

# Quercetina y su fermentado en HT-29 sometidas a BPA

Nataly García-Gutiérrez<sup>1</sup>, Haydé Azeneth Vergara-Castañeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Correspondencia: [nat\\_gagu5487@hotmail.com](mailto:nat_gagu5487@hotmail.com), [hayde.vergara@uaq.mx](mailto:hayde.vergara@uaq.mx)

## Resumen

El bisfenol A (BPA) es un componente de los empaques destinados a la industria alimentaria. Es considerado un disruptor endócrino por promover la progresión de estadios de cáncer colónico debido al daño en el material genético. Por otro lado, la quercetina (Q) es un flavonoide anticancerígeno que regula vías de señalización proapoptóticas; por lo que su presencia podría mitigar el daño causado por el BPA al evitar la progresión del cáncer de colon. El objetivo fue evaluar el efecto de la quercetina y su extracto fermentado (FQ) sobre células transformadas de colon humano tratadas con BPA. La viabilidad celular (VC) se midió por MTT para determinar la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) bajo tratamiento con Q y FQ en células HT-29 y en coexposición con BPA. Los tratamientos usados fueron: Q, BPA (4.4µM, concentración tolerable permitida), Q+BPA, FQ y FQ+BPA. Se evaluó necrosis por LDH, ciclo celular por citometría de flujo y se evaluó la expresión de genes de la vía de señalización de p53 mediante RT qPCR. La IC<sub>50</sub> de Q y FQ fue de 160.63µM y 15.98 %, respectivamente. Estas concentraciones reducen la VC también en células expuestas a BPA. Q y Q+BPA indujeron arresto del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y FQ y FQ+BPA en la fase S. BPA redujo la VC en un 10 % por necrosis. Q, Q+BPA, FQ, FQ+BPA regularon positivamente genes involucrados con apoptosis e inhibición del ciclo celular y negativamente genes antiapoptóticos. El efecto anticancerígeno de quercetina se sostiene incluso en presencia del disruptor BPA en células HT-29.

**Palabras clave:** *Bisfenol a, cáncer de colon, disruptor endócrino, fitoquímico.*

## Abstract

Bisphenol A (BPA) is a component of packaging destined for the food industry. It is considered an endocrine disruptor for promoting the progression of stages of colon cancer due to damaged genetic material. On the other hand, quercetin (Q) is an anticancer flavonoid that regulates pro-apoptotic signaling pathways; so its presence could mitigate the damage caused by BPA, preventing the progression of colon cancer. The objective was to evaluate the effect of quercetin and its fermented extract (FQ) on transformed human colon cells treated with BPA. Cell viability (CV) was measured by MTT to determine the mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) under treatment with Q and FQ in HT-29 cells and in co-exposure with BPA. Treatments: Q, BPA (4.4µM, tolerable concentration allowed), Q + BPA, FQ and FQ + BPA. Necrosis by LDH, cell cycle was evaluated by flow cytometry and the expression of genes of the p53 signaling pathway was evaluated by RT qPCR. The IC<sub>50</sub> for Q and FQ was 160.63µM and 15.98 %, respectively. These concentrations reduce CV also in cells exposed to BPA. Q and Q + BPA induced cell cycle arrest in the G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> phase and FQ and FQ + BPA in the S phase. BPA reduced VC by 10 % due to necrosis. Q, Q + BPA, FQ, FQ + BPA positively regulated genes involved with apoptosis and cell cycle inhibition and negatively antiapoptotic genes. The anticancer effect of quercetin is sustained even in the presence of the BPA disruptor in HT-29 cells.

**Keywords:** *Bisphenol a, colon cancer, endocrine disruptor, phytochemical.*

## Introducción

El término disruptor endócrino se aplica a un grupo de moléculas exógenas que interfieren en la síntesis de las hormonas, su metabolismo y función, tanto en humanos como en animales (Monneret, 2017). Los hay de origen sintético y natural. A este último se le denomina fitoestrógeno y está representado por los flavonoides. Éstos son compuestos no esteroideos cuya producción es el resultado del metabolismo secundario de las plantas que forman parte de la dieta del ser humano. Los flavonoides se sintetizan en las plantas mediante la vía metabólica acetato-malonato o fenilpropanoide, de la cual su estructura general resultante es C6-C3-C6 con función fenilbenzopirano (Dias et al., 2021). Los alimentos en los que podemos encontrar a los flavonoides son en frutas y verduras, el té, la cocoa, el vino, entre otros (Nikolić et al., 2017).

La función de los fitoestrógenos dentro de las plantas no es hormonal, sino que actúan como defensa frente al estrés, radiación UV y a microorganismos debido a su actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antioxidante (Petroski & Minich, 2020). El ingreso de los fitoestrógenos es mediante la dieta consumida por el humano y es en el cuerpo donde van a ejercer los metabolitos su efecto biológico estrogénico. Cuando los alimentos son consumidos por las personas, los fitoestrógenos son incorporados tanto en su forma agliconada o glucosilada. La absorción de los flavonoides por el intestino delgado varía de un 0 a 60 %, dependiendo de la estructura del flavonoide en cuestión, de su unión con azúcares y del consumo total de flavonoides en la dieta, el cual varía considerablemente entre países (Cassidy & Minihane, 2017). Tras la absorción del compuesto, éste experimenta metabolización por las enzimas de fase I y II presentes principalmente en hígado. Posteriormente, su estructura modificada es fácilmente eliminada por la orina con una vida media de dos a ocho horas. Sin embargo, los fitoestrógenos no metabolizados pueden alcanzar diferentes tejidos, donde son capaces de desencadenar respuestas biológicas, incluyendo aquellas en las que participan las hormonas.

Por otro lado, también se han sintetizado industrialmente disruptores como el bisfenol a (BPA), el cual se obtiene a partir de la condensación de dos moléculas de fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico. El BPA se ha convertido en un componente clave en la fabricación de muchos materiales incluyendo botellas de plástico reusables, biberones, bebidas enlatadas (Basak et al., 2020). Sin embargo, debido a que el BPA es capaz de desprenderse de los materiales bajo condiciones de temperatura y pH, puede migrar a los alimentos. Como consecuencia, los consumidores incorporan este químico a su cuerpo encontrándose presente en la piel, saliva y sangre (Jalal et al., 2017).

Desde hace varios años se ha investigado el efecto de los disruptores estrogénicos en diversos modelos biológicos en un contexto fisiológico y patológico. A pesar de que el tejido colónico no ha sido estudiado a fondo en relación con los xenoestrógenos, estudios demuestran que los disruptores endócrinos exógenos podrían activar o inhibir señales intracelulares esenciales para la protección contra enfermedades como el cáncer de colon o bien promover su aparición. En la mucosa del tejido colónico sano el receptor estrogénico alfa ( $ER\alpha$ ) se expresa mínimamente a diferencia del receptor estrogénico beta ( $ER\beta$ ) (Honma et al., 2022). Durante el desarrollo del cáncer de colon, la expresión de los subtipos 1 y 2 del  $ER\beta$  se ha observado disminuido, lo que lo ha señalado como un buen candidato para ser utilizado como blanco de diversas terapias contra el cáncer. La actividad estrogénica de los fitoestrógenos se debe a la similitud estructural con el 17- $\beta$ -estradiol y su afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , respectivamente). Esta afinidad con actividad agonista o antagonista, dependiente de la estructura y de la concentración del compuesto, ha sido observada débilmente en comparación al estradiol. Además, se ha determinado que algunos compuestos muestran una afinidad selectiva entre el  $ER\alpha$  y el  $ER\beta$  (Rietjens et al., 2017). Los fitoestrógenos son capaces de interactuar con los  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  imitando la acción del estradiol e induciendo la muerte celular apoptótica. Tal es el caso de la quercetina, la cual es capaz de

inducir la muerte por apoptosis en células de cáncer de colon CT-26, por modulación positiva de proteínas p63 y p73 y la vía PI3K/Akt/mTOR. Además, se ha observado en estudios *in vivo* que este fitoquímico es capaz de reducir el volumen tumoral colónico en comparación al grupo control (Hashemzaei et al., 2017).

En cuanto al BPA y su asociación con el cáncer de colon, los reportes indican que este agente en células de epitelio de colon normal NC460 a concentraciones micromolares promueve la migración de células por la estimulación de la expresión y actividad de MMP-9 mediada por RE $\beta$ , sugiriendo posibles riesgos de desarrollo de cáncer (Shi et al., 2016). En células de cáncer de colon HT-29 se encontró que el BPA promovió significativamente la proliferación y migración celular, a través del aumento de la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares ERK. Asimismo, el BPA redujo la expresión de E-cadherina, un factor involucrado en la transición epitelial a mesenquimatoso (Jun et al., 2021). Mientras que en células SW480 este químico logró modular 56 proteínas involucradas en la proliferación celular y el estrés oxidativo, se observó un aumento en la migración celular e invasión, lo que ocasionó la transformación de las transiciones epiteliales a mesenquimales y el aumento de la expresión del factor de transcripción Snail, un marcador de progresión tumoral (Chen et al., 2015). A pesar de la importancia que pudiera tener el BPA en el colon, la información acerca de esta alteración no es suficiente y, por lo tanto, su mecanismo de acción hasta el momento no es totalmente claro. En vista de su uso vigente, se han buscado moléculas principalmente de origen vegetal como los polifenoles que ayuden a reducir su efecto tóxico. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la quercetina y su extracto fermentado en células de cáncer de colon expuestas a BPA.

## Metodología

### Fermentación gastrointestinal *in vitro*

Esta técnica utilizada de acuerdo con lo descrito por Campos-Vega y colaboradores (2009), es un método de fermentación de la microbiota intestinal humana

para estimar los efectos de la digestión de la quercetina en el colon que representa un modelo de intestino grueso simulado. Se utilizó como fuente bacteriana un inóculo fecal humano obtenido de voluntarios sanos normo peso, sin antecedentes de enfermedades gastrointestinales sin haber consumido antibióticos tres meses previos a la toma de la muestra. Brevemente, las fermentaciones se realizaron por duplicado en un baño de agua a 37° C. Se utilizó rafinosa como control para el azúcar fermentable en las mismas condiciones. Se llenaron tubos estériles con 9 ml de medio de cultivo basal estéril. Se prepararon suspensiones fecales homogeneizando 2 g de heces frescas con 18 ml de tampón fosfato de sodio 0.1 M, pH 7. Los tubos que contenían la mezcla de medio de cultivo basal se inocularon con 1 ml de suspensiones fecales, y 1 gramo de quercetina previamente sometida a digestión gastrointestinal, excepto a los blancos. Las muestras se agitaron con vórtex durante 30 segundos y se colocaron en un baño de agua a 37 °C. Al final de cada tiempo de fermentación, se evaluó el pH de la muestra (6, 12 y 24 h). La fermentación se detuvo colocando los tubos en un congelador a -70 °C.

### Viabilidad celular y determinación de la IC<sub>50</sub>

La viabilidad de la línea celular de cáncer de colon HT-29, obtenida de la ATCC, fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Se sembraron  $5 \times 10^3$  células por pozo en microplaca estéril de 96 pozos en medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %. A las 24h de incubación el medio fue sustituido por diferentes concentraciones de quercetina (40-180 $\mu$ M) disueltos en medio con FBS al 2 %, también se incluyó control negativo de células sin tratamiento. Se colocó nuevamente a incubación por 48h. Después de la incubación, se retiró el medio y se adicionaron 200 $\mu$ l de solución MTT a cada pozo, incubándose nuevamente por 1 h a 37° C. Pasado el tiempo, se removió el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu$ l de DMSO a cada pocillo, los cuales se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la lectura a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro de ELIZA (Thermo scientific®, multiscan GO). El cálculo del porcentaje de viabilidad se obtuvo con la siguiente ecuación.

%viabilidad celular:  $(DO_t/DO_c)*100$ .  $DO_t$ : Densidad óptica promedio de los cultivos tratados.  $DO_c$ : Densidad óptica promedio del control negativo.

El porcentaje de viabilidad celular se graficó contra la concentración del tratamiento para encontrar la dosis inhibitoria media ( $IC_{50}$ ). La concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) se refirió a la concentración necesaria del tratamiento para inhibir la sobrevivencia del 50 % de la población celular sometida al tratamiento.

### Tratamientos

La variabilidad celular, así como las siguientes determinaciones se realizaron bajo los siguientes tratamientos disueltos en medio con FBS al 2 %: Quercetina a la  $IC_{50}$ , extracto fermentado de quercetina a la  $IC_{50}$ , bisfenol a ( $4.4\mu M$ , concentración recomendada por la FDA), mezcla de quercetina o su extracto fermentado con bisfenol a; además se incluyó blanco de fermentación que corresponde a agua sometida bajo el mismo procedimiento que las muestras, control negativo (células sin tratamiento), control positivo (triton al 1 %).

### Necrosis celular

La citotoxicidad de las células se evaluó mediante las indicaciones descritas en el kit de LDH (ROCHE®, 11644793001). Las células se sembraron en microplaca estéril de 96 pozos ( $5 \times 10^3$  células/pozo) en medio de cultivo adicionado con FBS al 10 %. 24 horas después, el medio se sustituyó por los tratamientos previamente mencionados, donde se incluyó un control positivo de tritón X-100 al 1 %. Después de 48 h de incubación se mezcló 50  $\mu l$  de cada tratamiento con 100  $\mu l$  del reactivo de LDH y se dejó por 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. El cálculo de la actividad de lactato deshidrogenasa se obtuvo mediante la siguiente ecuación.

%Citotoxicidad:  $(DO_t-DO_c)/(DO_p-DO_c)$ .  $DO_t$ : Densidad óptica promedio de los cultivos tratados.  $DO_c$ : Densidad óptica promedio del control negativo.  $DO_p$ : Densidad óptica promedio del control positivo.

### Cuantificación del DNA en las fases del ciclo celular por citometría de flujo

El contenido de DNA en las fases del ciclo celular se cuantificó siguiendo la metodología del kit Muse Cell Cycle Assay (Merck millipore®, MCH100101). Brevemente, las células se sembraron en placa de 6 pozos ( $1 \times 10^6$  células/pozo) en medio de cultivo adicionado con FBS al 10 %. A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por los tratamientos. Después de 48 h de incubación, la placa se lavó con 1 ml de PBS 1X. Las células adheridas a la caja se cosecharon con tripsina. Las células tripsinizadas se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos a  $30^\circ C$ . El sobrenadante se removió y la pastilla se lava dos veces con 2 ml de PBS 1X. Se centrifugó nuevamente a fin de remover el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de etanol frío al 70 %. Se incubó por 3h a  $-20^\circ C$ . Pasado el tiempo, se centrifugó a 1800 rpm durante 5min a  $-4^\circ C$ . La pastilla se lavó una vez con 2 ml de PBS 1X. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 20  $\mu l$  del reactivo incubándose por 30 minutos. La lectura en el citómetro de flujo fue de  $1 \times 10^5$  células (Muse Cell Analyzer). Los resultados se expresaron en porcentaje de DNA/100 de células en las cuatro fases del ciclo celular (G0, G1, S, G2).

### Evaluación de la expresión de genes de la vía de p53 mediante RT qPCR

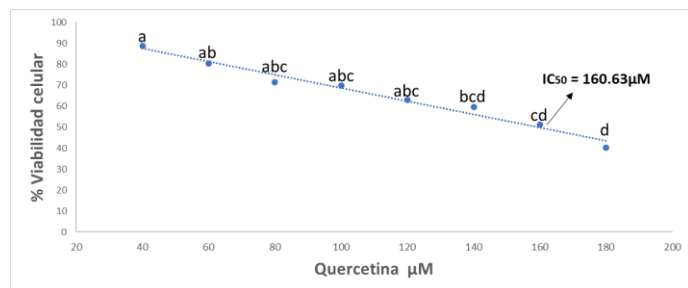
Se determinó la expresión de genes por medio del arreglo Human p53 Signaling Pathway (330231 PAHS-027ZA) mediante el uso de las condiciones mencionadas en el inserto. Pero primero se extrajo el RNA total de las células bajo tratamiento empleando membranas de silica-gel de la marca Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany, PP-210S) y, posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA, mediante el kit Script cDNA de la marca Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany, PCR-511S). Los resultados fueron analizados en [geneglobe.qiagen.com](http://geneglobe.qiagen.com). Los resultados son considerados como secuencias potencialmente moduladas si el cambio entre las muestras provenientes de las células sometidas a tratamiento y las no tratadas fue mayor de dos veces (inducción o inhibición).

### Análisis estadístico

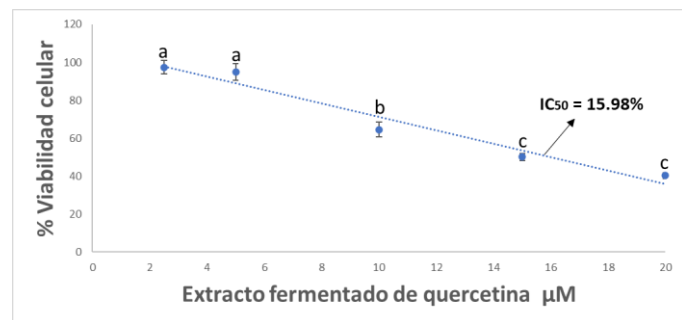
Los datos se analizaron con el software JMP. Se realizó un análisis estadístico siguiendo ANOVA y Tukey-Kramer cuando se identificaron diferencias significativas entre los grupos o Dunnett, cuando se compararon contra el control negativo o BPA.

### Resultados

Los resultados de viabilidad de la línea celular de cáncer de colon humano HT-29 sometidas a quercetina y su extracto fermentado se muestran en las figuras 1 y 2. El ensayo de MTT reveló que el porcentaje de viabilidad celular disminuyó al incrementar la concentración de quercetina y su extracto fermentado. La IC<sub>50</sub> de las células bajo tratamiento con quercetina y su extracto fermentado fue de 160.63  $\mu$ M y 15.98 %, respectivamente.

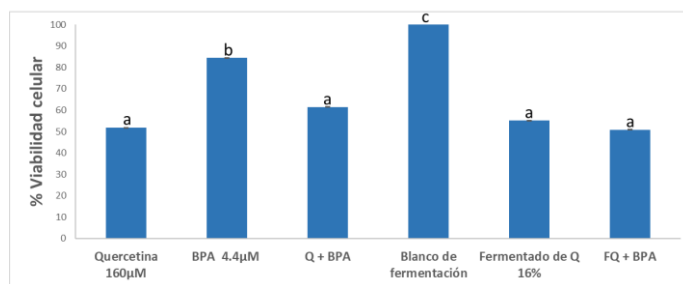


**Figura 1.** Curva dosis-respuesta de la quercetina en células de cáncer de colon humano HT-29, después de 48 h de tratamiento. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  ES. Letras diferentes expresan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), prueba de Tukey. Las células tratadas se normalizaron con el control negativo (células no tratadas). La concentración inhibitoria media o IC<sub>50</sub> se refiere a la concentración necesaria del tratamiento para inhibir la sobrevivencia del 50 % de la población celular sometida al tratamiento. Fuente: elaboración propia.



**Figura 2.** Curva dosis-respuesta del extracto de fermentación de quercetina en células de cáncer de colon humano HT-29, después de 48 h de tratamiento. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  ES. Letras diferentes expresan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), prueba de Tukey. Las células tratadas se normalizaron con el control negativo (células no tratadas). La concentración inhibitoria media o IC<sub>50</sub> se refiere a la concentración necesaria del tratamiento para inhibir la sobrevivencia del 50 % de la población celular sometida al tratamiento. Fuente: elaboración propia.

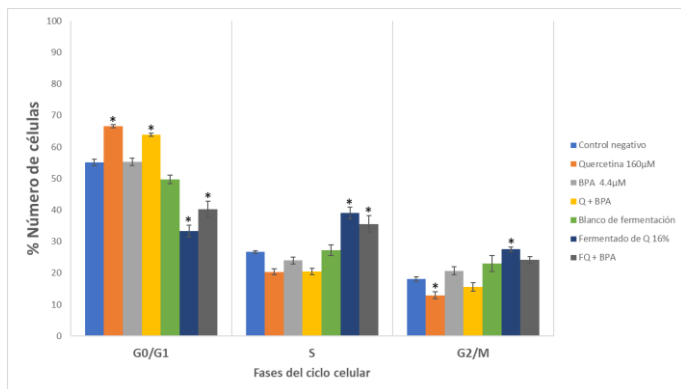
La coexposición de quercetina o su extracto fermentado con BPA que se muestra en la Figura 3, dio como resultado un porcentaje de viabilidad de entre 50 a 60 %. Los resultados indican que el efecto anticancerígeno de la quercetina predomina sobre los efectos moleculares inducidos por BPA, debido a que el BPA por sí solo no redujo de manera importante la viabilidad.



**Figura 3.** Efecto de la coexposición de quercetina o su extracto fermentado en células de cáncer de colon HT-29, tratadas con bisfenol A. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  ES, de las células tratadas con quercetina o su extracto fermentado después de 48 horas. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), prueba de Tukey. El blanco corresponde a agua sometida bajo el mismo procedimiento que las muestras. Las células tratadas se normalizaron con el control negativo (células no tratadas). Fuente: elaboración propia.

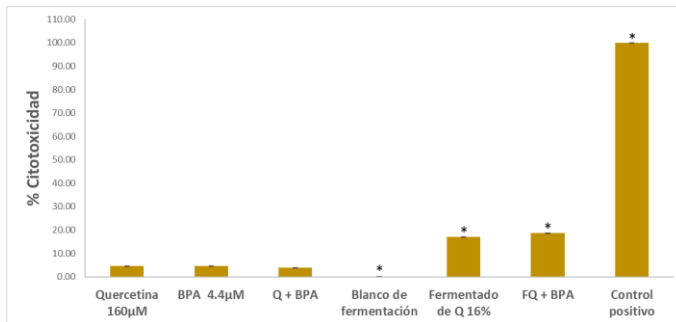
El contenido de ADN de las células tratadas con quercetina sola y en combinación con el BPA se muestra aumentado significativamente en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Figura 4) en comparación a los demás grupos. Mientras que las células sometidas a tratamiento con el extracto fermentado de la quercetina se observan acumuladas en la fase S. Por otro lado, debido a que el tratamiento con BPA no muestra ninguna diferencia significativa en comparación al control negativo, se sugiere que la quercetina y su extracto fermentado

promueven la acumulación de las células con ADN fragmentado (fase G0/G1 o S). Este ensayo demuestra que la quercetina y su extracto fermentado causan arresto al ciclo celular individualmente y en coexposición con el BPA.



**Figura 4.** Número de células en las fases de ciclo en células HT-29 tratadas con quercetina y su extracto fermentado en coexposición con el bisfenol A. Cada valor representa tres experimentos independientes por duplicado  $\pm$  ES, expresados como porcentaje de DNA/ 500 000 células. El blanco corresponde a agua sometida bajo el mismo procedimiento que las muestras. Los signos expresan diferencia significativa comparándolos tratamientos contra el grupo BPA ( $P < 0.05$ ), prueba de Dunnett. G<sub>0</sub>: fase de reposo, G<sub>1</sub>: 1ra fase de crecimiento, S: fase de síntesis de DNA, G<sub>2</sub>: 2da. fase de crecimiento, M: fase de mitosis. Fuente: elaboración propia.

De los tipos de muerte celular que se conocen, la necrosis es un mecanismo de muerte por el cual la célula se lisa vertiendo su contenido al espacio extracelular en respuesta de un daño intenso o prolongado. El efecto inductor de necrosis de los tratamientos con quercetina y BPA se observó de aproximadamente el 20 % (Figura 5). Por su parte, las células bajo tratamiento con el extracto fermentado de quercetina y su coexposición con BPA mueren por necrosis en aproximadamente un 20 %. Este resultado podría estar contribuyendo a la disminución en la viabilidad celular total de dicha línea celular junto con la inducción de otros tipos de muerte. El porcentaje de citotoxicidad en el control positivo se vio aumentado debido al daño letal que muestra el tritón al 1 % sobre las células HT-29. En cuanto al resultado con BPA, el porcentaje de muerte por necrosis corresponde al valor de inhibición de viabilidad de la Figura 3, por lo cual el porcentaje de muerte celular podría atribuirse a la muerte por citotoxicidad.



**Figura 5.** Efecto citotóxico de la quercetina y su fermentado en células de cáncer de colon HT-29, tratadas con bisfenol A. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado  $\pm$  ES. Los signos expresan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) comparándolos tratamientos con el grupo BPA, prueba de Dunnett. El blanco corresponde a agua sometida bajo el mismo procedimiento que las muestras. Las células tratadas se normalizaron con el control negativo (células no tratadas). Fuente: elaboración propia.

La regulación de la expresión de genes de la vía de señalización de p53 se muestra en la Tabla 1. El tratamiento con quercetina moduló negativamente los genes BIRC5 y MCL1 que realizan procesos antiapoptóticos, los genes CDC25A, CDK1 y CDKN2A, involucrados en la regulación del ciclo celular. Mientras que moduló positivamente el gen proapoptótico KAS y MYC que es un gen inhibidor del ciclo celular. Por su parte, el tratamiento con BPA moduló negativamente los genes BRCA1 y GADD45A, inhibidores del ciclo celular. La coexposición de quercetina y BPA, así como su extracto fermentado regularon positivamente los genes KRAS; mientras que este último tratamiento reguló positivamente al gen TNF promotor de la apoptosis. Finalmente, el extracto fermentado de la quercetina en coexposición con el BPA moduló negativamente a E2F3, un gen con funciones de inhibición del ciclo celular, así como también reguló positivamente a los genes FASL, TP53AIP1 y TP63 con funciones proapoptóticas, GML y MYOD1 inhibidores del ciclo celular, WT1 supresor de tumores, KRAS, TNF.

Quercetina 160µM	BPA 4.41µM	Q + BPA	Fermentado de Q 16%	FQ + BPA
BIRC5 -6.40	BRCA1 -2.67	KRAS 88.50	KRAS 70.48	E2F3 -2.15
CDC25A -2.06	GADD45A -14.67		TNF 7.80	FASLG 5.00
CDK1 -6.22				GML 5.00
CDKN2A -9.67				KRAS 75.71
MCL1 -2.11				MYOD1 5.00
KRAS 40.23				TNF 5.00
MYC 2.06				TP53AIP1 5.00
				TP63 5.00
				WT1 5.00

**Tabla 1.** Expresión de genes de células HT-29 bajo tratamiento, regulación negativa o positiva >2 *fold* con respecto a las células control negativo empleando  $\beta$ -Actina, GAPDH,  $\beta$ -2-microglobulina como housekeeping. Fuente: elaboración propia.

## Discusión y conclusiones

La disminución de la viabilidad celular dependiente del aumento de la concentración del tratamiento con quercetina podría ser debido en parte a su capacidad antioxidante al ser capaz de donar protones y electrones y disminuir el estrés oxidativo propio de células cancerosas (Figura 1). Además, se ha observado que este fitoquímico modula genes que promueven la muerte celular apoptótica (Khorsandi et al., 2017). La IC<sub>50</sub> determinada en este estudio es similar a lo reportado por Yang y sus colaboradores (2016).

Por otra parte, el efecto inhibitorio celular del extracto de la fermentación de la quercetina podría deberse a la presencia tanto de quercetina pura como de sus metabolitos producidos por reacciones entre las bacterias colónicas y la quercetina (Figura 2). Los metabolitos resultantes dependen del flavonoide estudiado, en el caso de la quercetina se ha observado que uno de los metabolitos producidos principalmente por la microbiota colónica es el DOPAC (Shabbir et al., 2021), el cual se ha visto tener efecto en células de cáncer de colon.

Hasta el momento no hay evidencia de la coexposición de la quercetina o su extracto fermentado con BPA en tejido colónico. Un grupo de investigadores observaron que en células de cáncer de ovario el porcentaje de viabilidad tras la coexposición del BPA con el flavonoide genisteína disminuyó drásticamente, debido al efecto antiproliferativo de la genisteína.

Parte del mecanismo que podría estar implicado en la disminución de la viabilidad celular por parte de la quercetina es el arresto al ciclo celular (Jaiswal et al., 2018). Comparando los resultados obtenidos, en un estudio realizado por Yang y colaboradores (2016), encontraron que la quercetina a concentración entre 100 y 200 µM durante 48 h de incubación en células HT-29 aumentó el contenido de ADN en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular en comparación al control negativo. Así, la quercetina en esas concentraciones muestra un efecto inhibitorio de la proliferación en células HT-29 mediante la detención en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Figura 3). Asimismo, en ese mismo estudio determinaron que bajo esa misma concentración, la quercetina promueve la muerte celular por apoptosis, proceso que aún debe confirmarse.

En cuanto al extracto fermentado de la quercetina y su coexposición con el BPA sobre las células cancerosas no hay evidencia hasta el momento que sustenten los posibles mecanismos de acción que conlleven al arresto del ciclo celular en la fase S. Por otro lado, la muerte celular por necrosis de las células sometidas a los tratamientos con quercetina y su coexposición con el BPA se ha visto dependiente de la concentración y del tiempo de exposición (Figura 4). En una investigación utilizando una concentración de 100 µM de quercetina en células de cáncer ovárico, se observa un porcentaje de muerte similar por citotoxicidad (Shafabakhsh & Asemi, 2019). Finalmente, los procesos anteriormente estudiados podrían ser el resultado de la modulación de genes que promuevan el arresto al ciclo celular y apoptosis por tratamiento con quercetina y su extracto fermentado y su coexposición con BPA. O, por otra parte, observarse progresión del ciclo celular y mecanismos antiapoptóticos bajo tratamiento con BPA.

Estudios han demostrado que la quercetina es un inhibidor de varias proteínas cinasas importantes para la progresión del ciclo celular, debido a la presencia de grupos hidroxilo que hay en su molécula. Aunado a esto también se ha observado que éste flavonoide regula la actividad de genes y proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 y proapoptóticas como Bax (Shafabakhsh & Asemi, 2019). En un estudio realizado por Özsoy y colaboradores (2020) encontraron que el uso de la quercetina provoca disminución de la viabilidad celular mediante la muerte apoptótica de células con estadios temprano y avanzado de la carcinogénesis, Colo-320 y Colo-421, respectivamente.

En la presente investigación, la quercetina podría estar disminuyendo la viabilidad celular observada en este estudio, por medio de la regulación a la baja de MYC y KRAS, los cuales se muestran alterados en la línea celular HT29 y, por tanto, le confieren a la célula mayor capacidad proliferativa. Esta expresión negativa de KRAS inclusive se mantuvo con el tratamiento de Quercetina y BPA. Por otro lado, el BPA tuvo el efecto contrario a la quercetina, debido a que promovió el aumento de la expresión de BRCA1, el cual es un gen supresor de tumores que tras su alteración podría acelerar la proliferación celular. Sin embargo, el BPA a la concentración de 4.4µM no promovió el aumento de la viabilidad celular en este estudio por lo que es necesario realizar ensayos de proliferación celular. En cuanto al extracto fermentado de la quercetina y su coexposición con BPA, éstos regularon el gen KRAS y TNF posiblemente por la presencia tanto de la quercetina como de sus metabolitos aún no evaluados. Al no observarse en la quercetina pura la regulación de los genes que inhiben el ciclo celular como GML y MYOD1 o que promuevan la apoptosis como FASLG, TP53AIP1, TP63, se sugiere que posiblemente los metabolitos de la quercetina y ésta misma, dentro del extracto, podrían estar actuando sinérgica o antagónicamente para activar vías de señalización que promuevan tanto el arresto al ciclo celular observado en este estudio, así como apoptosis que será evaluada posteriormente.

Se concluye que el efecto anticancerígeno de quercetina y extracto fermentado, medido por los procesos viabilidad celular, necrosis, arresto al ciclo celular, se sostiene incluso en presencia del BPA en células HT-29. Además, la quercetina y su extracto fermentado podría estar modulando diferentes genes involucrados en vías de señalización que desencadenen procesos como el arresto al ciclo celular y posterior muerte en su mayoría apoptótica. Estos resultados permiten continuar con estudios moleculares para así poder esclarecer los mecanismos protectores de este fitoquímico y su extracto fermentado en células de cáncer de colon sometidas a BPA.

## Referencias

- Basak, S., Das, M. K., & Duttaroy, A. K. (2020). *Plastics derived endocrine-disrupting compounds and their effects on early development. Birth Defects Research.* 112(17): pp. 1308-1325. DOI:10.1002/bdr2.1741.
- Cassidy, A., Minihane, & A.M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr.* 105(1): pp. 10-22. DOI: 10.3945/ajcn.116.136051.
- Chen, Z.-J., Yang, X.-L., Liu, H., Wei, W., Zhang, K.-S., Huang, H.-B., Giesy, J. P., Liu, H.-L., Du, J., & Wang, H.-S. (2015). Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions. *Archives of Toxicology.* 89(8): pp. 1371-1381. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1301-z>.
- Días, M.C., Pinto, D.C.G.A., Silva, & A.M.S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules.* 26(17): pp. 5377. DOI: 10.3390/molecules26175377.
- Jaiswal, N., Akhtar, J., Singh, S., & Ahsan, F. (2018). *An Overview on Genistein and its Various Formulations. Drug Res.* 69(6): pp. 305-313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
- Hashemzaei, M., Delarami, Far A., Yari, A., Heravi, R.E., Tabrizian, K., Taghdisi, S.M., Sadegh, S.E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N.Y., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M., Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 38(2): pp. 819-828. DOI: 10.3892/or.2017.5766.



- Honma, N., Arai, T., Matsuda, Y., Fukunaga, Y., Akishima-Fukasawa, Y., Yamamoto, N., Kawachi, H., Ishikawa, Y., Takeuchi, K., & Mikami, T. (2022). Estrogen concentration and estrogen receptor- $\beta$  expression in postmenopausal colon cancer considering patient/tumor background. *J Cancer Res Clin Oncol.* 148(5): pp. 1063-1071. doi: 10.1007/s00432-021-03889-9.
- Jalal, N., Surendranath, A.R., Pathak, J.L., Yu, S., & Chung, C.Y. (2017). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol Rep.* 16(5): pp. 76-84. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.12.013.
- Jun, J.H., Oh, J.E., Shim, J.K., Kwak, Y.L., & Cho, J.S. (2021). Effects of bisphenol A on the proliferation, migration, and tumor growth of colon cancer cells: In vitro and in vivo evaluation with mechanistic insights related to ERK and 5-HT3. *Food Chem Toxicol.* 158: pp. 112662. doi: 10.1016/j.fct.2021.112662.
- Khorsandi, L., Orazizadeh, M., Niazvand, F., Abbaspour, M.R., Mansouri, E., & Khodadadi, A. (2017). Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratisl Lek Listy.* 118(2): pp. 123-128. doi: 10.4149/BLL\_2017\_025.
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *C R Biol.* 340(9-10): pp. 403-405. doi: 10.1016/j.crv.2017.07.004.
- Nikolić, I., Savić-Gajić, I., Tačić, A., & Savić, I. (2017). Classification and biological activity of phytoestrogens: A review. *Advanced Technologies.* 6(2): pp. 96-106. doi: https://doi.org/10.5937/savteh1702096N
- Petroski, W., & Minich, D.M. (2020). Is There Such a Thing as "Anti-Nutrients"? A Narrative Review of Perceived Problematic Plant Compounds. *Nutrients.* 12(10): pp. 2929. doi: 10.3390/nu12102929.
- Rietjens, I.M.C.M., Louisse, J., & Beekmann, K. (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br J Pharmacol.* 174(11): pp. 1263-1280. doi: 10.1111/bph.13622.
- Shabbir, U., Rubab, M., Daliri, E.B., Chelliah, R., & Javed, A., Oh, D.H. (2021). Curcumin, Quercetin, Catechins and Metabolic Diseases: *The Role of Gut Microbiota.* *Nutrients.* 13(1): pp. 206. doi: 10.3390/nu13010206.
- Shafabakhsh, R., & Asemi, Z. (2019). Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *J Ovarian Res.* 12(1): pp. 55. doi: 10.1186/s13048-019-0530-4.
- Shi, T., Zhao, C., Li, Z., Zhang, Q., & Jin, X. (2016). Bisphenol a exposure promotes the migration of NCM460 cells via estrogen receptor-mediated integrin  $\beta$ 1/MMP-9 pathway. *Environmental Toxicology.* 31(7): pp. 799-807. doi: https://doi.org/10.1002/tox.22090
- Özsoy, S., Becer, E., Kabadayı, H., Vatanserver, H.S., & Yücecan, S. (2020). Quercetin-Mediated Apoptosis and Cellular Senescence in Human Colon Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 20(11): pp. 1387-1396. doi: 10.2174/1871520620666200408082026.
- Yang, L., Liu, Y., Wang, M., Qian, Y., Dong, X., Gu, H., Wang, H., Guo, S., & Hisamitsu, T. (2016). Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis. *Molecular Medicine Reports.* 14(5): pp. 4559-4566. doi: https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5818