



NARINGENINA INHIBE PROLIFERACIÓN A TRAVÉS DE APOPTOSIS DEPENDIENTE DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE RE EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON SW480 EXPUESTAS A BPA.

NARINGENIN INHIBITS PROLIFERATION THROUGH TRANSCRIPTIONAL RE EXPRESSION DEPENDENT APOPTOSIS IN SW480 COLON CANCER CELLS EXPOSED TO BPA.

Lozano-Herrera SJ¹, Sánchez-Tusié AA¹, Hernández-Puga AG¹, Vergara-Castañeda HA^{1*}.

¹Departamento de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro 76176, México.

* Autor de correspondencia: hayde.vergara@uaq.mx.

Resumen

La naringenina (NAR) es un flavonoide que activa diversos mecanismos que inhiben el desarrollo del cáncer de colon, siendo uno de ellos su afinidad a diversos receptores estrógenicos (REs). Por su parte el bisfenol A (BPA), es un xenoestrógeno que promueve mecanismos de proliferación a través de su unión con RE del tipo α (RE α). El cáncer de colon se caracteriza por una disminución de RE del tipo β (RE β) y también los receptores de membrana sensibles a estrógenos, como GPR30, juegan un papel importante. Por su parte, la sobreexpresión del gen DNMT1 se ha relacionado con un pronóstico desfavorable en cáncer de colon. El objetivo del presente estudio fue evaluar los mecanismos involucrados en el efecto de NAR y BPA sobre la proliferación de células de cáncer de colon humano. Los resultados muestran que NAR promueve muerte celular por apoptosis y necrosis, y BPA lo hace a través de necrosis. Se midió el efecto de BPA y NAR sobre la expresión transcripcional de REs, GPR30 y DNMT1 mediante qPCR. BPA disminuye la expresión de RE β , mientras que NAR aumenta la expresión de RE α , RE β y la de GPR30 en coexposición con BPA. La conclusión del presente estudio es que BPA promueve mecanismos proliferativos a través de la disminución en expresión transcripcional de RE β y NAR reduce proliferación celular a través de mecanismos dependientes de la expresión de RE β y GPR30.

Palabras clave: BPA, naringenina, cáncer de colon, receptores de estrógeno, GPR30, DNMT1.

Abstract

Naringenin (NAR) is a flavonoid that activates various mechanisms to inhibit the development of colon cancer, one of them is its affinity to various estrogen receptors (ERs). Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen that promotes proliferation mechanisms, binding ER type α (ER α). Colon cancer is characterized by a decrease in ER type β (ER β) and estrogen-sensitive membrane receptors, such as GPR30, which also play an important role. On the other hand, overexpression of the DNMT1 gene have been related to unfavorable prognosis in colon cancer. The objective of the present study was to evaluate the mechanisms involved in the effect of NAR and BPA on the proliferation of human colon cancer cells. The results show that NAR promotes cell death by apoptosis and necrosis, and BPA by necrosis. The effect of BPA and NAR on the transcriptional expression of REs, GPR30 and DNMT1 was measured by qPCR. BPA decreases the expression of RE β , while NAR increases the expression of RE α , RE β and GPR30 in co-exposure with BPA. The present study concludes that BPA promotes proliferative mechanisms through transcriptional expression decrease of RE β , and NAR reduces cell proliferation through mechanisms dependent on RE β and GPR30 expression.

Key words: BPA, naringenin, colon cancer, estrogen receptors, GPR30, DNMT1.

1. Introducción

El cáncer de colon es uno de los tipos de cáncer más frecuentes, siendo el tercer tipo más diagnosticado a nivel mundial (Mattiuzzi ., 2019; Siegel ., 2020). Es una patología que se encuentra vinculada con hábitos alimentarios, donde el consumo de frutas y verduras está asociado a la disminución del riesgo a desarrollar el cáncer debido al contenido de fibra que contienen, además de diferentes compuestos antioxidantes (Zhong ., 2020). Dentro de los antioxidantes encontramos a los flavonoides, tales como la naringenina, flavonona reconocida por su efecto protector contra el cáncer de colon, debida a su actividad antioxidante, antiinflamatoria y por su afinidad para unirse con receptores estrogénicos (RE) (Chang ., 2018; Li ., 2014; Rehman ., 2018). Los receptores estrogénicos son de dos tipos, α y β , éste último relacionado con procesos apoptóticos que disminuyen a medida que avanza el proceso carcinogénico; por lo que la interacción con disruptores estrogénicos, cuyo nombre se aplica a los compuestos capaces de unirse con RE, altera la actividad y expresión de éstos teniendo un efecto preventivo o de promoción en cáncer de colon (Leiszter ., 2020; Sasso ., 2019). Se ha establecido que algunos disruptores de origen natural, tales como la naringenina, se unen de forma agonista a RE β promoviendo procesos apoptóticos y la expresión del mismo receptor por lo que tendría un efecto protector en cáncer de colon; sin embargo otros disruptores de origen sintético como el BPA, el cual es un compuesto empleado para polimerizar plásticos destinados a contenedores de alimentos y el cual puede migrar a la matriz alimentaria y ser ingerido por el consumidor, promueven mecanismos proliferativos, favoreciendo el desarrollo de cáncer de colon ya que tienen un efecto antagónico con los RE β (Bolli ., 2010; Luceri ., 2020). A su vez, el estudio, sobre cáncer de mama, del efecto de ambos disruptores, naringenina y BPA, en coexposición ha mostrado que la naringenina tiene un efecto antagónico a RE α , promoviendo procesos de apoptosis por activación de p38 (Bulzomi ., 2012; Li ., 2012; Pang ., 2018; Puranik ., 2019).

Aunado a los RE, existen otros receptores sensibles a estrógenos situados en la membrana celular, los GPR30, que dependiendo del estadio del cáncer de colon pudieran promover o inhibir procesos de proliferación celular (Jacenic ., 2019). Uno de los mecanismos por los cuales estos REs presentan dichos efectos es a través de la modulación epigenética, específicamente la metilación

del ADN, regulada por miembros de la familia DNMT. En cáncer de colon se ha reportado sobreexpresión de DNMT1, favoreciendo la metilación en los promotores de genes supresores de tumores y la consecuente inhibición, y a su vez se ha correlacionado negativamente con la expresión de RE β (Sanaei & Kavooosi, 2020). Por lo tanto, los procesos epigenéticos podrían estar involucrados en las actividades proliferativas y antiproliferativas de disruptores estrogénicos, y elucidar dichos mecanismos permitiría proponer alternativas para disminuir los efectos perjudiciales de dichos disruptores de carácter sintético a través del uso de compuestos naturales.

2. Metodología

2.1. Cultivo celular y ensayo de viabilidad

La línea celular de cáncer de colon SW480 obtenida de American Type Cell Colección de cultivo (ATCC, Manassa, VA, EE. UU.) se mantuvo en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomina) a 37°C bajo atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se realizó una curva dosis-respuesta de la NAR. Brevemente, las células fueron sembradas (1 x 10⁴ células/pocillo) en placas de 96 pozos dejándose crecer durante 24 h en medio DMEM con SFB al 10%. Posteriormente, el medio de cultivo fue descartado y reemplazado por los diferentes tratamientos, los cuales constaron de NAR (25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 y 300 μ M) disuelta en DMEM con SFB al 2%, 4.4. μ M de BPA disuelto en 0.01% dimetil sulfóxido (DMSO) y DMEM con SFB al 2% y su correspondiente coexposición empleando la IC 50 de NAR+ BPA (4.4 μ M). Los tratamientos fueron administrados durante 24 h. Para determinar las pruebas de viabilidad, transcurridas las 24 h de tratamiento se retiró el medio y se añadió una solución de MTT empleando 0.5 mg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetil thiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma-Aldrich #M2128) disuelta en DMEM, se dejó incubar 60 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, la solución conteniendo el MTT fue retirada y los cristales de formazán se disolvieron en DMSO a temperatura ambiente durante 5 minutos. La absorbancia de cada muestra se leyó en un escáner espectral flash Varioskan (ThermoCientífico) a 570 nm. La viabilidad celular se calculó de la siguiente manera: Viabilidad (%) = (muestra de absorbancia / control de absorbancia) x 100.

2.2. Detección de apoptosis

La apoptosis se detectó mediante el análisis de citometría de flujo empleando el kit Muse Annexin V and Dead Cell (Millipore Corporation), el cual identifica la fosfatidilserina externalizada en la membrana celular durante el proceso apoptótico. Para el análisis se sembraron las células en placas de 6 pozos (4 x 10⁶ células/2 ml/pozo) en medio DMEM con SFB al 10%. Después de 24 h de incubación, las células fueron tratadas con NAR (150 µM, que corresponde a la IC₅₀), BPA (4.4 µM) y NAR+BPA. Después de 24 h de tratamiento, las células flotantes en los medios de cultivo se separaron mientras que las células adherentes se recogieron por tripsinización, luego las dos poblaciones celulares se agruparon y centrifugaron a 778 × g durante 5 minutos a 4°C, retirando el sobrenadante. 100 µL de células (50 x 10⁴ células) resuspendidas en medio DMEM suplementado con SFB 1% fueron mezcladas con 100 L de Anexina V, previamente preparada bajo las condiciones del proveedor, y fueron incubadas por 20 min a temperatura ambiente y finalmente analizadas en un Muse Cell Analyzer.

2.3. Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)

El ensayo de LDH fue evaluado para determinar necrosis celular, mediante el kit de LDH de Roche. Brevemente, las células (1 x 10⁴ células/pozo) fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio de cultivo DMEM con SFB 10%. Después de 24 h de incubación, el medio fue reemplazado por DMEM con SFB 2%, que contenía los diferentes tratamientos evaluados, y nuevamente fueron incubados durante 24 h. Como control negativo, se usaron células en medio DMEM suplementado con SFB 2% y como control positivo células tratadas con Tritón X-100 y mantenidas con medio DMEM con SFB 2%. Posteriormente fueron recolectados 100 µl del sobrenadante y añadidos 100 µl de la mezcla que contiene el kit, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, la absorbancia se leyó a 492 nm en un lector de ELISA.

2.4. Expresión de genes

La expresión de los genes REβ, REα, GPR30 y DNMT1 se determinó por qPCR empleando β-actina como gen constitutivo para la normalización. La extracción de RNA de las células tratadas con los diferentes tratamiento se realizó mediante columnas de silica-gel (Jena Bioscience GmbH; Jena, Germany kit # PP-210S). Posteriormente, se sintetizó el cDNA empleando cebadores Oligo dT y el kit

SCRIPT cDNA bajo las siguientes condiciones: 50°C por 40 min, 70°C por 10 min (Jena Bioscience GmbH; Jena, Germany, kit #77176). Para el qPCR se utilizó el kit Radiant™ Green Hi-ROX qPCR (Radiant molecules. Alkali Scientific Inc kit #QS2005) siguiendo las siguientes condiciones: 95°C por 2 min, 95°C por 0.05 s, 62°C por 20 s, y 65°C por 10 s para actina, 95°C por 2 min, 95°C por 0.05 s, 64°C por 20 s y 65°C por 10 s para REβ, y 95°C por 2 min, 95°C por 0.05 s, 60°C por 20 s para REα, GPR30 y DNMT1. Los cebadores empleados fueron los siguientes:

Actina

FWD-ACGGGGTCACCCACACTGTGC,
REV-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATG;
REβ FWD-TCCCACTTCGTAACACTTCCG,
REV-ACATTCTATAGCCCTGCTGTGA;
REα FWD-TGCTGGCTACATCATCTCGG,
REV-CAGGAACTTATCCCTCATATAG;
GPR30 FWD-AGTCGGATGTGAGGTTCAAG,
REV-TCTGTGTGAGGAGTGCAAG;
DNMT1 FWD-CGACTACATCAAAGGCAGCAACCTG,
REV-TGGAGTGGACTTGTGGGTGTTCTC.

La cuantificación relativa normalizada se realizó por el método 2 delta-delta Ct, los datos se expresaron como *fold change* (veces de cambio) y se consideró significativo un cambio relativo mayor o menor a 2 *fold*s.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante una prueba de varianza ANOVA de dos y una vía, seguido de una prueba post hoc comparando los tratamientos contra las células tratadas con BPA (Dunnet). También se realizó una correlación de Pearson. El análisis se realizó con el programa Prism 8.

3. Resultados

NAR disminuye la viabilidad celular en coexposición con BPA.

La viabilidad celular puede observarse en la Figura 1a, en donde se muestra que a medida que aumenta la concentración de NAR, la viabilidad disminuye de manera lineal, obteniendo una IC₅₀ de 150 µM. El tratamiento de NAR+BPA, disminuye de manera significativa la viabilidad celular, como se aprecia en la Figura 1b.

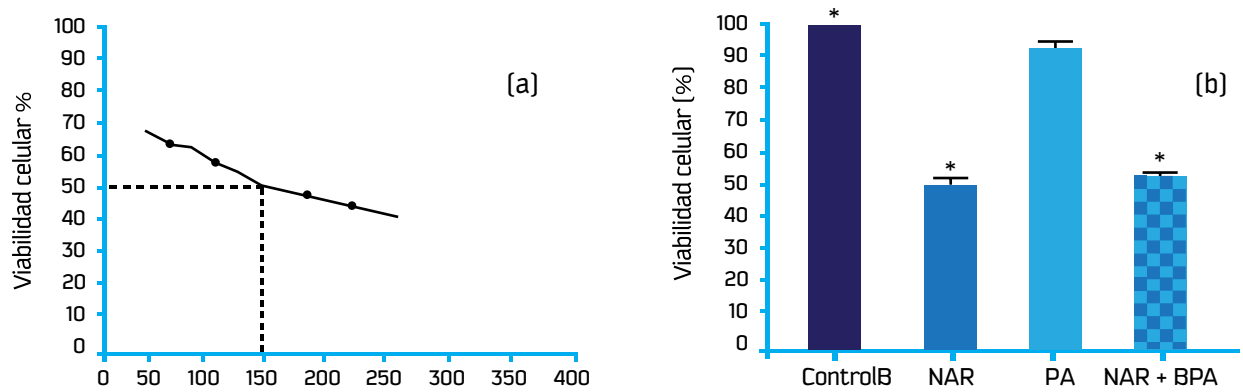


Figura 1. a) Efecto de NAR en la viabilidad de células SW480 después de 24 h de incubación. Los resultados son expresados en porcentaje [%] ± EE, b) Efecto NAR+BPA (IC50 150 μM de NAR + 4.4 μM de BPA) en células SW480 durante 24 h. Los resultados son expresados en porcentaje [%] ± EE, y representan el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. * Diferencia estadística de acuerdo con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$) con respecto a BPA.

3.1. NAR induce muerte apoptótica y BPA necrosis en células de cáncer de colon.

Para determinar el mecanismo de muerte celular inducido por cada tratamiento, se determinó apoptosis y necrosis mediante citometría de flujo empleando el kit de Anexina V. Los resultados muestran que NAR (IC50 150 μM) induce la muerte por apoptosis celular en el 40% de las células tratadas a las 24 h de exposición con o sin exposición con BPA (4.4 μM), y aproximadamente el 10% de las células

tratadas con NAR y NAR+BPA mueren por necrosis (Figura 2). Estos datos fueron corroborados con el ensayo de LDH (Figura 3), el cual es un biomarcador indirecto de necrosis. El resultado arrojó un porcentaje cercano al 10% de muerte celular por necrosis en células tratadas con NAR con o sin BPA. Además, es importante resaltar que también cerca del 10% de las células tratadas con BPA mueren, y esta muerte es principalmente por necrosis según lo sugerido por ambos análisis (citometría de flujo y ensayo de LDH).

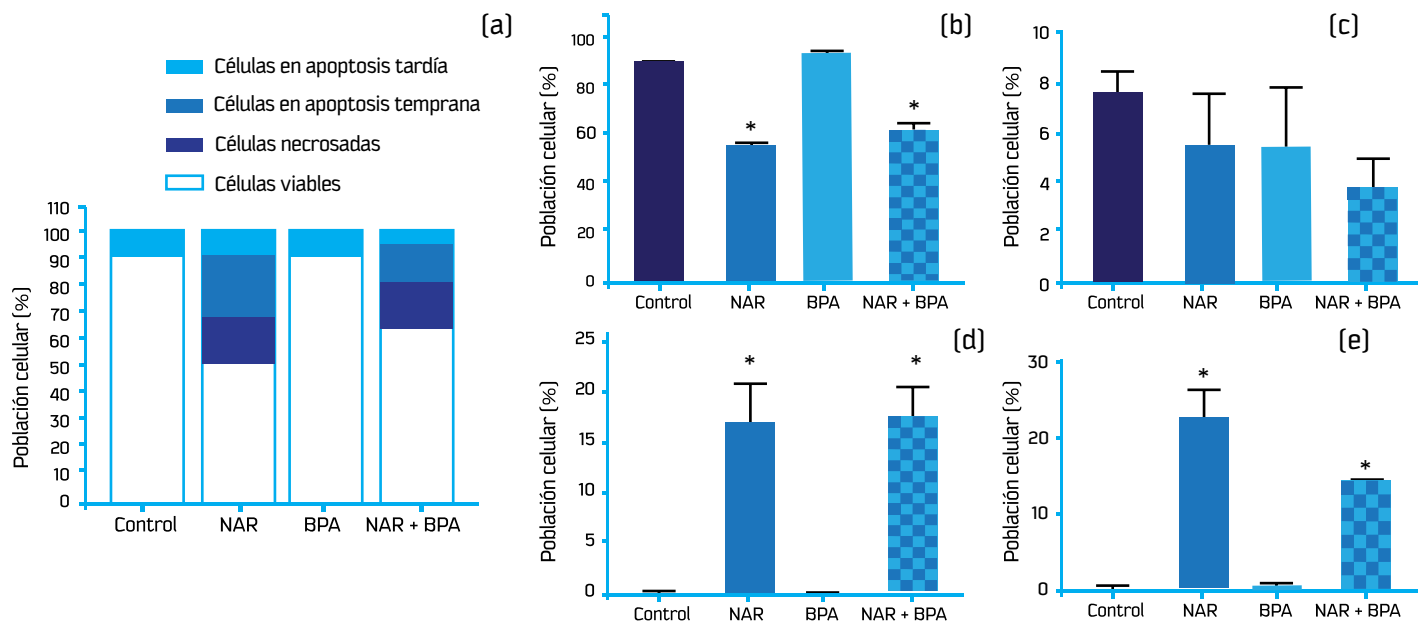


Figura 2. Análisis de citometría de flujo con Anexina V bajo los tratamiento con IC50 de NAR (150 μM), BPA (4.4 μM) y coexposición NAR (150 μM) + BPA (4.4 μM) en células SW480 después de 24 h de incubación. a) Todas las células b) Células viables, c) Células con necrosis, d) Células en apoptosis temprana, e) Células en apoptosis tardía. Los resultados son expresados como porcentaje de población celular [%] ± EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes con 2 réplicas. * Diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Dunnet ($p < 0.05$) con respecto a BPA.

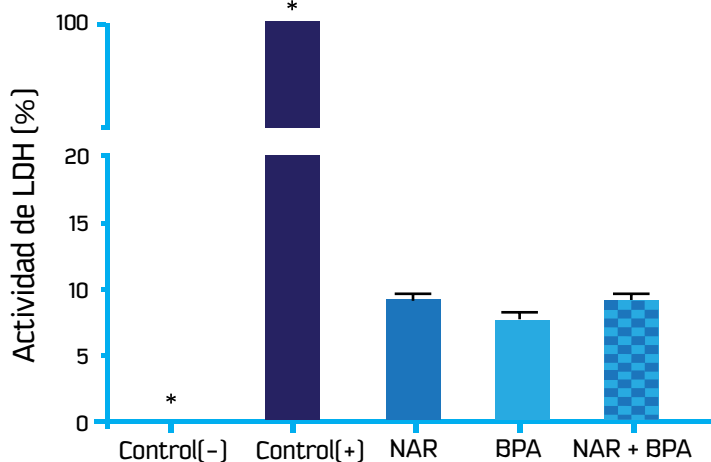


Figura 3. Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH). Efecto de la coexposición de NAR (IC50250 μ M) y BPA (4.4 μ M) en células SW480 expuestas durante 24 h. Los resultados son expresados como actividad de LDH (%) \pm EE, y representa el promedio de 3 experimentos independientes con 3 réplicas. Distinta letra indica diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Dunnet ($p < 0.05$) con respecto a BPA.

3.2. BPA y NAR modulan diferencialmente la expresión transcripcional de RE α , RE β , GPR30 y DNMT1.

Los receptores estrogénicos pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y son considerados como marcadores pronóstico en la práctica clínica del cáncer. Los resultados acerca de la expresión transcripcional de RE en el presente estudio muestran que BPA disminuye la expresión transcripcional del RE β (0.061 veces), mientras que NAR aumenta su expresión (2.2 veces). Más aún, NAR+BPA aumenta aún más la expresión del RE β (10.44 veces \pm 0.04) (Figura 4). Por otro lado, RE α resultó inducido por NAR con o sin coexposición con BPA (0.84 veces y 1.24 veces, respectivamente) con respecto al grupo expuesto a BPA (0.45 veces). Tanto las células tratadas con NAR y NAR+BPA no presentan diferencia en cuanto a la expresión de GPR30 con respecto a las células tratadas con BPA, aunque se observa una tendencia al aumento en su inducción por parte de NAR en ambos tratamientos. Asimismo, BPA presenta una menor expresión del gen DNMT1 que el grupo tratado con NAR+BPA mientras que en el grupo NAR y BPA se encontró una expresión muy similar.

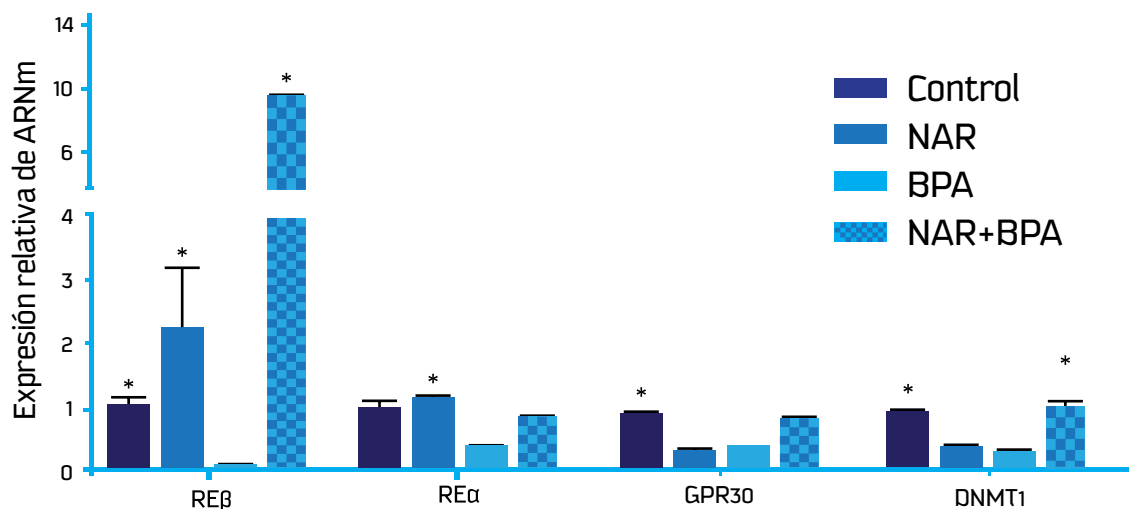


Figura 4. Expresión relativa de genes ER β , ER α , GPR30 y DNMT1 con respecto a β -actina en células SW480 tratadas con NAR (150 μ M), BPA (4.4 μ M) y coexposición NAR (150 μ M) + BPA (4.4 μ M). Los resultados son expresados como expresión relativa \pm EE, y representa el promedio de 2 experimentos independientes. * Diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Dunnet ($p < 0.05$) con respecto a BPA.

4. Discusión

Estudios previos han demostrado que el riesgo de desarrollar cáncer de colon se incrementa con una alteración en las vías de señalización gobernadas por los receptores de estrógenos. Esto debido a que existe evidencia de que el RE β , cuya función se ha determinado

que induce apoptosis celular, demuestra una correlación inversa con la presencia de pólipos colorrectales y estadio del tumor; mientras que el RE α , asociado a eventos proliferativos, se encuentra aumentado en este tipo de cáncer (Caiazza *et al.*, 2015; Elbanna *et al.*, 2012). Algunos disruptores estrogénicos de origen natural como los

fitoestrógenos pueden unirse de manera agonista al RE β promoviendo apoptosis según lo observado en estudios epidemiológicos y modelos animales (Hedelin *et al.*, 2006). En células de cáncer de mama, la naringenina (5 μ M) se une de manera agonista al RE β disminuyendo la expresión de ARNm de TGF β 3, gen que codifica citosinas involucradas en morfogénesis y crecimiento de tejidos; en células de cáncer de colon (DLD-1) la naringenina (10 μ M) induce apoptosis por la cascada de señalización p38/MAPK modulada tras la activación agonista de RE β (Kim & Park, 2013; Totta *et al.*, 2004). Por otro lado, existen compuestos sintéticos con actividad de disruptor endócrino, como el BPA, que ha demostrado promover algunos tipos de cáncer por la capacidad agonista con RE α . Ejemplo de ello es el demostrado en células de cáncer de mama donde concentraciones de 1 μ M de BPA promueven la expresión de TGF α implicado en la proliferación de tejidos, y algunos ensayos enzimáticos han reportado efecto agonista entre el BPA (0.1 - 10 μ M) y RE α sustentando lo anterior (Hiroi *et al.*, 1999; Masuya *et al.*, 2019; Sengupta *et al.*, 2013). El efecto de la exposición combinada de disruptores naturales como la naringenina y xenoestrógenos como el BPA ha sido muy poco estudiado, lo cual sería de trascendencia para proponer un mecanismo para disminuir o mitigar los efectos perjudiciales del xenoestrógeno BPA a través de compuestos naturales.

Algunos autores han reportado una disminución en la viabilidad en células SW480 tratadas con naringenina, encontrando una IC₅₀ de 200 μ M, muy similar a la encontrada en el presente estudio (150 μ M). Song *et al.*, (2015) reportaron que la naringenina disminuye la viabilidad en células de cáncer de colon SW480 a través de la activación de p38 MAM quinasa, la cual inhibe la expresión de ciclina D1, frenando ciclo celular y promoviendo apoptosis. En el presente estudio se encontró que NAR disminuye viabilidad de células SW480 en un modo dosis-dependiente, y los mecanismos involucrados en dicho efecto son apoptosis y necrosis, sugiriendo que se activa la cascada de necroptosis, el cual es un mecanismo de muerte celular alterno que comparte similitudes morfológicas con la necrosis. Se ha reportado que la necroptosis es inducida por flavonoides como la quercetina (50 μ M) en células de cáncer de mama, observando que ésta promueve dicha vía tras la actividad de factor de necrosis tumoral (TNF), el cual se une a serina/treonina-proteína que actúa con el receptor de quinasa 3 (RIPK3) y río abajo en la mayoría de los casos activa Caspasa

8 (Galluzzi *et al.*, 2017; Khorsandi *et al.*, 2017). Por su parte el BPA, no disminuye de manera significativa la viabilidad celular, sin embargo, estudios previos han reportado que, a pesar de no impactar en proliferación, suceden eventos moleculares que le confieren a la célula capacidades de malignización e incluso de metastatizar, como lo reportado por Chen *et al.*, (2016), quienes encontraron una sobreexpresión de proteínas de migración celular como E-cadherina y Vimentina en células de Leyding (células localizadas en testículos) expuestas a BPA (10 μ M). Otros autores como Huang *et al.*, (2017) han evaluado diferentes concentraciones de BPA (0.1-1000 nM) en células epiteliales de próstata, reportando una viabilidad del 98% pero con un aumento en la expresión de receptores estrogénicos tanto como . La expresión de RE α , implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de colon, se ha relacionada con una menor sobrevida en estudios epidemiológicos (Nüssler *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2019). La pérdida de la expresión de RE β también se ha relacionado con un peor pronóstico de vida pues una de sus principales funciones es promover procesos de apoptosis celular (Caiazza *et al.*, 2015). Los hallazgos de este estudio muestran que la expresión transcripcional de RE β disminuye cuando las células son tratadas con BPA, resultado que concuerda con lo reportado por Hess-Wilson *et al.* (2007) quienes evaluaron la disminución de RE β en células de cáncer de próstata LNCaP tratadas con BPA (1nM). A su vez, la expresión de RE α es mayor que la expresión de RE β en las células expuestas a BPA, que podría estar asociado a los efectos negativos de BPA reflejado en el porcentaje de células que mueren por necrosis en nuestro estudio, como lo reportado en cultivos primarios cerebelosos donde concentraciones entre 1-10 μ M de BPA aumentan la liberación de LDH dependiente de RE (Le & Belcher, 2010). Por otro lado, las células tratadas con NAR, aumentan la expresión tanto de RE β como de RE α . Es importante señalar que la expresión de RE β es predominante en el epitelio colónico normal diferenciado, pero su expresión disminuye debido al microambiente hipóxico en colon a medida que avanza la malignidad resultante del cáncer (Konstantinopoulos *et al.*, 2003). Por lo tanto, el hallazgo encontrado en este estudio, en el que NAR por sí sola o administrada en células expuestas a BPA induce la expresión de RE β es de suma importancia, ya que se sugiere que esto permite que la célula siga activando mecanismos de defensa que le confieran ventajas para morir.

También se observó que la expresión de GPR30 en células tratadas con NAR o NAR+BPA no presenta cambio en la expresión con respecto a las que únicamente son tratadas con BPA, aunque se observa una tendencia no significativa al aumento en la expresión de GPR30 en células NAR+BPA. GPR30 es un receptor acoplado a proteína G sensible a estrógeno, que puede desencadenar diferentes cascadas de señalización, tanto proliferativas como apoptóticas, de migración celular entre otras. Estudios como el reportado por Dong *et al.*, (2011) muestran que BPA (10 μ M) activa la cascada de señalización de Erk1/2 y la regulación transcripcional de c-fos a través de GPR30, mediante una vía mediada por AP1 en células de cáncer de mama. Por otro lado, estudios previos realizados en células de cáncer de próstata PC-3 han demostrado que GPR30 activa prolongadamente Erk1/2 que, a su vez, aumenta la expresión de p21 mediado por c-jun y c-fos, conduciendo a arresto al ciclo celular en la fase G2 (Chan *et al.*, 2010). A su vez, se ha reportado que compuestos naturales, tales como la isoflavona genisteína (Morton *et al.*, 2002) y equol, un metabolito colónico derivado de la daidzeína, activan GPR30 (Rowlands *et al.*, 2011). Algunos flavonoides, tales como la baicaleína, han demostrado tener efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, por su afinidad a receptores GPR30, los cuales disminuyen la expresión de la proteína EGFR, relacionada con supervivencia celular; además, se observó una disminución en migración celular evaluada por ensayo de herida, mecanismo sugerido, mediante el cual la naringenina pudiera disminuir la viabilidad celular, aún en coexposición con BPA (Shang *et al.*, 2015). En el presente estudio, se encontró una regulación transcripcional positiva, aunque no significativa, de GPR30 por NAR bajo condiciones de exposición a BPA de las células, sugiriendo que uno de los mecanismos antiproliferativos propuestos por el flavonoide es a través de la vía inducida por p21, mismo que fue propuesto por Chan *et al.*, (2010). De acuerdo a nuestro conocimiento, no ha sido reportada la inducción transcripcional de GPR30 por parte de la naringenina; sin embargo, se necesitan estudios más amplios para poder establecer la activación del arresto al ciclo celular en esa fase por parte de NAR.

En cuanto a la expresión de DNMT1, los tratamientos con NAR y BPA muestran expresión similar entre ellos y se encuentran disminuidos comparados con el grupo NAR+BPA. DNMT1 es una metiltransferasa primaria,

que contribuye a la metilación, expresión génica y mantenimiento de ADN de novo en la célula. En condiciones normales conserva los patrones de metilación correctos, y en cáncer de colon su expresión se encuentra alterada y se relaciona con una actividad aberrante ya que promueve la metilación en la zona promotora de genes supresores de tumores. Laing *et al.*, (2019) señalan que BPA disminuye la expresión de DNMT1 correlacionado a una hipometilación global causando inestabilidad genómica, y pudiera estar relacionado con los eventos negativos del BPA en el presente estudio. DNMT1 inhibe la transcripción de genes supresores de tumores p27 y Bax, relacionados con la proliferación celular, implicados en el desarrollo de varios tipos de cánceres (Peng *et al.*, 2006). Sin embargo, también se ha involucrado en la hipermetilación del promotor de Bcl-2, un conocido regulador de apoptosis celular, y esto inhibe la expresión de su proteína (Zheng *et al.*, 2020). Las células tratadas con NAR+BPA tienen mayor expresión de DNMT1, lo que sugiere que eventos apoptóticos y anti-apoptóticos están sucediendo a la vez inducidos por efecto de BPA y NAR al mismo tiempo, pero que la hipermetilación de protooncogenes, como Bcl-2 a través de DNMT1, pudiera contribuir al efecto antiproliferativo de NAR aún bajo los efectos moleculares de BPA (coexposición). Se sugiere la realización de estudios que incluyan blancos moleculares de DNMT1 para elucidar detalladamente el papel de DNMT1 en el efecto antiproliferativo y apoptótico de la naringenina.

Conclusión

Los hallazgos encontrados en el presente estudio sugieren que el BPA, si bien no modifica la viabilidad de manera importante en las células de cáncer de colon SW480, sí interviene en mecanismos relacionados con proliferación celular, como es la disminución del RE β en células de cáncer de colon SW480. A su vez, NAR presenta un efecto anticancerígeno a través de la reducción de la viabilidad celular, mediante la inducción de mecanismos apoptóticos y necróticos, y esa acción antiproliferativa está asociada a la modulación transcripcional de RE β y GPR30. La inducción de la muerte de células de cáncer por fitoquímicos que se consumen naturalmente en la dieta abre un nuevo horizonte para la investigación acerca de la reducción del impacto negativo de disruptores endócrinos químicos a los que constantemente estamos expuestos.

Referencias bibliográficas

- Bolli, A., Bulzomi, P., Galluzzo, P., Acconcia, F., & Marino, M. (2010). Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life*, 62(9), 684-687.
- Bulzomi, P., Bolli, A., Galluzzo, P., Acconcia, F., Ascenzi, P., & Marino, M. (2012). The naringenin-induced proapoptotic effect in breast cancer cell lines holds out against a high bisphenol a background. *IUBMB Life*, 64(8), 690-696.
- Caiazza, F., Ryan, E. J., Doherty, G., Winter, D. C., & Sheahan, K. (2015). Estrogen Receptors and Their Implications in Colorectal Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*, 5.
- Chan, Q. K. Y., Lam, H.-M., Ng, C.-F., Lee, A. Y. Y., Chan, E. S. Y., Ng, H.-K., Ho, S.-M., & Lau, K.-M. (2010). Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G 2 cell-cycle arrest. *Cell Death & Differentiation*, 17(9), 1511-1523.
- Chang, H., Lei, L., Zhou, Y., Ye, F., & Zhao, G. (2018). Dietary Flavonoids and the Risk of Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Nutrients*, 10(7).
- Chen, Z.-J., Zhang, K.-S., Ge, L.-C., Liu, H., Chen, L.-K., Du, J., & Wang, H.-S. (2016). Signals involved in the effects of bisphenol A (BPA) on proliferation and motility of Leydig cells: A comparative proteomic analysis. *Toxicology Research*, 5(6), 1573-1584.
- Cheng, J.-T., Wang, L., Wang, H., Tang, F.-R., Cai, W.-Q., Sethi, G., Xin, H.-W., & Ma, Z. (2019). Insights into Biological Role of LncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells*, 8(10), 1178.
- Cho, N. L., Javid, S. H., Carothers, A. M., Redston, M., & Bertagnolli, M. M. (2007). Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. *Cancer Research*, 67(5), 2366-2372.
- Dong, S., Terasaka, S., & Kiyama, R. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 159(1), 212-218.
- Elbanna, H. G., Ebrahim, M. A., Abbas, A. M., Zalata, K., & Hashim, M. A. (2012). Potential value of estrogen receptor beta expression in colorectal carcinoma: Interaction with apoptotic index. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 43(1), 56-62.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Chan, F. K.-M., & Kroemer, G. (2017). Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 12(1), 103-130.
- Hedelin, M., Bälter, K. A., Chang, E. T., Bellocco, R., Klint, A., Johansson, J.-E., Wiklund, F., Thellenberg-Karlsson, C., Adami, H.-O., & Grönberg, H. (2006). Dietary intake of phytoestrogens, estrogen receptor-beta polymorphisms and the risk of prostate cancer. *The Prostate*, 66(14), 1512-1520.
- Hess-Wilson, J. K., Webb, S. L., Daly, H. K., Leung, Y.-K., Boldison, J., Comstock, C. E. S., Sartor, M. A., Ho, S.-M., & Knudsen, K. E. (2007). Unique Bisphenol A Transcriptome in Prostate Cancer: Novel Effects on ERβ Expression That Correspond to Androgen Receptor Mutation Status. *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1646-1653.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y., & Taketani, Y. (1999). Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocrine Journal*, 46(6), 773-778.
- Huang, D.-Y., Zheng, C.-C., Pan, Q., Wu, S.-S., Su, X., Li, L., Wu, J.-H., & Sun, Z.-Y. (2018). Oral exposure of low-dose bisphenol A promotes proliferation of dorsolateral prostate and induces epithelial-mesenchymal transition in aged rats. *Scientific Reports*, 8(1), 490.
- Jacenic, D., Beswick, E. J., Krajewska, W. M., & Prossnitz, E. R. (2019). G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 25(30), 4092-4104.
- 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. *Bratislavske Lekarske Listy*, 118(2), 123-128.
- Kim, S., & Park, T. I. (2013). Naringenin: A partial agonist on estrogen receptor in T47D-KBluc breast cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(10), 890-899.
- Konstantinopoulos, P. A., Kominea, A., Vadoros, G.,

- Sykiotis, G. P., Andricopoulos, P., Varakis, I., Sotiropoulou-Bonikou, G., & Papavassiliou, A. G. (2003). Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 39(9), 1251-1258.
- Laing, L. V., Viana, J., Dempster, E. L., Trznadel, M., Trunkfield, L. A., Webster, T. M. U., Aerle, R. van, Paull, G. C., Wilson, R. J., Mill, J., & Santos, E. M. (2016). Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics*, 11(7), 526-538.
- Le, H. H., & Belcher, S. M. (2010). Rapid Signaling Actions of Environmental Estrogens in Developing Granule Cell Neurons Are Mediated by Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 151(12), 5689-5699.
- Leiszter, K., Galamb, O., Kalmár, A., Zsigrai, S., Valcz, G., Szigeti, K. A., Barták, B. K., Nagy, Z. B., Dank, M., Liposits, Z., Igaz, P., Tulassay, Z., & Molnár, B. (2020). [Potential role of estrogens in colorectal tumour development]. *Orvosi Hetilap*, 161(14), 532-543.
- Li, H., Zhu, F., Chen, H., Cheng, K. W., Zykova, T., Oi, N., Lubet, R. A., Bode, A. M., Wang, M., & Dong, Z. (2014). 6-C-(E-phenylethenyl)-naringenin suppresses colorectal cancer growth by inhibiting cyclooxygenase-1. *Cancer Research*, 74(1), 243-252.
- Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., & Korach, K. S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 1029-1035.
- Luceri, C., Femia, A. P., Tortora, K., D'Ambrosio, M., Fabbri, S., Fazi, M., & Caderni, G. (2020). Supplementation with phytoestrogens and insoluble fibers reduces intestinal carcinogenesis and restores ER- β expression in Apc-driven colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 29(1), 27-35.
- Martinez-Ciarpaglini, C., Oltra, S., Roselló, S., Roda, D., Mongort, C., Carrasco, F., Gonzalez, J., Santonja, F., Tarazona, N., Huerta, M., Espí, A., Ribas, G., Ferrández, A., Navarro, S., & Cervantes, A. (2019). Low miR200c expression in tumor budding of invasive front predicts worse survival in patients with localized colon cancer and is related to PD-L1 overexpression. *Modern Pathology*, 32(2), 306-313.
- Masuya, T., Iwamoto, M., Liu, X., & Matsushima, A. (2019). Discovery of novel oestrogen receptor α agonists and antagonists by screening a revisited privileged structure moiety for nuclear receptors. *Scientific Reports*, 9(1), 9954.
- Mattiuzzi, C., Sanchis-Gomar, F., & Lippi, G. (2019). Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Annals of Translational Medicine*, 7(21), 609.
- Morton, M. S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L. D., & Evans, B. A. J. (2002). Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *The Journal of Nutrition*, 132(10), 3168-3171.
- Nüssler, N. C., Reinbacher, K., Shanny, N., Schirmeier, A., Glanemann, M., Neuhaus, P., Nussler, A. K., & Kirschner, M. (2008). Sex-specific differences in the expression levels of estrogen receptor subtypes in colorectal cancer. *Gender Medicine*, 5(3), 209-217.
- Pang, X., Fu, W., Wang, J., Kang, D., Xu, L., Zhao, Y., Liu, A.-L., & Du, G.-H. (2018). Identification of Estrogen Receptor α Antagonists from Natural Products via In Vitro and In Silico Approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 6040149.
- Peng, D.F., Kanai, Y., Sawada M, Ushijima, S., Hiraoka, N., Kitazawa, S., Hirohashi, S. (2006). DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis*. 27(6):1160-1168.
- Puranik, N. V., Srivastava, P., Bhatt, G., John Mary, D. J. S., Limaye, A. M., & Sivaraman, J. (2019). Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ER α) by various parameters and molecular modelling approach. *Scientific Reports*, 9(1), 7450.
- Rehman, M. U., Rahman Mir, M. U., Farooq, A., Rashid, S. M., Ahmad, B., Bilal Ahmad, S., Ali, R., Hussain, I., Masoodi, M., Muzamil, S., Madkhali, H., & Ahmad Ganaie, M. (2018). Naringenin (4,5,7-trihydroxyflavanone) suppresses the

- development of precancerous lesions via controlling hyperproliferation and inflammation in the colon of Wistar rats. *Environmental Toxicology*, 33(4), 422-435.
- Rowlands, D. J., Chapple, S., Siow, R. C. M., & Mann, G. E. (2011). Equol-Stimulated Mitochondrial Reactive Oxygen Species Activate Endothelial Nitric Oxide Synthase and Redox Signaling in Endothelial Cells. *Hypertension*, 57(4), 833-840.
- Sanaei, M., & Kavooosi, F. (2020). Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on Estrogen Receptor Alpha/Beta and DNA Methyltransferase 1 Genes Expression, Apoptosis Induction, and Cell Growth Prevention of the Colon Cancer HT 29 Cell Line. *International Journal of Preventive Medicine*, 11.
- Sasso, C. V., Santiano, F. E., Campo Verde Arboccó, F., Zyla, L. E., Semino, S. N., Guerrero-Gimenez, M. E., Pistone Creydt, V., López Fontana, C. M., & Carón, R. W. (2019). Estradiol and progesterone regulate proliferation and apoptosis in colon cancer. *Endocrine Connections*, 8(3), 217-229.
- Sengupta, S., Obiorah, I., Maximov, P. Y., Curpan, R., & Jordan, V. C. (2013). Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *British Journal of Pharmacology*, 169(1), 167-178.
- Shang, D., Li, Z., Zhu, Z., Chen, H., Zhao, L., Wang, X., & Chen, Y. (2015). Baicalein suppresses 17- β -estradiol-induced migration, adhesion and invasion of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor 30 signaling pathway. *Oncology Reports*, 33(4), 2077-2085.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2020). Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Song, Y. J., Sawamura, M., Ikeda, K., Igawa, S., & Yamori, Y. (2000). Soluble dietary fibre improves insulin sensitivity by increasing muscle GLUT-4 content in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 27(1-2), 41-45.
- Totta, P., Acconcia, F., Leone, S., Cardillo, I., & Marino, M. (2004). Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: Involvement of estrogen receptor alpha and beta signalling. *IUBMB Life*, 56(8), 491-499.
- Ye, S.-B., Cheng, Y.-K., Zhang, L., Wang, X.-P., Wang, L., & Lan, P. (2019). Prognostic value of estrogen receptor- α and progesterone receptor in curatively resected colorectal cancer: A retrospective analysis with independent validations. *BMC Cancer*, 19(1), 933.
- Zeng, H., Li, T., He, X., Cai, S., Luo, H., Chen, P., Chen, Y. (2020). Oxidative stress mediates the apoptosis and epigenetic modification of the Bcl-2 promoter via DNMT1 in a cigarette smoke-induced emphysema model. *Respiratory Research*, 21, 229.
- Zhong, Y., Zhu, Y., Li, Q., Wang, F., Ge, X., Zhou, G., & Miao, L. (2020). Association between Mediterranean diet adherence and colorectal cancer: A dose-response meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*.

