
- Nguyen, T., Gillet. G., & Popgeorgiev, N. (2021). Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond. *Frontiers in cell and developmental biology*,, 9. doi:10.3389/fcell.2021.702404
- O'keefe, S. (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Gastroenterology*, 691-706. doi:10.1038/nrgastro.2016.165
- OMS. (Septiembre de 2021). Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OPS. (2021). *Organización Panamericana de la Salud*. [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11761:colorectal-cancer&Itemid=41765&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11761:colorectal-cancer&Itemid=41765&lang=es)
- OPS. (2020). *Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/temas/cancer>
- Palacios, E., Miro, M.J. y Boticard, C. (2011). Muerte celular y cáncer: las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, 15(2), 191-215. Obtenido de <https://www.radoctores.es/doc/1V15N2-palacios-muertecelular.pdf>
- Pereira, A., & Moreno J. 2010). Evaluation of the Use of Enzymes and Gravity Filtration for the Clarification of a diluted mixture of cactus fruit pulp (*opuntia boldinghii britton & rose*), orange and grapefruit juices. Medellín: Rev. Fac. Nal. Agr.
- Pereira JM, Peixoto V, Teixeira A, Sousa D, Barros L, Ferreira ICFR, Vasconcelos MH. (2018) Achillea millefolium L. hydroethanolic extract inhibits growth of human tumor cell lines by interfering with cell cycle and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 635-644. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.006.

- Pino, M.,C & Chung, D. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 2059-72. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- Qin, W., Ketnawa, S., & Ogawa, Y. (2022). Effect of digestive enzymes and pH on variation of bioavailability of green tea during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Science and Human Wellness*, 11(3), 669-675. doi: 10.1016/j.fshw.2021.12.024
- Quijano, M. (2016). Defects of apoptosis in cutaneous lymphoma. *Asoc Colomb Dermatol*, 174-185.
- Rea-Boutros A, Villet S, Greenland T, Mehlen P, Chebloune Y, Verdier G, & Legras-Lachuer C. (2008). Small ruminant lentivirus Tat protein induces apoptosis in caprine cell in vitro by the intrinsic pathway. *Virology*, 92-102. doi:10.1016/j.virol.2008.09.039
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 408-12. doi:10.1038/nrm2395
- Rochette PJ, Bastien N, Lavoie J, Guérin SL, Drouin R. (2005) SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *J Mol Biol*. 44-57. doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.033.
- Sánchez-Recillas E, Campos-Vega R, Pérez-Ramírez IF, Luzardo-Ocampo I, Cuéllar-Núñez ML, Vergara-Castañeda HA. (2022) Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*): effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of phytochemicals. *Food Funct*. :4699-4713. doi: 10.1039/d1fo04392g.
- Saura-Calixto F. (2011) Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J Agric Food Chem*. 43-9. doi: 10.1021/jf1036596.
- Shubach, A., Mantilla, A. & Sánchez, R. (2015). Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*, 13(24), 83-92. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a07.pdf>
- Silva, A., Gutierrez, A., & Arias, C. (2005). *Congreso Virtual Hispanoamericano de anatomia patologica*. Obtenido de <https://conganat.uninet.edu/conferencias/C016/index.html>

- Singh N, Hassan A, Bose K. (2016) Molecular basis of death effector domain chain assembly and its role in caspase-8 activation. *FASEB J.* 30(1):186-200. doi: 10.1096/fj.15-272997. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26370846.
- Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE. (2000) Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell.* 403-10. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80435-9. PMID: 10882081.
- Shlyakhtina Y, Pavet V, Gronemeyer H. (2017). Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. *Cell Death Dis.* doi: 10.1038/cddis.2017.423.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Sosa, R. (2012). Apoptosis. *Cátedra de bioquímica. UNNE*, 1-6.
- Szklarczyk, D. (2023). The STRING database in 2023: protei—protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Takahashi N, Vereecke L, Bertrand MJ, Duprez L, Berger SB, Divert T, Gonçalves A, Sze M, Gilbert B, Kourula S, Goossens V, Lefebvre S, Günther C, Becker C, Bertin J, Gough PJ, Declercq W, van Loo G, Vandenabeele P. (2014) RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature.* 95-9. doi: 10.1038/nature13706.
- Trejo-Márquez, M.A., Lira-Vargas, A.A., Pascual-Bustamante, S. (2016). Fibra para el futuro: propiedades y beneficios. *Alimentos funcionales de hoy*, 1-34. doi:10.3926/oms.354
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 135-47. doi: 10.1038/nrm3737.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 700-714.

- von Mering C., Jensen L.J., Kuhn M., Chaffron S., Doerks T., Krüger B., Snel B., Bork P. (2007). STRING 7—Recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res* 358–362. doi: 10.1093/nar/gkl825
- Wang, K., & Karin, M. (2013). Common flora and intestine: a carcinogenic marriage. *Cell* *logist*, 254-258. doi:10.4161/cl.24975
- Watanabe C, Shu GL, Zheng TS, Flavell RA, Clark EA. (2008) Caspase 6 regulates B cell activation and differentiation into plasma cells. *J Immunol.* 6810-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6810.
- Watson AJ. (2004) Apoptosis and colorectal cancer. *Gut.* 1701-9. doi: 10.1136/gut.2004.052704.
- Watson NF, Durrant LG, Scholefield JH, Madjd Z, Scrimgeour D, Spendlove I, Ellis IO, Patel PM. (2006) Cytoplasmic expression of p27(kip1) is associated with a favourable prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 6299-304. doi: 10.3748/wjg.v12.i39.6299
- Wilson CM, Gaber MW, Sabek OM, Zawaski JA, Merchant TE. (2009). Radiation-induced astrogliosis and blood-brain barrier damage can be abrogated using anti-TNF treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Jul 1;74(3):934-41. doi: 10.1016/j.ijrobp..
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., y Matwijczuk, A.. (2020). Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 404. doi:10.3390/nu12051401
- Wu QK, Koponen JM, Mykkänen HM, Törrönen AR. (2007) Berry phenolic extracts modulate the expression of p21(WAF1) and Bax but not Bcl-2 in HT-29 colon cancer cells. *J Agric Food Chem.* 1156-63. doi: 10.1021/jf062320t. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17243699.
- Yang PM, Tseng HH, Peng CW, Chen WS, Chiu SJ. (2012) Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-

associated apoptosis and inhibition of autophagy. *Int J Oncol.* 469-78. doi: 10.3892/ijo.2011.1203.

Yu YQ, Gamez-Belmonte R, Patankar JV, Liebing E, Becker C. (2022) The Role of Programmed Necrosis in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 4295. doi: 10.3390/cancers14174295

Zarzuelo, A. y Gálvez, J. (2010). Fibra dietética. En Á. Gil, *Tratado de nutrición: nutrición y enfermedad* (2da ed.). Madrid-España: Médica Panamericana.

Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A, Rusch K, Klosterhalfen S, Enck P.(2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr.* 66(1):53-60. doi: 10.1038/ejcn.2011.141.



## 7. ANEXOS



### 7.1 Formato de Consentimiento informado para donantes de saliva

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DONANTE SALIVA**

**Nombre del proyecto:** “Efecto del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis y ciclo celular en células SW480”

**Responsable del proyecto:** Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda adscrita en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Tel 442 192-1200.

El proyecto se realizará por el co-responsable: Ana Karen Rojas Flores, alumna de la Maestría en Ciencias en Neurometabolismo, de la Facultad de Medicina, correo electrónico: [karenf.nutri@gmail.com](mailto:karenf.nutri@gmail.com) y cel: 4426690791.

El estudio se realizará en el Centro de Investigación de Biomedicina Avanzada, de la Facultad de Medicina, Campus Aeropuerto, UAQ.

**Objetivo del proyecto:** Dado los beneficios observados de ciertas sustancias que contiene el garambullo sobre la prevención y protección en cáncer de colon, por ejemplo; se quiere obtener un extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) por medio de la simulación *in vitro* de los procesos de digestión y fermentación colónica.

**Descripción del proyecto:** Si usted desea participar en este estudio, se le pedirá asistir a las instalaciones de Campus Aeropuerto, en el Centro de Investigación de Biomedicina Avanzada. Iniciando a las 8:00 am con una duración de aproximadamente 30min. Se pedirá que mastiquen 1g de garambullo liofilizado 15 veces por 15 s echando el contenido en el vaso que contiene 5ml de agua destilada, y se les pedirá enjuagar su boca con 5ml de agua destilada echando su contenido al mismo vaso precipitado, repitiendo el mismo procedimiento 4 veces más.

**Confidencialidad:** Las muestras que se obtendrán no tendrán ninguna información de los sujetos participantes.

**Riesgos:** No existen riesgos al participar en este estudio.

**La participación a este estudio es completamente voluntaria.** Si reúne las condiciones adecuadas para participar en este estudio y no tendrá implicaciones desfavorables hacia su persona. Si usted decide participar se le pide reunir los siguientes requisitos:

1. No haber consumido alimento los últimos 90 minutos
2. No cepillarse los dientes durante ese tiempo
3. No mantener una dieta vegetariana
4. Estar libre de enfermedades gastrointestinales
5. No presentar caries
6. No haber consumido antibióticos durante los últimos 3 meses

**Aclaraciones:**

- Su participación en el estudio es completamente voluntaria
- Los procedimientos para realizar no implican ningún riesgo para su salud
- Los resultados obtenidos en esta investigación se utilizarán de manera confidencial, conforme a la normativa de esta institución.
- Se le aclararan todas las dudas que usted pueda presentar durante o después del procedimiento, sobre riesgos, beneficios y objetivos del mismo estudio.

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información de este estudio y acepto libremente la participación. Se que los datos obtenidos de mi serán utilizados de manera confidencial en esta investigación titulada: Efecto del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis y ciclo celular en células SW480.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del participante

Nombre y firma del investigador: \_\_\_\_\_

Testigo 1: \_\_\_\_\_

Testigo 2: \_\_\_\_\_



## 7.2 Formato de Consentimiento informado para donantes de saliva

### UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO FACULTAD DE MEDICINA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO DONANTE MATERIA FECAL

**Nombre del proyecto:** “Efecto del extracto de fermentación de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis y ciclo celular en células SW480”

**Responsable del proyecto:** Dra. en C. Haydé Azeneth Vergara Castañeda adscrita en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Tel 442 192-1200.

El proyecto se realizará por el co-responsable: Ana Karen Rojas Flores, alumna de la Maestría en Ciencias en Neurometabolismo, de la Facultad de Medicina, correo electrónico: [karenf.nutri@gmail.com](mailto:karenf.nutri@gmail.com) y cel: 4426690791.

El estudio se realizará en el Centro de Investigación de Biomedicina Avanzada, de la Facultad de Medicina, Campus Aeropuerto, UAQ.

**Objetivo del proyecto:** Parte del objetivo de este proyecto es realizar una fermentación colónica *in vitro* del modelo de simulación de digestión gastrointestinal. Por ello es necesario la participación de sujetos que puedan donarnos materia fecal que formarán parte de la digestión y así obtener bacterias fermentativas, de los cuales pedimos la participación de sujetos sanos.

**Descripción del proyecto:** Si usted desea participar en este estudio, se le pedirá asistir a las instalaciones de la Facultad de Química en el laboratorio de Bioquímica y Toxicología a las 8:00am, en el día planeado por el investigador a cargo. Se le pedirá hacer uso del sanitario y se le proporcionará un vaso estéril para su muestra fecal que tenga un peso de máximo 5g. Finalmente se le entregará la muestra al investigador para su uso.



**Confidencialidad:** Las muestras que se obtendrán no tendrán ninguna información de los sujetos participantes.

**Riesgos:** No existen riesgos al participar en este estudio.

**La participación a este estudio es completamente voluntaria.** Si reúne las condiciones adecuadas para participar en este estudio y no tendrá implicaciones desfavorables hacia su persona. Si usted decide participar se le pide reunir los siguientes requisitos:

1. No mantener una dieta vegetariana
2. Estar libre de enfermedades gastrointestinales
3. No haber consumido antibióticos durante los últimos 3 meses

**Aclaraciones:**

- Su participación en el estudio es completamente voluntaria
- Los procedimientos para realizar no implican ningún riesgo para su salud
- Los resultados obtenidos en esta investigación se utilizarán de manera confidencial, conforme a la normativa de esta institución.
- Se le aclararan todas las dudas que usted pueda presentar durante o después del procedimiento, sobre riesgos, beneficios y objetivos del mismo estudio.

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información de este estudio y acepto libremente la participación. Se que los datos obtenidos de mi serán utilizados de manera confidencial en esta investigación titulada: Efecto del extracto de fermentación de garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*) sobre la expresión de proteínas involucradas en apoptosis y ciclo celular en células SW480.

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Firma del participante

Nombre y firma del investigador: \_\_\_\_\_

Testigo 1: \_\_\_\_\_

Testigo 2: \_\_\_\_\_

### 7.3 Formato de manipulación y eliminación de forma segura los residuos RPBI

## **Manejo y eliminación de los residuos peligrosos biológicos-infecciosos (RPBI)**

#### **Objetivos:**

- Disminuir los riesgos exposición del personal involucrado con el manejo de RPBI.
- Facilitar el cumplimiento de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 en materia de salud y medio ambiente, en lo que respecta a RPBI.

#### **Conforme a las modificaciones de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que regula el manejo de RPBI incorpora los siguientes conceptos:**

“El ser humano y sus excretas, secreciones, etc. son los mismos en cualquier sitio donde éste los genere (hogar, centro de trabajo, hospitales, etc.)”. Esto significa que las excretas, orina, flujo menstrual, etc. de un paciente son idénticos estando en casa o en el hospital, y por lo tanto no hay porque darles un manejo diferente al que se le daría en casa (Volkow *et al.*, 2003).

#### **Manejo de cultivo celular:**

Para protección del personal, medio ambiente y del cultivo; las células serán manipuladas dentro de una campana de flujo laminar clase II con el uso adecuado de equipo de protección: bata, guantes, cubrebocas. Se mantendrá limpia el área de trabajo con uso correcto de alcohol y cloro.

El cultivo celular que termine siendo un residuo será inactivado con cloro y se depositará en bolsa roja para residuos biológicos.

#### **Manejo de saliva:**

Para protección del personal y de los voluntarios sanos, la recolección de saliva se realizará en recipiente hermético y se utilizará agua destilada para el enjuague de

la boca de los voluntarios. Para su utilización el personal utilizará el uso adecuado de equipo de protección: bata, guantes y cubrebocas.

La saliva resultante de los cuatro voluntarios se mezclará para su utilización, siendo esta usada en su totalidad para el estudio de interés del investigador. Por lo cual, no habrá residuo de eliminación en este caso.

**Manejo de materia fecal:**

Se entregará un recipiente hermético estéril a los voluntarios sanos para la toma de muestra fecal recién emitida, de la cual se pedirá un aproximado de 5g c/u. Posterior a ello, para su utilización se pesará un total de 6 g y se diluirá en 27 ml de solución fosfato de sodio con el uso adecuado de equipo de protección: bata, guantes y cubrebocas.

Para el manejo de la materia fecal sobrante en el recipiente hermético se llevará al sanitario para su eliminación. Posteriormente se tirará el recipiente vacío en bolsa amarilla para residuos biológicos.

**Disposición final de los residuos:**

El laboratorio cuenta con el servicio especializado de recolección, del cual es responsable el técnico encargado de este.