

Evaluación del efecto de la quercetina sobre la expresión de genes asociados a apoptosis en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116.

¹Valentina Chavarriaga Delgadillo, ¹Mauricio Alberto Quimbaya, ¹Diana Carolina Clavijo

¹Programa de Biología, Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas. Facultad de Ingeniería y Ciencias.
Pontificia Universidad Javeriana Cali.

Resumen

El cáncer de colon es una de las principales causas de mortalidad por neoplasias a nivel mundial y se caracteriza, entre otros aspectos, por alteraciones en los mecanismos asociados a apoptosis que favorecen la supervivencia tumoral. La resistencia terapéutica y la aparición de efectos secundarios adversos a los tratamientos convencionales han posicionado a los compuestos naturales con actividad medicinal como objeto de estudio. Particularmente, la quercetina ha despertado interés por su capacidad para modular procesos celulares relacionados con proliferación y muerte celular programada. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la acción de la quercetina sobre el proceso apoptótico mediante ensayos celulares y moleculares. Para ello, células de la línea HCT116 derivadas de adenocarcinoma de colon humano, fueron tratadas con quercetina a concentraciones de 0 μ M, 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M. El crecimiento celular se evaluó mediante curvas de crecimiento con tiempos de exposición al flavonoide de 24, 48, 72 y 96 horas. Complementariamente se diseñaron primers específicos dirigidos a genes proapoptóticos y antiapoptóticos, empleados para cuantificar cambios en la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados mostraron que la quercetina no produjo una disminución significativa del crecimiento celular al considerar el efecto general de las concentraciones evaluadas, aunque se observaron variaciones dependientes de la concentración y el tiempo de exposición. En cuanto a la expresión génica, el tratamiento con 100 μ M durante 96 horas generó una respuesta molecular mixta, caracterizada por el aumento relativo de *BAD*, *TP53*, *BCLXL* y *BCL2*, junto con la disminución de *CASP3*. En conjunto estos hallazgos sugieren que la quercetina modificó la expresión de genes asociados a la vía apoptótica mitocondrial, pero no permitió confirmar si hubo una inducción de apoptosis clara bajo las condiciones evaluadas.

Palabras clave: quercetina; cáncer de colon; apoptosis mitocondrial; HCT116; expresión génica.

Abstract

Colon cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide and is characterized, among other aspects, by alterations in apoptosis-associated mechanisms that favor tumor cell survival. Therapeutic resistance and the occurrence of adverse side effects associated with conventional treatments have positioned natural compounds with medicinal activity as an object of study. In particular, quercetin has attracted interest due to its ability to modulate cellular processes related to proliferation and programmed cell death. This study aimed to determine the effect of quercetin on the apoptotic process through cellular and molecular assays. For this purpose, HCT116 cells derived from human colon adenocarcinoma were treated with quercetin at concentrations of 0 μ M, 20 μ M, 50 μ M, and 100 μ M. Cell growth was evaluated through growth curves after 24, 48, 72, and 96 hours of exposure to the flavonoid. In addition, specific primers targeting proapoptotic and antiapoptotic genes were designed and used to quantify changes in

gene expression by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed that quercetin did not produce a significant decrease in cell growth when considering the overall effect of the evaluated concentrations, although variations dependent on concentration and exposure time were observed. Regarding gene expression, treatment with 100 μ M for 96 hours generated a mixed molecular response, characterized by the relative increase of *BAD*, *TP53*, *BCLXL*, and *BCL2*, together with the decrease of *CASP3*. Overall, these findings suggest that quercetin modified the expression of genes associated with the mitochondrial apoptotic pathway but did not allow confirmation of a clear induction of apoptosis under the evaluated conditions.

Keywords: quercetin; colon cancer; mitochondrial apoptosis; HCT116; gene expression.

Introducción

El cáncer de colon es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, posicionándose como la segunda causa de muerte por cáncer y el tercer tipo de cáncer más frecuente [1]. Esta enfermedad representa un importante problema de salud pública. De acuerdo con estudios epidemiológicos, Colombia es uno de los países que ha mostrado una tendencia creciente en la incidencia del cáncer de colon durante las últimas décadas [1]. A esto se suma que, en estadios avanzados de la enfermedad, la efectividad de los tratamientos convencionales se ve limitada por la aparición de resistencia terapéutica y por efectos secundarios adversos [2]. A nivel celular, el desarrollo y progresión del cáncer de colon se asocia con alteraciones en múltiples procesos biológicos fundamentales, entre los cuales destaca la desregulación de la apoptosis, un mecanismo esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular [3].

El desarrollo del cáncer surge por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan los mecanismos fisiológicos de control celular [4]. Existen dos tipos de genes cuya mutación impulsa el crecimiento de células cancerígenas: los protooncogenes, que regulan el crecimiento y la división celular, y los genes supresores de tumores, cuya función principal es proteger al organismo del crecimiento descontrolado de células neoplásicas. Cuando estos genes se alteran, los protooncogenes actúan como oncogenes en las células cancerígenas. Un ejemplo es *KRAS*, uno de los oncogenes más frecuentes en cáncer colorrectal, su activación constante favorece la proliferación y supervivencia celular. Por otro lado, *TP53* es un gen supresor de tumores que codifica la proteína p53, esta controla el daño en las células deteniendo el ciclo celular o induciendo la muerte celular. Cuando *TP53* muta, este control se pierde y se favorece el desarrollo del cáncer [4].

Uno de los procesos celulares más afectados en el desarrollo del cáncer es la apoptosis. Se trata de un proceso de muerte celular programada que permite la eliminación controlada de células dañadas o potencialmente peligrosas, y su correcto funcionamiento, es crucial para prevenir la proliferación celular descontrolada [5]. En condiciones fisiológicas, la apoptosis actúa como un mecanismo de defensa frente a situaciones de estrés celular, como la pérdida de nutrientes, la acumulación de alteraciones genéticas o la hipoxia [5]. Sin embargo, en células tumorales, la evasión de este mecanismo constituye una de las características distintivas del cáncer, contribuyendo a la supervivencia celular y al desarrollo de resistencia a terapias antineoplásicas [5,6]. Este proceso puede activarse a través de dos vías principales: la vía extrínseca, mediada por la activación de receptores de muerte en la membrana celular, y la vía intrínseca o mitocondrial, regulada principalmente por la familia de proteínas BCL2 [5]. La regulación de la apoptosis

depende de una compleja red de señalización que involucra genes proapoptóticos, como *BAX* y *BAK*, responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial que permite la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas ejecutoras, así como proteínas antiapoptóticas como *BCL2* que inhibe la acción de *BAX* y *BAK* cuando la apoptosis no es requerida [5]. La alteración en la expresión o función de estos genes favorece el crecimiento celular descontrolado característico de las células cancerígenas.

El manejo terapéutico del cáncer de colon incluye diferentes estrategias que varían según la etapa de la enfermedad. El tratamiento quirúrgico es la principal opción desde el estadio I y consiste en la resección del tumor junto los tejidos circundantes y los ganglios linfáticos cercanos, se puede realizar mediante cirugía tradicional o laparoscópica. Aunque sigue siendo el tratamiento más efectivo, toda intervención quirúrgica conlleva riesgos, como infecciones, sangrado o la aparición de una fuga anastomótica [7]. A partir de la etapa II, y de acuerdo con las características del paciente, se emplean tratamientos farmacológicos que incluyen quimioterapia neoadyuvante y adyuvante, combinando medicamentos como fluorouracilo y oxaliplatino, así como terapias dirigidas, con bevacizumab y cetuximab [8]. Si bien estos tratamientos mejoran la supervivencia del paciente, también se asocian a resistencia terapéutica y diversos efectos secundarios como neuropatía, alteraciones gastrointestinales, anemia e hipertensión, lo que limita su uso y afecta la calidad de vida [8]. Estas limitaciones han impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y enfoques complementarios que permitan mejorar la respuesta al tratamiento y reducir la toxicidad.

En las últimas décadas, se ha incrementado el interés en el estudio de compuestos naturales con potencial terapéutico, particularmente aquellos con propiedades anticancerígenas, debido a su capacidad para modular procesos celulares involucrados en la progresión tumoral. Dentro de este grupo, la quercetina, un flavonoide con amplia distribución en frutas y vegetales, ha generado gran interés por su actividad biológica. Se caracteriza por la presencia de múltiples grupos hidroxilo en su estructura química que le confieren gran potencial de oxidorreducción. Esta propiedad le permite actuar como un neutralizador de especies reactivas de oxígeno (ROS), interfiriendo en procesos celulares asociados con la respuesta al estrés oxidativo [9].

En el contexto del cáncer, se ha demostrado que la quercetina induce apoptosis regulando diversas rutas de señalización celular relacionadas con proliferación y supervivencia. Entre sus efectos está la modulación de proteínas de la familia *BCL2*, aumentando la expresión de proteínas proapoptóticas como *BAX* y la activación de caspasas asociadas a la vía mitocondrial. Estos efectos pueden producirse tanto por la interferencia directa con dichas vías de señalización, como por cambios en el estado oxidativo de la célula [9]. Ferraresi y colaboradores, afirmaron que dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición al flavonoide, la quercetina puede comportarse como antioxidante o prooxidante, en este último caso, el incremento del estrés oxidativo y la disminución de antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) en la célula pueden contribuir a la inducción de apoptosis. Por lo tanto, su efecto proapoptótico no se debe a un solo mecanismo, sino a la combinación de varios procesos moleculares que dependen del contexto experimental [10]. En cáncer de colon, estudios han asociado su consumo con un menor riesgo en el desarrollo de la enfermedad [9]. Asimismo, investigaciones *in vitro* en líneas celulares de cáncer colorrectal, han demostrado su efecto antitumoral induciendo apoptosis a través de la vía mitocondrial, regulando la expresión de proteínas de la familia *BCL2* [11,12,13].

Además, se ha reportado que modula vías de señalización claves como la vía que regula a p53, presentando un perfil de baja toxicidad [12].

Si bien numerosos estudios respaldan el potencial antitumoral de la quercetina, en particular por su capacidad para regular la apoptosis en células de cáncer de colon, aún es necesario continuar generando evidencia experimental que permita comprender con mayor profundidad la modulación de genes clave en el proceso apoptótico bajo distintas condiciones experimentales.

Por lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de quercetina sobre la proliferación celular y la expresión de genes asociados al proceso apoptótico en células de cáncer de colon? Para abordarla, este estudio tiene como objetivo establecer la acción de la quercetina sobre el proceso apoptótico, a través de ensayos celulares y moleculares, para identificar cambios en la expresión de genes asociados a apoptosis en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116.

Metodología

Con el fin de evaluar el efecto de la quercetina sobre la proliferación celular y la regulación de genes asociados a apoptosis en células de cáncer de colon, la metodología de este estudio se dividió en tres fases. Primero (I) Implementar herramientas moleculares que permitan cuantificar la expresión de genes asociados al proceso apoptótico, mediante el diseño de primers específicos, para cuantificar variaciones transcripcionales en los marcadores evaluados, segundo (II) Determinar la influencia de la quercetina sobre el proceso de apoptosis en la línea celular HCT116 derivada de cáncer de colon, a través de ensayos de proliferación, con el fin de establecer su efecto en la replicación celular y tercero (III) Cuantificar cambios en la expresión de genes asociados al proceso apoptótico e inducidos por la acción de la quercetina, mediante la implementación de estrategias de PCR en tiempo real, para identificar los mecanismos apoptóticos inducidos por el flavonoide.

I. Diseño de primers

Con el fin de cuantificar la expresión de genes asociados al proceso apoptótico, se realizó el diseño de primers específicos para la amplificación de transcritos de interés. Primero, se hizo una selección de genes involucrados en la vía intrínseca de la apoptosis a través de una revisión bibliográfica. Se incluyeron genes proapoptóticos (*CASP3*, *CASP9*, *BAX*, *BAD* y *CYCS*) y antiapoptóticos (*BCL2*, *BCLXL* y *MCL1*). Después se obtuvieron las secuencias completas de cada gen desde la base de datos NCBI, y las secuencias correspondientes a sus exones se descargaron desde la base Ensembl. Estas secuencias se importaron al software Vector NTI (11.0), una herramienta bioinformática utilizada para el análisis de ácidos nucleicos y el diseño de primers [14]. En este software se realizó la anotación manual de los exones para reconstruir la organización exón-intrón de cada gen. Los primers se diseñaron de modo que cada par amplifica una región que abarca dos exones consecutivos separados por un intrón, de esta forma se minimiza la probabilidad de amplificar ADN genómico.

Para el diseño se establecieron los siguientes parámetros: longitud por primer de 18 a 22 pares de bases, temperatura de fusión (T_m) cercana a 60 °C y tamaño de amplicón entre 120 y 230 pares de bases. Adicionalmente, se procuró minimizar la formación de estructuras secundarias como

dímeros, dúplex y hairpin loops. La especificidad de los primers se evaluó usando BLASTn. Para cada gen se diseñaron tres pares de primers.

II. Fase experimental

Mantenimiento de las células en cultivo

Para los ensayos experimentales (crecimiento celular y expresión génica) se utilizó la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116. A nivel molecular esta línea se caracteriza por presentar una mutación activadora en el oncogén *KRAS* que favorece la proliferación y supervivencia celular, promoviendo la transformación oncogénica de las células [15].

La línea celular creció en medio DMEM F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico penicilina-estreptomicina (Pen-Strep) al 1%. Para la activación del cultivo se descongelaron las células previamente criopreservadas en viales de 1 mL y se sembraron en el medio adicionando 500µL de la suspensión celular en cada flask (T25) con un volumen de 4 mL de medio. Las células se incubaron a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una concentración de CO_2 del 5%. El medio de cultivo se refrescó cada 24 horas hasta alcanzar una confluencia celular aproximada del 80%.

a. Ensayos de crecimiento celular

Para los tratamientos se prepararon medios de cultivo DMEM F12 (10% SFB y 1% Pen-Strep) suplementados con quercetina a distintas concentraciones. La solución stock del flavonoide se produjo al disolver 10 mg del compuesto (masa molar 302,236 g/mol) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), alcanzando una concentración final de 33 mM. A partir de esta solución se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones finales de 0 µM, 20 µM, 50 µM y 100 µM.

Para el ensayo de proliferación las células se sembraron en placas de 6 pozos y se dejaron adherir durante 24 horas antes de aplicar los tratamientos establecidos. Para cada condición experimental (0 µM, 20 µM, 50 µM y 100 µM), como réplicas biológicas, se asignaron tres pozos por día, durante cuatro días consecutivos. En cada pozo se adicionaron 2 mL de células a una concentración de 5.0×10^4 células/mL.

Al finalizar cada día de tratamiento, las células se desprendieron por tripsinización y se contaron con el contador celular automatizado DeNovix CellDrop. Este conteo se hizo en triplicado técnico por pozo, empleando azul de tripán para la distinción entre células viables y no viables. Finalmente, para analizar el crecimiento celular de la línea HCT116 en función del tiempo y de la exposición a las distintas concentraciones de quercetina, se calculó el valor promedio (3 réplicas técnicas) de células totales por cada pozo sembrado (3 réplicas biológicas) y los valores obtenidos se representaron en curvas de crecimiento.

b. Expresión génica

Para el ensayo de expresión génica, se siguió el mismo protocolo de siembra y seguimiento descrito en el punto anterior.

Una vez finalizado cada día de exposición a la quercetina, el medio de cultivo fue aspirado y los pozos se lavaron con solución tampón fosfato (PBS). Posteriormente se adiciono buffer de lisis y se desprendieron las células usando un raspador celular. Las células fueron lisadas pasando el contenido celular varias veces a través de jeringas estériles acopladas a agujas de insulina. El lisado celular se almacenó en viales a -80 °C hasta su procesamiento.

A partir de los lisados celulares se realizó la extracción de ARN total utilizando el kit comercial de extracción Spectrum™ Plant Total RNA kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN extraído se evaluó mediante cuantificación espectrofotométrica en el NanoDrop 2000 de Thermo Fisher.

Posteriormente, a partir de 1 µg de ARN, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit ReadyScript cDNA Synthesis Mix de Sigma-Aldrich, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en un termociclador Bio-Rad bajo el siguiente programa: anillamiento de primers a 25 °C durante 5 minutos, retrotranscripción a 42 °C durante 30 minutos, denaturación a 85 °C durante 5 minutos y mantenimiento final a 4 °C.

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), empleando un sistema de detección basado en SYBR Green. Para cada reacción se utilizaron 5 µL de ADNc a una concentración de 5 ng/µL, primers forward y reverse a una concentración final de 4.2 µM y 5 µL del mix de amplificación, que contiene ADN polimerasa, dNTPs, buffer de reacción y el fluoróforo SYBR Green, para un volumen final de 15 µL por reacción.

La amplificación se realizó en el equipo QuantStudio 5 Real-Time PCR System de Thermo Fisher Scientific, utilizando el siguiente programa de amplificación: etapa inicial de mantenimiento 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 min. Posteriormente, 40 ciclos de amplificación compuesta por, denaturación a 95°C durante 15 segundos, anillamiento de primers a 64°C por 20 segundos y extensión del amplicón a 72°C por 25 segundos. Al finalizar la amplificación, se obtuvo una curva de denaturación que permite determinar la temperatura específica a la cual disminuye la fluorescencia y verificar la presencia de un único producto de amplificación en cada reacción.

Los niveles relativos de expresión génica se determinaron a partir de los valores de Ct obtenidos para cada gen de interés y se compararon con el Ct del gen normalizador *TBP/UBQ* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Resultados

I. Primers

A partir del diseño de primers para los genes definidos en este estudio, se obtuvieron un total de 20 pares que cumplieron con los parámetros establecidos de longitud, temperatura de fusión,

tamaño de amplicón, y formación limitada de estructuras secundarias. Las secuencias de los primers seleccionados y el tamaño de amplicón y temperatura de anillamiento para cada par se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los primers forward y reverse diseñados para ocho genes asociados al proceso apoptótico, junto con el tamaño del amplicón y temperatura de anillamiento correspondiente a cada par de primers.

Gen	Forward	Reverse	Amplicón (pb)	Ta (°C)
<i>BAD</i>	5' TCACCAGCAGGAGCAGCC 3'	5' CTCCCCCATCCCTTCGTC 3'	116	66.10
<i>BAX</i>	5' CCGAGAGGTCTTTTCCGAG 3'	5' GAAGTCCAATGTCCAGCCCA 3'	164	62.45
<i>BCLXL</i>	5' GCCACTTACCTGAATGACCACC 3'	5' GAGCCCAGCAGAACCACG 3'	171	64.05
<i>BCL2</i>	5' AGGGACGGGGTGAAGTGG 3'	5' GCCAGGAGAAATCAAACAGAGG 3'	227	64.45
<i>CASP3</i>	5' AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC 3'	5' ACAAGAAGTCGGCCTCCAC 3'	152	62.05
<i>CASP9</i>	5' ATCTAGTTTGCCACACCCAG 3'	5' CTGCTCAAAGATGTCGTCCA 3'	122	60.95
<i>CYCS</i>	5' ATGGTCTCTTTGGGCGGA 3'	5' CTGCCCTTCTCCTTCTTCT 3'	178	61.15
<i>MCL1</i>	5' CCTTACGACGGGTGGGG 3'	5' TGCCCCAGTTGTACGCC 3'	151	64.60
<i>TP53</i>	5' ATGACGGAGTTGTGAGGC 3'	5' CGGCTCATAGGGCACCAC 3'	158	63.60

Adicionalmente, se evaluó la presencia de estructuras secundarias potenciales en los primers seleccionados, incluyendo hairpin loops, dímeros y dúplex entre primers forward y reverse. La distribución de estas estructuras se presentan en la Figura 1.

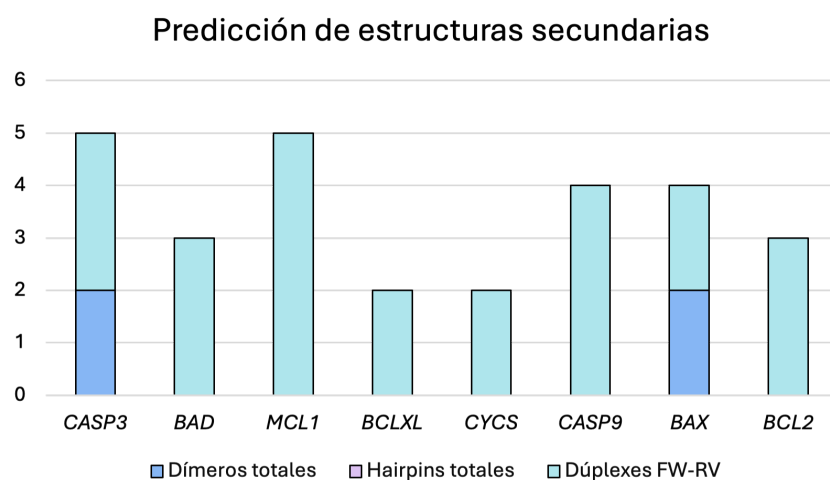


Figura 1. Predicción y distribución de dímeros y dúplexes en los primers diseñados asociados al proceso de apoptosis.

No se identificaron hairpin loops en ninguno de los primers evaluados. La mayoría de los pares no presentó dímeros, excepto *CASP3* y *BAX*. En cuanto a los dúplex entre primers forward y reverse, todos los pares mostraron tendencia a formar al menos dos interacciones.

II. Crecimiento celular

Con el fin de evaluar el efecto de la quercetina sobre el crecimiento celular de la línea HCT116, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del flavonoide durante cuatro días. El

conteo celular permitió observar variaciones en el crecimiento de las células en función del tiempo de exposición y de la concentración evaluada.

Como se observa en la Figura 2, todas las condiciones presentaron conteos celulares similares durante el primer día de tratamiento. A partir del segundo día se evidenciaron diferencias en el comportamiento de las curvas de crecimiento. En el día 2, los tratamientos con quercetina presentaron valores promedio inferiores al control. En el día 3, la concentración de 50 μM mostró los valores más altos de conteo celular, mientras que en el día cuatro, se observó una disminución en las condiciones de 50 μM y 100 μM con respecto al control. En contraste, la condición de 20 μM presentó un incremento marcado de número de células en el día 4.

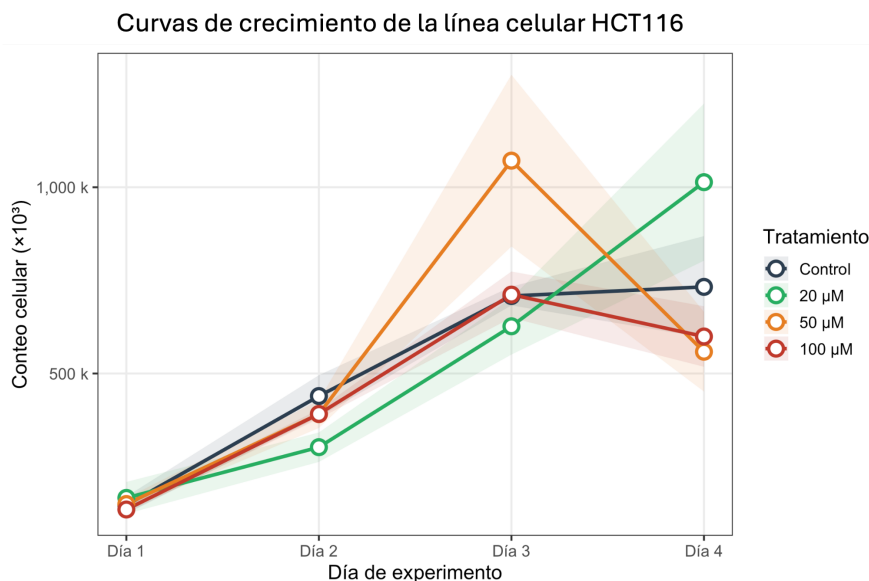


Figura 2. Curvas de crecimiento celular de la línea HCT116 expuesta a diferentes concentraciones de quercetina durante cuatro días de tratamiento. Los puntos representan la media del conteo celular y el sombreado corresponde a la desviación estándar de tres réplicas biológicas

Para determinar si las diferencias observadas están asociadas al tratamiento con quercetina, tiempo de exposición o la interacción entre ambos factores, se realizó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) que se presenta en la Tabla 2. El análisis mostró que el efecto del tratamiento no fue estadísticamente significativo ($F = 1.6423$; $p = 0.1991$). A diferencia de esto, el efecto del día fue significativo ($F = 111.1339$; $p < 0.0001$), lo que evidencia cambios en la proliferación celular durante el periodo experimental. Asimismo, la interacción tratamiento x día fue significativa ($F = 8.3447$; $p < 0.0001$), indicando que el efecto de las concentraciones de quercetina sobre el crecimiento celular depende del día de exposición.

Tabla 2. Análisis de varianza bifactorial para el crecimiento celular de HCT116 en función de la concentración de quercetina y el tiempo de exposición

Factor	gl	F	p-valor	η^2 parcial	Interpretación
Tratamiento	3	1.6423	0.1991	0.1334	No significativo
Día	3	111.1339	<0.0001	0.9124	Significativo
Tratamiento $\times$ Día	9	8.3447	<0.0001	0.7012	Significativo
Residuos	32	—	—	—	Variabilidad residual

Debido a que la interacción tratamiento x día fue significativa, se realizaron comparaciones post-hoc entre cada concentración de quercetina y el control dentro de cada día. Este análisis (Tabla 3) mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control durante los días 1 y 2. En el día 3, la concentración de 50 μ M presentó valores significativamente mayores que el control, con una diferencia de medias de 363333 células/mL (p ajustado = 0.0002). En el día 4, la concentración de 20 μ M también presentó un conteo significativamente mayor que el control, con una diferencia de medias de 281111 células/mL (p ajustado = 0.0038). Las concentraciones de 50 μ M y 100 μ M mostraron valores promedio inferiores al control en el día 4, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 3. Comparaciones post-hoc entre tratamientos con quercetina y control por día de exposición

Día	Comparación	Diferencia de medias	p ajustado	Interpretación
1	20 μ M - Control	19,444.44	0.9763	No significativo
1	50 μ M - Control	3,000.00	0.9995	No significativo
1	100 μ M - Control	-11,666.67	0.9917	No significativo
2	20 μ M - Control	-137,222.22	0.2296	No significativo
2	50 μ M - Control	-48,444.44	0.8478	No significativo
2	100 μ M - Control	-48,111.11	0.8499	No significativo
3	20 μ M - Control	-81,333.33	0.6076	No significativo
3	50 μ M - Control	363,333.33	0.0002	Significativo
3	100 μ M - Control	3,666.67	0.9992	No significativo
4	20 μ M - Control	281,111.11	0.0038	Significativo
4	50 μ M - Control	-174,111.11	0.0956	No significativo
4	100 μ M - Control	-133,222.22	0.25	No significativo

III. Expresión génica

Teniendo en cuenta las variaciones observadas en el ensayo de crecimiento celular a las 96 horas, la evaluación de la expresión génica se enfocó en este tiempo de exposición y en la concentración más alta de quercetina. Para esta fase se seleccionaron los genes *BAD*, *CASP3*, *TP53*, *BCLXL*, y *BCL2* teniendo en cuenta su participación en la vía apoptótica mitocondrial y el desempeño de los primers durante la RT-qPCR. La comparación se realizó entre el control y tratamiento con 100 μ M de quercetina, y los resultados se expresaron como Log2 Fold Change normalizado con los genes de referencia *TBP* y *UBQ*.

Los cambios en la expresión relativa de los genes evaluados se presentan en la Figura 3.

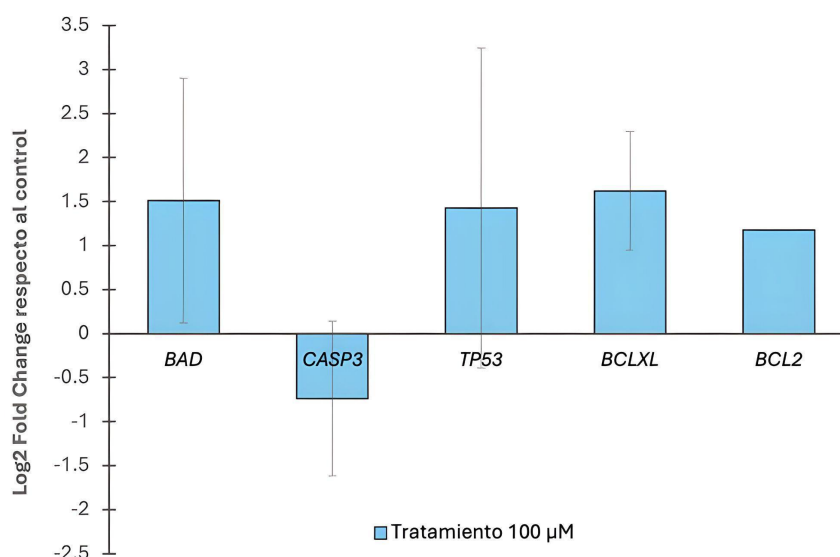


Figura 3. Cambio relativo en la expresión de *BAD*, *CASP3*, *TP53*, *BCLXL*, y *BCL2* en células de adenocarcinoma de colon HCT116 tratadas con 100 μ M de quercetina durante 96 horas. Los valores se expresan como Log2 Fold Change respecto al control y fueron normalizados con *TBP* y *UBQ*. La línea en 0 corresponde al valor de referencia del control; valores positivos indican aumento de expresión y valores negativo indican disminución.

Como se observa en la Figura 3, la expresión relativa de los genes evaluados se modificó tras la exposición a quercetina a 100 μ M durante 96 horas. Entre los genes asociados a señales proapoptóticas, *BAD* y *TP53* mostraron niveles transcripcionales elevados con un incremento de 2.85 y 2.69 veces de cambio, respectivamente; por el contrario, *CASP3* presentó una menor expresión en las células tratadas, con un valor relativo de 0.60. En cuanto a los genes antiapoptóticos, *BCLXL* y *BCL2* también aumentaron, registrando valores de fold-change de 3.07 y 2.26 frente al control.

Discusión

El diseño de primers constituyó una etapa fundamental para el análisis de expresión génica, pues permitió seleccionar pares dirigidos a genes apoptóticos de la vía mitocondrial. Este diseño se realizó considerando los siguientes criterios: longitud, temperatura de fusión, tamaño de amplicón, contenido de GC, especificidad, baja formación de estructuras secundarias y selección de regiones que favorecieran la amplificación ADNc sobre ADN genómico. Sin embargo, el cumplimiento de estos parámetros no garantiza por sí solos un desempeño óptimo en RT-qPCR. La eficiencia de cada par de primers también depende de variables experimentales como las condiciones de reacción, la calidad del ARN y la síntesis de ADNc.

En este sentido, la implementación de RT-qPCR evidenció que no todos los pares de primers diseñados presentaron un desempeño óptimo bajo las condiciones iniciales de amplificación. Algunos genes mostraron productos de amplificación específicos, mientras que otros presentaron amplificación inespecífica y requirieron ajustes del programa de PCR para mejorar la especificidad. Esto concuerda con las recomendaciones de MIQE 2.0 (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), donde indican que el diseño de primers debe complementarse con una fase de optimización experimental. Esta permite ajustar

condiciones como la temperatura de anillamiento, la cual influye en la unión específica de los primers a la secuencia blanco, y verificar que cada par amplifique de forma específica y eficiente antes de su uso en el análisis de expresión génica [16].

En relación con el ensayo de crecimiento celular, los resultados obtenidos evidencian que la quercetina no generó una disminución significativa del crecimiento de HCT116 al considerar el efecto general de las concentraciones evaluadas. Aunque se observaron variaciones en el conteo celular entre concentraciones y días de exposición, estas no siguieron una tendencia constante ni un patrón dosis-respuesta definido. De hecho, las comparaciones post-hoc mostraron que las diferencias significativas frente al control correspondieron a aumentos puntuales del conteo celular, y no a una reducción del crecimiento. Por lo tanto, más que una inhibición sostenida de la proliferación celular, los resultados sugieren una respuesta variable dependiente de la combinación entre concentración y tiempo de exposición.

Esta respuesta variable no necesariamente indica ausencia de efecto biológico, sino que puede reflejar la complejidad de la acción de la quercetina sobre la línea celular. En estudios previos se ha reportado que su efecto sobre la proliferación no siempre sigue una relación lineal con la concentración. Van der Woude *et al.* evaluaron la acción de la quercetina en las líneas de carcinoma de colon HCT116 y HT29, y describieron una respuesta bifásica de la proliferación celular. En su estudio, las concentraciones bajas produjeron una estimulación leve pero significativa del crecimiento, mientras que concentraciones más altas redujeron la proliferación [17]. De manera más reciente, se ha reportado un comportamiento similar en modelos *in vitro* 2D y 3D de melanoma humano. Aunque se trata de un modelo tumoral diferente al empleado en este trabajo, sus resultados respaldan que la acción de la quercetina puede depender de la concentración y tiempo de exposición. En dicho estudio, concentraciones bajas de quercetina aumentaron la viabilidad, el tamaño de los esféroides y la proliferación celular, mientras que concentraciones mayores a 12.5 μM redujeron estos parámetros. Además, los autores observaron que la concentración de 1 μM disminuyó la generación de ROS, mientras que 50 μM la aumentó, lo cual concuerda con la respuesta bifásica por quercetina propuesta anteriormente [18].

Bajo este contexto, el balance oxidativo celular resulta clave para interpretar las diferencias observadas entre concentraciones. Vargas y Burd señalan que la actividad de la quercetina puede variar según la dosis: en concentraciones bajas predomina su efecto antioxidante, mientras que concentraciones entre 40 y 100 μM puede favorecer una actividad prooxidante [19]. En este sentido, el incremento significativo registrado en el tratamiento con 20 μM durante el día 4 podría relacionarse con una concentración en la que no necesariamente se esperaría un efecto citotóxico. En cambio, aunque los tratamientos de 50 y 100 μM no mostraron una reducción estadísticamente significativa frente al control en el día 4, la disminución del conteo respecto al día anterior resulta consistente con el rango de actividad prooxidante descrito para estas concentraciones.

De forma complementaria, Ferraresi *et al.* evaluaron el efecto de la quercetina sobre las reacciones redox en la línea celular U937 y observaron que, en tiempos cortos de exposición, los niveles de H_2O_2 disminuyeron, evidenciando un efecto antioxidante inicial [10]. Los autores explican que, cuando el flavonoide reacciona con especies reactivas de oxígeno, puede formar productos de oxidación que son neutralizados principalmente por el glutatión reducido (GSH).

Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de exposición, las reservas de GSH disminuyen, reduciendo la capacidad antioxidante de la célula y permitiendo que predomine un efecto prooxidante por la quercetina. Este cambio se asoció con alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial y con la inducción de apoptosis [10]. Por lo tanto, aunque en este trabajo no se evidenció una reducción significativa del crecimiento celular, el comportamiento observado podría estar relacionado con una respuesta dependiente del tiempo, en la que el efecto de la quercetina varía según el estado oxidativo de las células.

Con el fin de explorar si la respuesta observada se acompaña de cambios moleculares asociados a apoptosis, se evaluó la expresión de genes relacionados con la vía apoptótica mitocondrial. Los resultados mostraron una respuesta molecular mixta, caracterizada por el aumento relativo de *BAD*, *TP53*, *BCLXL* y *BCL2*, y la disminución de *CASP3* tras el tratamiento con 100 μ M de quercetina. Este comportamiento difiere parcialmente de lo descrito en otros estudios, en los que la quercetina se ha asociado con activación de caspasas y disminución de proteínas antiapoptóticas [12].

La interpretación de estos resultados no debe limitarse únicamente al efecto de la quercetina sobre la transcripción de los genes evaluados, sino que también debe considerar las características del modelo *in vitro* empleado. En este trabajo se utilizó la línea HCT116, una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano con morfología epitelial, que ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudiar respuestas asociadas a estrés celular, ciclo celular y apoptosis [15]. Particularmente, se ha reportado que las células HCT116 conservan la proteína p53 funcional y pueden responder a estímulos de estrés mediante la estabilización de p53 y la activación de genes blanco como, *CDKN1A*, *MDM2* y *PUMA*, involucrados en arresto del ciclo celular, regulación de la vía p53 y apoptosis [20]. Por lo tanto, el aumento relativo de *TP53* observado podría interpretarse como parte de una respuesta celular al estrés inducido por el tratamiento, posiblemente asociada al efecto prooxidante descrito para concentraciones altas de este flavonoide. Sin embargo, esta respuesta no implica necesariamente una activación completa de apoptosis, ya que p53 puede inducir distintas respuestas celulares dependiente de la intensidad del estímulo externo y el tiempo de exposición a este [20].

El aumento relativo de *BAD* sugiere la activación de una señal proapoptótica inicial, su efecto sobre la vía mitocondrial depende del balance con proteínas antiapoptóticas de la familia BCL2. Esta familia está conformada por proteínas con funciones opuestas, incluyendo miembros antiapoptóticos como BCL2 y BCLXL, y proteínas proapoptóticas tipo BH3-only como BAD [21]. A diferencia de BAX y BAK (proapoptóticas), que actúan como efectores directos de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, BAD no induce apoptosis de forma directa, sino que funciona como una proteína sensibilizadora. Su acción consiste en unirse mediante su dominio BH3 a las proteínas antiapoptóticas BCL2 y BCLXL, neutralizando su efecto inhibitorio y facilitando la activación posterior de BAX/BAK por proteínas BH3-only activadoras [22].

En este sentido, el aumento simultáneo de *BCL2* y *BCLXL* observado en este trabajo puede reflejar una respuesta orientada a la supervivencia celular frente al estrés inducido por el tratamiento. Estas proteínas pueden interferir con la progresión de muerte celular programada por la vía intrínseca al limitar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, la liberación de citocromo c y posteriormente la activación de caspasas [21]. Esto resulta coherente con la

disminución relativa de *CASP3*, pues no hubo una inducción transcripcional evidente de esta caspasa ejecutora. En conjunto, estos resultados apuntan que la quercetina a 100 μ M generó una respuesta mixta, en la que el aumento de *TP53* y *BAD* podría reflejar señales iniciales de estrés celular y regulación proapoptótica, mientras que el incremento de *BCL2* y *BCLXL*, junto con la disminución de *CASP3*, sugiere la activación paralela de mecanismos antiapoptóticos o de supervivencia celular, más que una inducción apoptótica definida.

Aunque en este trabajo no se observó un patrón transcripcional proapoptótico, un estudio en células HCT116 reportó la inducción de apoptosis por quercetina a partir de concentraciones mayores a 100 μ M, a través de una evaluación más amplia, que integró ensayos de viabilidad, tinción con Anexina V-FITC/PI, análisis transcriptómico y bioinformático y validación por qRT-PCR [23]. Esta estrategia permitió una caracterización más integral de la respuesta apoptótica. Por lo tanto, los cambios observados en *TP53*, *BAD*, *BCL2*, *BCLXL* y *CASP3* para una concentración y un día específico, constituyen una aproximación dirigida de la vía apoptótica mitocondrial, pero no representan por sí solos evidencia suficiente de una inducción apoptótica definida.

De manera adicional, estos resultados pueden contrastarse con el modelo *in silico* desarrollado por Bravo y colaboradores, en el cual se evaluó el efecto de la quercetina sobre los procesos biológicos del ciclo celular y la apoptosis en una célula tumoral [24]. En dicha simulación, el aumento en la concentración del flavonoide se asoció con incremento de p53 y BAX, disminución de BCL2 y BCLXL, y liberación de citocromo c y la activación de caspasas ejecutoras [24]. En el presente trabajo, el aumento relativo de *TP53* y *BAD* coincide parcialmente con esa tendencia, sin embargo, el incremento de *BCL2* y *BCLXL*, junto con la disminución de *CASP3*, no reproducen completamente lo predicho por el modelo. Esta diferencia puede explicarse porque la simulación evalúa la vía apoptótica bajo condiciones completamente definidas, mientras que en el modelo *in vitro* la respuesta celular está influenciada por factores propios del cultivo celular y por la activación de mecanismos de supervivencia.

Conclusión

En este estudio se evidencio que la exposición de células HCT116 a quercetina no produjo una inhibición significativa del crecimiento celular ni confirmó una inducción apoptótica clara bajo las condiciones evaluadas. No obstante, el flavonoide sí generó cambios en la expresión de genes asociados a la vía apoptótica mitocondrial, indicando que las células respondieron molecularmente al tratamiento. En particular, el aumento de *BAD* y *TP53* sugiere la activación inicial de señales asociadas a estrés celular y regulación proapoptótica, sin embargo, el incremento simultáneo de *BCL2* y *BCLXL*, junto con la disminución de *CASP3*, señalan que esta respuesta no progresa hacia una activación completa de apoptosis. Estos resultados aportan a la comprensión del efecto de la quercetina en cáncer colorrectal, al resaltar que su acción no debe interpretarse únicamente como una inducción directa de apoptosis, sino como una respuesta dependiente del contexto experimental y del estado molecular del modelo celular. Desde esta perspectiva, la quercetina continúa siendo un compuesto de interés por su potencial modulador sobre procesos asociados a proliferación y muerte celular. No obstante, su estudio requiere aproximaciones experimentales más integrales que incluyan pruebas directas de apoptosis y el análisis más amplio de genes relacionados con apoptosis y supervivencia.

Recomendaciones

Este trabajo combinó ensayos celulares, diseño bioinformático de primers y cuantificación de expresión génica mediante RT-qPCR, lo cual permitió evaluar la respuesta de células HCT116 frente a quercetina desde el crecimiento celular y la expresión génica, pero también mostró aspectos metodológicos que podrían fortalecerse en estudios posteriores. Para futuros análisis, se recomienda incluir una fase previa de optimización experimental de los primers antes de la cuantificación definitiva por RT-qPCR, ajustando la temperatura de anillamiento y verificando la especificidad de los productos amplificados. Esto permitiría seleccionar los pares de primers más adecuados y reducir la amplificación inespecífica.

También, sería pertinente evaluar la expresión génica en las diferentes concentraciones de quercetina y tiempos de exposición utilizados en el ensayo de crecimiento celular. De esta forma, se podría establecer si los cambios transcripcionales asociados al tratamiento varían según la dosis y el tiempo, y relacionar de forma más directa la respuesta molecular con el comportamiento observado en las curvas de crecimiento.

Por último, aunque la RT-qPCR permite identificar cambios en la expresión de genes asociados a apoptosis, pero no confirma por sí sola que este proceso se active funcionalmente, se recomienda complementar con pruebas directas de apoptosis, como Anexina V-FITC/PI. Así se lograría determinar con mayor claridad si la respuesta molecular inducida por quercetina se traduce en muerte celular programada.

Agradecimientos

Agradezco a mi director de trabajo de grado, Mauricio Quimbaya, Ph.D., por su orientación durante el desarrollo de este proyecto y por las enseñanzas brindadas a lo largo de mi formación académica. A mi codirectora Diana Clavijo, Ph.D., por su acompañamiento en este proceso.

Extiendo mi agradecimiento a la Universidad ICESI y al Programa de Biología de la Pontificia Universidad Javeriana Cali por brindar los espacios que hicieron posible el desarrollo de gran parte de la metodología de este estudio. De igual forma, a Cristopher Valencia por su apoyo durante el trabajo experimental y a mi compañera Natalia Cruz por el trabajo compartido a lo largo del proyecto.

Referencias bibliográficas

- [1] Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and prevention. *Cancers (Basel)*. 2024;16(8):1530. doi:10.3390/cancers16081530
- [2] Soveri LM, Lamminmäki A, Hänninen UA, Karhunen M, Bono P, Osterlund P. Long-term neuropathy and quality of life in colorectal cancer patients treated with oxaliplatin containing adjuvant chemotherapy. *Acta Oncol*. 2019;58(4):398-406. doi:10.1080/0284186X.2018.1556804
- [3] Zhang L, Yu J. Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2013;9:331-340. doi:10.1007/s11888-013-0188-z

- [4] Singh SR, Bhaskar R, Ghosh S, Yarlagadda B, Singh KK, Verma P, *et al.* Exploring the genetic orchestra of cancer: the interplay between oncogenes and tumor-suppressor genes. *Cancers (Basel)*. 2025;17(7):1082. doi:10.3390/cancers17071082
- [5] Sharma A, Boise LH, Shanmugam M. Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1144. doi:10.3390/cancers11081144
- [6] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [7] Shinji S, Yamada T, Matsuda A, Sonoda H, Ohta R, Iwai T, *et al.* Recent advances in the treatment of colorectal cancer: a review. *J Nippon Med Sch*. 2022;89(3):246-254. doi:10.1272/jnms.JNMS.2022_89-310
- [8] Biller LH, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *JAMA*. 2021;325(7):669-685. doi:10.1001/jama.2021.0106
- [9] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett*. 2008;269(2):315-325. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.046
- [10] Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Lugli E, Nemes E, Nasi M, *et al.* Essential requirement of reduced glutathione for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radic Res*. 2005;39(11):1249-1258. doi:10.1080/10715760500306935
- [11] Darband SG, Kaviani M, Yousefi B, Sadighparvar S, Pakdel FG, Attari JA, *et al.* Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6544-6560. doi:10.1002/jcp.26588
- [12] Neamtu AA, Maghiar TA, Alaya A, Olah NK, Turcus V, Pelea D, *et al.* A comprehensive view on the quercetin impact on colorectal cancer. *Molecules*. 2022;27(6):1873. doi:10.3390/molecules27061873
- [13] Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements: quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin. *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1450-1456. doi:10.1093/carcin/bgi089
- [14] Lu G, Moriyama EN. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*. 2004;5(4):378-388. doi:10.1093/bib/5.4.378
- [15] CLS Cell Lines Service GmbH. Línea celular HCT116: una guía completa para la investigación del cáncer colorrectal [Internet]. Cytion; 2026. Disponible en: <https://www.cytion.com/es/Acerca-de-Cytion/Centro-de-conocimiento/Analisis-en-profundidad-de-lineas-celulares/Linea-celular-HCT116-Una-guia-completa-para-la-investigacion-del-cancer-colorrectal/>
- [16] Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, *et al.* MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clin Chem*. 2025;71(6):634-651. doi:10.1093/clinchem/hvaf043

- [17] van der Woude H, Gliszczyńska-Świgło A, Struijs K, Smeets A, Alink GM, Rietjens IMCM. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.* 2003;200(1):41-47. doi:10.1016/S0304-3835(03)00412-9
- [18] Hundsberger H, Stierschneider A, Sarne V, Ripper D, Schimon J, Weitzenböck HP, *et al.* Concentration-dependent pro- and antitumor activities of quercetin in human melanoma spheroids: comparative analysis of 2D and 3D cell culture models. *Molecules.* 2021;26(3):717. doi:10.3390/molecules26030717
- [19] Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev.* 2010;68(7):418-428. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x
- [20] Kaeser MD, Pebernard S, Iggo RD. Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2004;279(9):7598-7605. doi:10.1074/jbc.M311732200
- [21] Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol.* 2022;12:985363. doi:10.3389/fonc.2022.985363
- [22] Huang K, O'Neill KL, Li J, Zhou W, Han N, Pang X, *et al.* BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. *Cell Res.* 2019;29(11):942-952. doi:10.1038/s41422-019-0231-y
- [23] Zhang Z, Li B, Xu P, Yang B. Integrated whole transcriptome profiling and bioinformatics analysis for revealing regulatory pathways associated with quercetin-induced apoptosis in HCT-116 cells. *Front Pharmacol.* 2019;10:798. doi:10.3389/fphar.2019.00798
- [24] Bravo VA, Clavijo DC, Quimbaya MA. Identificación del efecto del flavonoide quercetina en los procesos biológicos del ciclo celular y la apoptosis a través del modelamiento de la red biológica de una célula tumoral [tesis de pregrado]. Cali: Pontificia Universidad Javeriana Cali; 2024. Disponible en: <https://vitela.javerianacali.edu.co/handle/11522/1>