



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DE LAS ISOFLAVONAS DE SOYA
(*Glycine max*) SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS
TUMORALES MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 Y HeLa**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

PRESENTA
DIANA JIMÉNEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORAS:
**D.C. MAURA CÁRDENAS GARCÍA
D.C. GUADALUPE HERNÁNDEZ LINARES
M.C. MARCELA LUCÍA GUERRERO AFRICANI**

PUEBLA, PUE 2020

ÍNDICE

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Glosario	8
4. Antecedentes	10
4.1. Antecedentes generales	10
4.1.1 Cáncer	10
4.1.2 Cáncer de mama	15
4.1.3 Cáncer de colon	19
4.1.4 Cáncer cervicouterino	22
4.1.5 Importancia de las líneas celulares en la investigación en cáncer	25
4.1.6 Soya	26
4.2. Antecedentes específicos	29
4.2.1 Fitoestrógenos	29
4.2.2 Compuestos fenólicos	29
4.2.3 Flavonoides	31
4.2.4 Isoflavonas de soya	31
4.2.5 Genisteína	36
4.2.6 Daidzeína	37
4.2.7 Gliciteína	37
5. Planteamiento del problema	39
6. Objetivos	41
6.1 General	41

6.2 Específicos -----	41
7. Material y métodos -----	42
8. Resultados -----	56
9. Discusión -----	67
10. Conclusiones -----	76
11. Perspectivas a futuro -----	77
12. Referencias -----	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso del desarrollo del cáncer -----	10
Figura 2. Tendencia de la mortalidad de cáncer a nivel mundial -----	13
Figura 3. Estadísticas de los principales tipos de cáncer en México de 2011 a 2016 -----	14
Figura 4. Anatomía general de la glándula mamaria -----	15
Figura 5. Expresión de los receptores para las hormonas en la glándula mamaria -----	16
Figura 6. Anatomía general del colon -----	19
Figura 7. Representación de un pólipo -----	19
Figura 8. Receptores para estrógenos presentes en el epitelio colónico -----	21
Figura 9. Anatomía del aparato reproductor femenino -----	22
Figura 10. Proceso del desarrollo del de cáncer cervicouterino -----	23
Figura 11. Clasificación de los compuestos fenólicos contenidos en diferentes alimentos	29
Figura 12. Similitud estructural de los estrógenos e isoflavonas de soya -----	31
Figura 13. Receptores alfa y beta para estrógenos-----	32
Figura 14. Metabolismo de las isoflavonas -----	34
Figura 15. Equipo de Extracción Asistida por Microondas -----	42
Figura 16. Reacción redox de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteau -----	43
Figura 17. Estándares de genisteína y daidzeína -----	44
Figura 18. Cromatografía en capa fina TLC -----	45
Figura 19. Determinación del Rf -----	46
Figura 20. Espectrofotometría UV/Vis -----	46
Figura 21. Equipo de espectrofotometría UV/Vis -----	47
Figura 22. Adición de isoflavonas de soya y metanol a caja de pozos -----	48
Figura 23. Adición de DPPH a caja de pozos -----	49
Figura 24. Determinación de la capacidad antioxidante-----	49
Figura 25. Cultivos celulares -----	50
Figura 26. Líneas celulares -----	51
Figura 27. Conteo celular -----	52
Figura 28. Reacción química del reactivo XTT -----	53

Figura 29. Concentraciones de isoflavonas sobre las líneas celulares -----	53
Figura 30. Cromatografía en capa fina -----	56
Figura 31. Espectrofotometría UV/Vis -----	57
Figura 32. Espectrofotometría UV/Vis del producto de la digestión simulada -----	58
Figura 33. Capacidad antioxidante de las isoflavonas de soya -----	58
Figura 34. Efecto antiproliferativo en la línea tumoral MCF-7 en presencia de isoflavonas de soya -----	59
Figura 35. Efecto antiproliferativo en la línea tumoral MDA-MB-231 en presencia de isoflavonas de soya -----	60
Figura 36. Relación del efecto antiproliferativo de MCF-7 y MDA-MB-231 -----	63
Figura 36. Efecto antiproliferativo en la línea tumoral HCT-15 en presencia de isoflavonas de soya -----	64
Figura 37. Efecto antiproliferativo en la línea tumoral HeLa en presencia de isoflavonas de soya -----	65
Figura 38. Esquema de las posibles vías de señalización de las isoflavonas de soya en la disminución de la proliferación celular -----	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de cáncer -----	11
Tabla 2. Contenido de isoflavonas en diferentes derivados -----	25
Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos en algunas legumbres -----	26
Tabla 4. Composición nutrimental de la soya -----	27
Tabla 5. Isoflavonas de soya en su forma glicona y aglicona -----	32
Tabla 6. Tipo de estudio -----	39
Tabla 7. Definición de variables y escalas de medición -----	41
Tabla 8. Composición de los fluidos de la digestión simulada -----	42
Tabla 9. Capacidad antioxidante de las isoflavonas de soya sobre el radical libre DPPH- -----	60
Tabla 10. Desviaciones estándar de MCF-7 -----	61
Tabla 11. Desviaciones estándar de MDA-MB-231 -----	62
Tabla 12. Desviaciones estándar de HCT-15 -----	64
Tabla 13. Resultados de prueba estadística de HeLa -----	65
Tabla 14. Efecto de isoflavonas sobre líneas celulares tumorales -----	74

1. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de las isoflavonas de soya presentes en un nutracéutico, sobre el crecimiento de las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, HCT-15 de cáncer de colon y HeLa de cáncer cervicouterino.

Se emplearon dos lotes de un nutracéutico comercial de isoflavonas de soya, la presentación del nutracéutico es en cápsulas de las cuales únicamente se empleó el polvo. El polvo fue sometido a una digestión simulada, posteriormente se determinó la presencia de las isoflavonas, mediante la cuantificación de compuestos fenólicos totales, cromatografía en capa fina, espectrofotometría UV/Vis y su actividad biológica se determinó mediante la cuantificación de su capacidad antioxidante.

Posteriormente, se sembraron 5, 000 células por pozo en cajas de 96 pozos, de cada una de las líneas celulares tumorales en el medio de cultivo correspondiente; posteriormente, se adicionaron concentraciones crecientes de isoflavonas de soya como compuestos fenólicos totales de 20 a 220 μM y se incubaron por 24 horas. Finalmente empleando el reactivo XTT se determinó el efecto antiproliferativo y la dosis letal media sobre las líneas tumorales MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 y HeLa.

Los resultados obtenidos mostraron que las isoflavonas de soya mantuvieron su integridad y funcionalidad, después de una digestión simulada.

En las cuatro líneas celulares, se observó una disminución en la proliferación celular, encontrando en cada caso una dosis letal media, para MCF-7 de 100 μM , para MDA-MB-231 fue de 140 μM , HCT-15 de 130 μM y para HeLa de 160 μM .

Estos resultados muestran que las isoflavonas de soya contenidas en un nutracéutico mantuvieron su actividad, aún después de ser sometidas a un proceso de digestión simulada y disminuyeron la proliferación de células de líneas tumorales de cáncer, inclusive en la línea celular MDA-MB-231 que no expresa receptores para estrógenos, lo cual indica que las isoflavonas de soya actúan en esta línea celular mediante un mecanismo de acción diferente al de la unión a los receptores estrogénicos.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, presenta una alta tasa de morbilidad e incidencia, afectando tanto a países desarrollados como a países en vías de desarrollo ⁽¹⁾.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un proceso de crecimiento celular continuo e incontrolado, que se genera en cualquier tejido y puede ser invasivo a otros. La OMS reportó que el cáncer ocasionó en el año 2015, 8.8 millones de defunciones y en 2018 aumentó a 9 millones 500 mil defunciones, destacando en ese año principalmente: cáncer pulmonar con 169, 000 personas, cáncer hepático con 788, 000 personas, cáncer colorrectal con 774, 000 personas, cáncer gástrico con 754, 000 personas y cáncer de mama con 571, 000 personas; si la tasa de mortalidad continúa con la misma tendencia, se espera que para el 2040 aumente el número de muertes en un 60% ⁽³⁾.

Durante 2016, en México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), reportó que las principales causas de muerte por cáncer en la población adulta mexicana de 30 a 59 años se deben a tumores digestivos, órganos genitales, tumores de mama, tumores hematopoyéticos y respiratorios. En la población de 30 a 59 años, 3 de cada 10 muertes se deben a cánceres digestivos, para la población de 60 años y más, 4 de cada 10 defunciones se presentan en mujeres y 3 de cada 10 se presentan en hombres ⁽³⁾.

Desde hace casi 70 años, con el descubrimiento de la primera línea tumoral inmortal HeLa, las líneas celulares se han empleado en la investigación en cáncer y han contribuido y generado grandes avances en esta área. Por esta razón y de acuerdo con las estadísticas en México y en el mundo, en esta investigación se emplearon líneas tumorales de cáncer de mama, de colon y cervicouterino.

La soya es un alimento que forma parte de la dieta asiática, sin embargo, en los últimos años su uso se ha extendido a todo el mundo, por su alto contenido proteico y sus fitoestrógenos, ya que se recomienda su uso durante la menopausia, las isoflavonas son los principales fitoestrógenos, destacando en la soya: genisteína, daidzeína y gliciteína. La estructura química de las isoflavonas es similar al 17- β -estradiol, por lo que las isoflavonas tienen afinidad a los receptores para estrógenos a los que se une éste estrógeno femenino endógeno.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de las isoflavonas de soya presentes en un nutracéutico comercial, sobre el crecimiento de diferentes líneas tumorales, con y sin receptores para estrógenos, las líneas celulares son MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, HCT-15 de cáncer de colon y HeLa de cáncer cervicouterino.

3. GLOSARIO

SIGLAS	SIGNIFICADO
ASOCIACIONES MUNDIALES	
AJCC	American Joint Committee on Cancer Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer
ATCC	American Type Culture Collection Colección Americana de Cultura Tipo
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
CIIC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory Observatorio Mundial del Cáncer
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer International Agency for Research on Cancer
ICN	National Cancer Institute Instituto Nacional de Cáncer
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
OMS	Organización Mundial de la Salud
UICC	Union for International Cancer Control Unión Internacional Contra el Cáncer
PROTEÍNAS Y RECEPTORES	
AKT	Proteína quinasa B Kinase Protein B
APC	Adenomatous polyposis coli Poliposis Adenomatosa Coli
BAX	BCL2 asociado a X, regulador de la apoptosis Associated X, apoptosis regulator
BCL-2	B-cell lymphoma 2 Linfoma de células B tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER- α	Receptor alfa para estrógenos
ER- β	Receptor beta para estrógenos
HER- 2	Factor de crecimiento epidérmico humano Human Epidermal Growth Factor
HSP	Heat Shock Proteins Proteínas de choque térmico
MAPK	Mitogen Activated protein kinase Proteína quinasa activada por mitógenos

MMP-9	Metalopectidasa 9 de matriz Matrix Metalloproteinasa 9
NF-kB	Factor nuclear kappa B Nuclear Factor kB
NRF-2	Factor nuclear relacionado con el factor 2 eritroide 2 Nuclear Factor related to factor 2 erythroid 2
PI3K	Fosfoinositido – 3 – quinasa Kinase phosphoinositide - 3
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution Solución salina con amortiguador de fosfatos
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metallopeptidase 1 Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa 1
SRF	Serum Response Factor Factor de Respuesta Sérica
VPH	Virus del Papiloma Humano
PROCEDIMIENTOS	
ANOVA	ANalysis Of VAriance Análisis de Varianzas
HPLC	High Performance Liquid Chromatoghaphy Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
MAE	Microwave Assisted Extraction Extracción Asistida por Microondas
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 2,2- difenil- 1- picrilhidrazilo
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide Bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-ilo)- 2, 5 – difeniltetrazol
XTT	Sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate Hidrato de ácido 3' - [1- (fenilaminocarbonil) - 3,4- tetrazolio] -bis (4- metoxi-6-nitro) bencenosulfónico sódico
UNIDADES DE MEDICIÓN	
GHz	Gigahertz (10 ⁹) Hertz
mg	Miligramos (0.001 g)
mL	Mililitros (0.001 L)
nm	Nanómetros (10 ⁻⁹ m)
μL	Microlitros (0.001 mL)
rpm	Revoluciones por minuto

4. ANTECEDENTES

4.1 ANTECEDENTES GENERALES

4.1.1.1 CÁNCER

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, presentando una alta tasa de morbilidad e incidencia, afectando tanto a países desarrollados como a países en vía de desarrollo ⁽¹⁾. El cáncer, de acuerdo con la Real Academia de la Lengua Española se define como una enfermedad neoplásica con transformación de las células ⁽²⁾. Esto coincide con la definición de la OMS, que define el cáncer como un proceso de crecimiento celular continuo e incontrolado que se desarrolla en un tejido y puede invadir otros ⁽³⁾.

El desarrollo del cáncer se presenta en varias etapas (Figura 1):

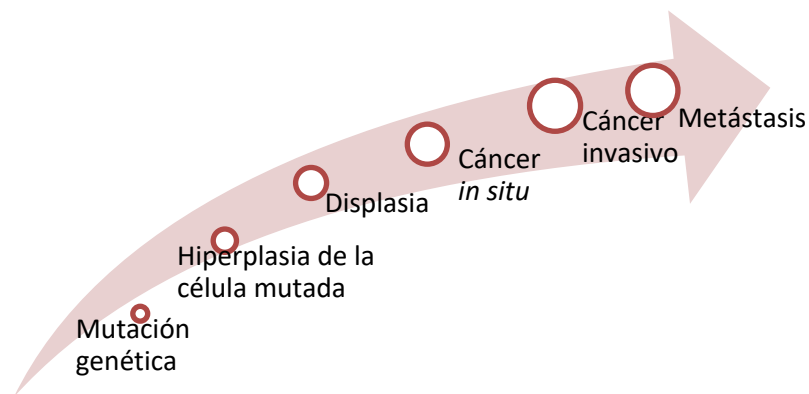


Figura 1. Proceso del desarrollo del cáncer. Inicia con una mutación genética, posteriormente las células mutadas sufrirán una serie de modificaciones hasta formar un tumor invasivo que puede llegar a hacer metástasis a otros órganos (Modificado de Guamán, 2018 ⁽⁴⁾).

Proceso del desarrollo de cáncer:

1. **Mutación genética:** Todo cambio permanente que ocasiona la alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA, puede ser causada por agentes físicos, químicos o biológicos ⁽⁵⁾.
2. **Hiperplasia de la célula mutada:** Incremento en el número de células anormales de un órgano en específico ⁽⁶⁾.
3. **Displasia:** Grupo de células que tienen morfología anormal por alguna alteración en el desarrollo de maduración ⁽⁶⁾.
4. **Cáncer *in situ*:** Formación de tumores no invasivos que aún no se han propagado por todo el órgano ⁽⁷⁾.

5. **Cáncer invasivo.** Formación de un tumor maligno, que corresponde a un tejido carente de funciones vitales, que puede extenderse a otros órganos a través del proceso llamado metástasis ⁽⁴⁾.

6. **Metástasis.** Es el proceso en el que las células cancerosas a través del torrente sanguíneo se desplazan desde el sitio del tumor hasta otros órganos, dando lugar a desarrollo de tumores en los mismos ⁽⁸⁾.

FACTORES NO GENÉTICOS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE CÁNCER

Si bien el cáncer es multifactorial, la OMS a través del Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer (CIIC) establece tres categorías sobresalientes de los factores que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer ⁽⁹⁾:

1. Carcinógenos físicos como radiación ultravioleta y radiación ionizante.
2. Carcinógenos químicos como alcohol, humo del tabaco, aflatoxinas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas.
3. Carcinógenos biológicos como virus, bacterias y parásitos.

La exposición a estos agentes carcinógenos en algunos casos es un riesgo laboral y en otros depende el estilo de vida que incluye una alimentación deficiente en macro y micro nutrimentos y alta en químicos y falta de actividad física ⁽⁹⁾.

CLASIFICACIÓN DE CÁNCER

La Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE), décima revisión, utiliza criterios topográficos, es decir de acuerdo con la localización anatómica o el órgano en el que se desarrolló originalmente el tumor, las neoplasias malignas se clasifican y codifican de la siguiente manera ⁽¹⁰⁾:

Tabla 1. Clasificación de cáncer de acuerdo con la Clasificación Internacional de Enfermedades, décima revisión (Modificado de CIE, 2018 ⁽¹⁰⁾).

Neoplasia	Código
Neoplasias malignas	C00-C96
Neoplasias <i>in situ</i>	D00-D09
Tumores benignos, excepto tumores neuroendocrinos benignos	D10-D36
Tumores neuroendocrinos benignos	D3A
Neoplasias de comportamiento incierto, policitemiavera y síndromes mielodisplásicos	D37-D48
Neoplasias de comportamiento no especificado	D49

Otra clasificación dada por el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer por sus siglas en inglés (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer por sus siglas en inglés (UICC) es la clasificación TNM. Es una forma más detallada de agrupar de acuerdo con el tamaño del tumor (T), la propagación a los ganglios o nódulos linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). La forma de clasificación varía entre los principales tipos de cáncer. De manera general, está conformada de la siguiente manera ⁽¹¹⁾:

T: Tumor primario. Tamaño del tumor.

N: Ganglios linfáticos (nódulos). Indica si el cáncer se ha propagado a los nódulos linfáticos.

M: Metástasis, si el cáncer se ha propagado a otros tejidos.

La categoría T proporciona información sobre las características de tamaño y propagación del tumor primario:

TX: Indica que el tumor no se puede medir.

T0: Indica que no existe evidencia de un tumor primario (no se puede localizar).

Tis: Indica que las células cancerosas crecen sólo en la capa más superficial del tejido, sin invadir los tejidos más profundos.

Los números después de la T (como **T1**, **T2**, **T3** y **T4**) describen el tamaño del tumor y/o la distancia de invasión a otros tejidos, esto depende del órgano en el que se encuentre el tumor.

La categoría N indica si hay propagación del cáncer a ganglios linfáticos cercanos.

- **NX:** Indica que no se pueden evaluar los ganglios linfáticos cercanos.
- **N0:** Indica que los ganglios linfáticos cercanos no han sido invadidos por células cancerosas.

Los números después de la N (como **N1**, **N2** y **N3**) describen el tamaño, la ubicación y/o el número de ganglios linfáticos cercanos afectados por el cáncer.

La categoría M indica si hay metástasis en órganos distantes:

- **M0:** Indica que no se encontró propagación.
- **M1:** Indica que el cáncer ha hecho metástasis a otros órganos.

EPIDEMIOLOGÍA

De acuerdo con lo reportado por la OMS en 2018, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares. En 2015, la OMS registró 8.8 millones de defunciones y en 2018 aumentó a 9 millones 500 mil defunciones, así mismo

reportó que un tercio de las muertes por cáncer se han relacionado con factores de riesgo como: índice de masa corporal elevado, baja ingesta de frutas y verduras, poca actividad física, consumo de tabaco y de alcohol. Además, reportó, que la tasa de mortalidad podría incrementar en 2040 como lo muestra la figura 2; los cinco tipos de cáncer que afectan gravemente a la población a nivel mundial son ⁽³⁾:

Cáncer pulmonar	1 690, 000 de personas.
Cáncer hepático	788, 000 de personas.
Cáncer colorrectal	774, 000 de personas.
Cáncer gástrico	754, 000 de personas.
Cáncer de mama	571, 000 de personas.

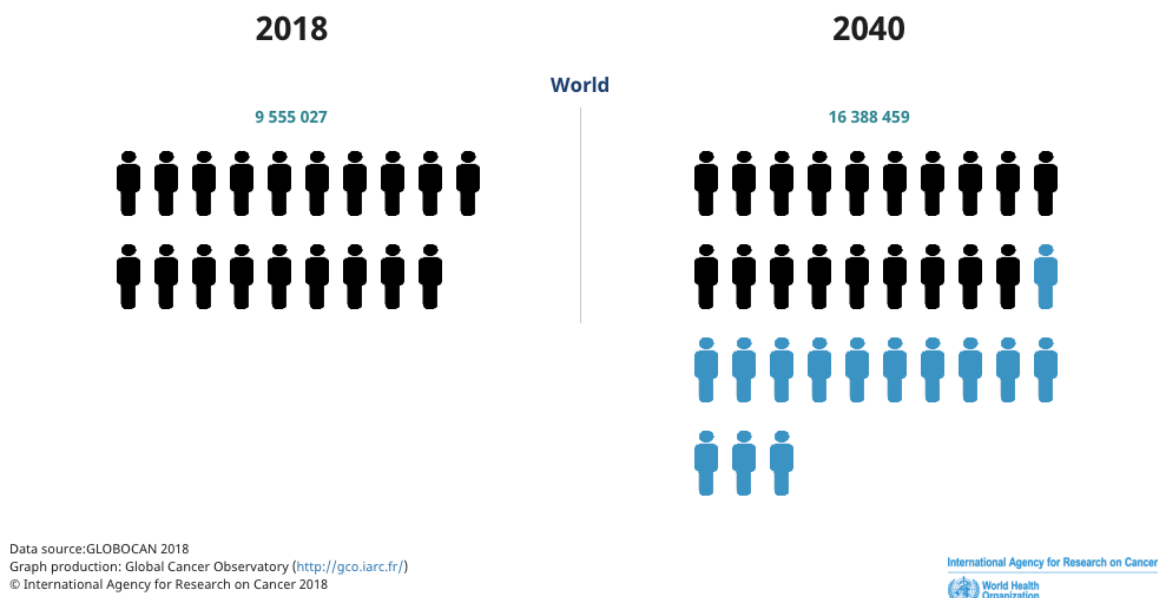
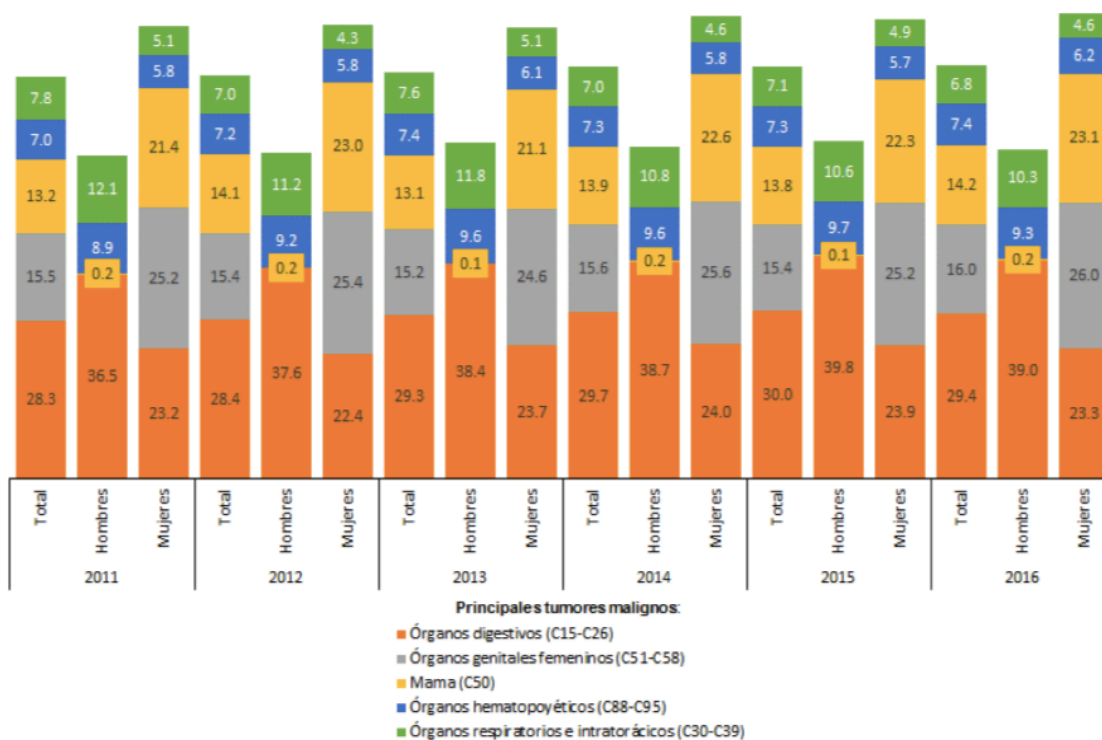


Figura 2. Tendencia de la mortalidad en 2018 y posible aumento en las cifras para 2040 de acuerdo a los datos de la OMS (Recuperado de OMS, 2018 ⁽¹²⁾).

En México, en el lapso de 2011 a 2016, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), reportó que las principales causas de muerte por cáncer en la población adulta mexicana de 30 a 59 años se deben a tumores digestivos, órganos genitales, tumores de mama, tumores hematopoyéticos y respiratorios. En la población de 30 a 59 años, 3 de cada 10 muertes se deben a cánceres digestivos, para la población de 60 años y más 4 de cada 10 defunciones se presentan en mujeres y 3 de cada 10 se presentan en hombres (Figura 3) ⁽¹³⁾.

**Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 30 a 59 años según sexo
Serie anual de 2011 a 2016**



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10).
Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.
Fuente: INEGI. *Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos.*

Figura 3. Estadísticas de los principales tipos de cáncer en México de 2011 a 2016. Como se puede observar en el año 2016 el cáncer en órganos digestivos afectó en un 29.4% a hombres y mujeres, en un 16% en órganos genitales, en un 22.3% afectó a glándulas mamarias, en un 7.4% a órganos hematopoyéticos y en un 6.8% a órganos respiratorios (Recuperado de INEGI, 2016 ⁽¹³⁾).

Considerando las estadísticas de cáncer en México y a nivel mundial, en esta investigación se emplearon líneas celulares de los tipos de cáncer más frecuentes, cáncer de mama, cáncer cervicouterino y cáncer de colon.

4.1.2 CÁNCER DE MAMA

En el año 2012, el Observatorio Mundial del Cáncer por sus siglas en inglés (GLOBOCAN) reportó que el cáncer de mama es la quinta causa de muerte en el mundo afectando a países desarrollados y en vías de desarrollo. Predomina en mujeres con 167 millones de nuevos casos reportados en ese año, en contraste con las cifras reportadas en hombres que son de 0.1% a 0.2% ⁽¹⁴⁾

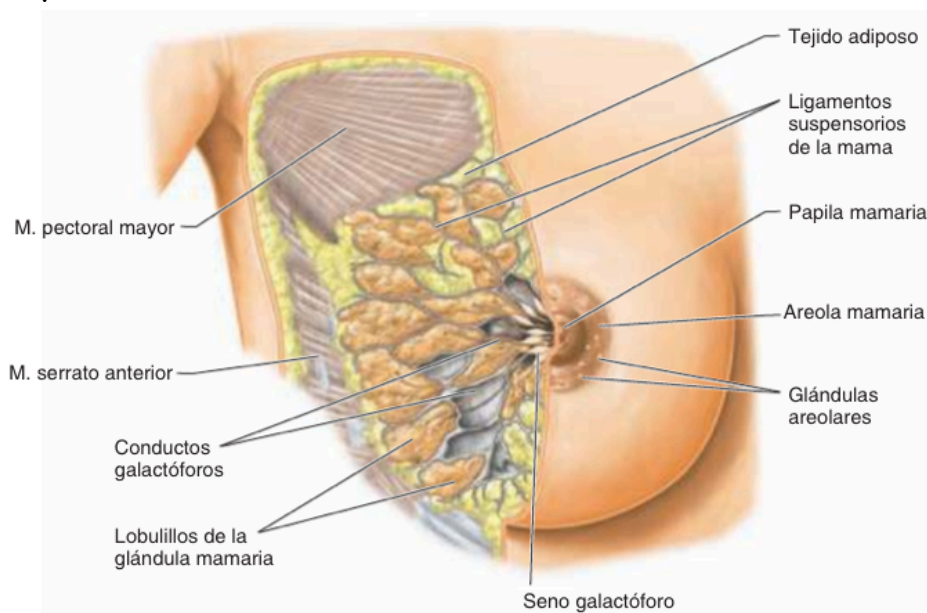


Figura 4. Anatomía general de la glándula mamaria. Las mamas son los órganos glandulares más prominentes del tórax, como se puede observar en la imagen, están ubicadas simétricamente en los músculos pectorales, laterales al esternón y por debajo de la línea axilar, están conformados internamente por conductos galactoforos y lobulillos recubiertas por fascia pectoral y por tejido subcutáneo, unido al pezón que está rodeada por piel oscura pigmentada llamada areola. Su principal función es la producción de leche, proveniente de los conductos galactóforos y los lobulillos. Las mamas también están presentes en los hombres con la misma anatomía, pero con menor desarrollo y sin la capacidad de producción de leche (Recuperado de Pró E, 2013; Moore K, 2013 ^(15,16)).

Cuando hay una hiperplasia mamaria, se puede originar la formación de células cancerígenas (carcinomas) en diferentes sitios, principalmente en los ductos (Carcinoma ductal *in situ*) o en los lóbulos (carcinoma lobulillar). Los carcinomas más comunes son los ductales aproximadamente el 85% y los carcinomas lobulillares del 5 al 10% restante ⁽¹⁷⁾.

Posteriormente, se va propagando hacia los vasos linfáticos y a los nódulos linfáticos cerca de la axila, dando lugar a la metástasis ⁽¹⁶⁾.

Aunado a esto, como parte de los componentes internos de mayor relevancia, algunas hormonas como los estrógenos, la progesterona y el factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), que tienen un papel importante en el desarrollo de la mama, y se han relacionado con la carcinogénesis ⁽¹⁸⁾.

Los estrógenos y la progesterona son hormonas sexuales que se encuentran en mayores cantidades en los ovarios y están implicadas tanto en la regulación del desarrollo sexual femenino como en el crecimiento de las mamas, la menstruación y la preparación del útero para la fecundación ⁽¹⁹⁾. El HER-2 es una proteína implicada en procesos como la

proliferación y la diferenciación celular, sin embargo, una anomalía en alguna de estas funciones puede provocar la sobreexpresión de esta proteína y contribuir en el proceso de carcinogénesis ⁽²⁰⁾, provocando un mal pronóstico en el 20% de los casos de cáncer ⁽²¹⁾.

La funcionalidad de cada una de estas hormonas dependerá de la afinidad a su receptor, la cual se ha relacionado con la formación de tumores mamarios, ya que tienen acciones sobre el crecimiento, proliferación y división celular ⁽²⁰⁾. De acuerdo con la expresión o no de los receptores para hormonas (figura 5), el cáncer de mama se clasifica molecularmente de la siguiente manera ⁽¹⁸⁾:

- Luminal A: Hace referencia a tumores con alta expresión de receptores para estrógeno (ER) y/o receptores para progesterona (PR) y no expresan receptores para factor de crecimiento epidérmico (HER2).
- Luminal B: Hace referencia a tumores con baja expresión de ER y/o PR y si expresan receptores para factor de crecimiento epidérmico HER-2.
- Tumores basales o triple negativo: Hace referencia a los tumores que no expresan receptores para ER, PR ni HER-2.

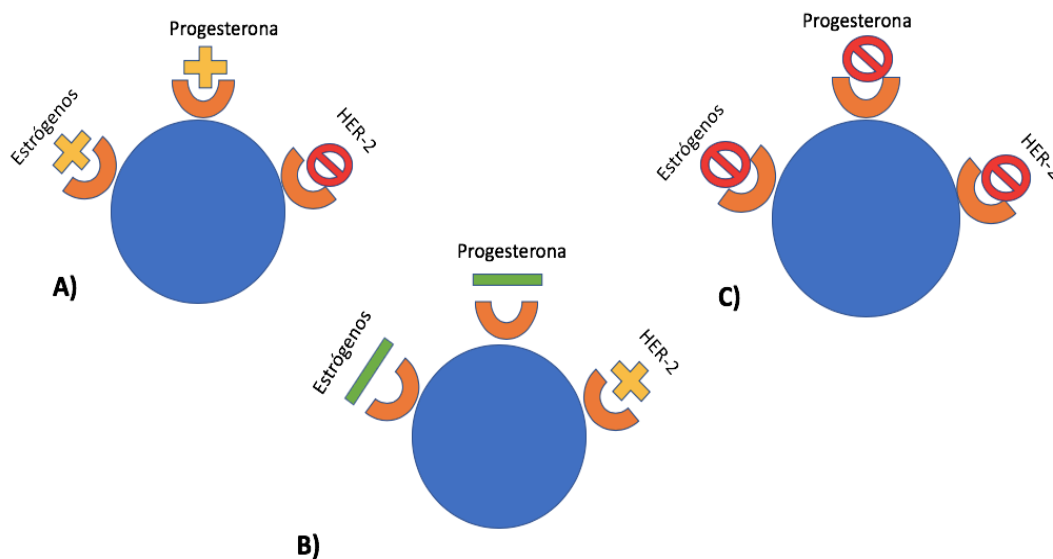


Figura 5. Expresión de los receptores para las hormonas en la glándula mamaria. A) Luminal A, Expresa receptores para estrógenos y progesterona y no expresa HER-2. **B) Luminal B,** no expresa receptores para estrógenos y progesterona y expresa HER-2. **C) Tumores triple negativo,** no expresa ningún receptor (Modificado de Santillan Benitez JG, 2013 ⁽²⁰⁾).

Esta clasificación de acuerdo con la expresión de los receptores para hormonas es de utilidad para esta investigación, puesto que nos permite diferenciar el cáncer hormona dependiente y el cáncer hormona independiente o triple negativo. ⁽¹⁸⁾.

Para determinar la expresión de los receptores para hormonas, se emplean pruebas inmunohistoquímicas, y para el tratamiento algunos fármacos como el tamoxifeno, empleado originalmente como reemplazo hormonal en mujeres posmenopáusicas con el fin de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, Alzheimer y la sintomatología clásica posmenopáusica ⁽²²⁾; el tamoxifeno se une a los Receptores para estrógenos por lo que actúa como inhibidor de la acción estrogénica, limitando el crecimiento de células cancerígenas, que expresan receptores estrogénicos.

Otro fármaco es el trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor HER-2, que al unirse a este receptor inhibe la proliferación celular además favorece la activación de los linfocitos B, sin embargo, este únicamente se puede emplear contra el cáncer que exprese este receptor ^(20, 23, 24).

Además de las terapias sistémicas para eliminar tumores localizados y con metástasis, como quimioterapia, hormonoterapia, y/o inmunoterapia, como parte del tratamiento, se emplea la terapia local ya sea radioterapia o cirugía que se enfocan en erradicar un tumor en un determinado sitio sin afectar otras partes del cuerpo. La hormonoterapia, se emplea para reducir la respuesta a los niveles de estrógeno al bloquear las acciones estrogénicas en el tumor ⁽²³⁾, su empleo se basa en algunos criterios entre ellos la evaluación de la expresión de los ER, PR y HER-2, ya que tamoxifeno se une a los receptores para estrógenos por lo que será efectivo contra los tumores que expresen este tipo de receptores, y en el caso de la inmunoterapia se emplea trastuzumab, que es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor HER-2 ⁽²⁵⁾. El tamaño y grado del tumor son también criterios de suma importancia ya que los carcinomas que miden menos de 1 centímetro de diámetro tienen un buen pronóstico lo que indica una mayor probabilidad de supervivencia, a diferencia de los tumores mamarios que miden más de 2 centímetros que presentan mayor riesgo de metástasis ⁽²⁶⁾.

En particular en esta investigación se empleó la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC®-HTB-22), que corresponde a un adenocarcinoma Luminal A, hormona dependiente, ya que expresa ER y PR ^(27,28).

CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Al cáncer de mama triple negativo se le denomina así por no expresar los receptores ER, PR ni HER-2, razón por la cual no responde a la hormonoterapia o a la inmunoterapia dirigida a estos receptores y por lo tanto presenta mayor riesgo de mortalidad en comparación con otros subtipos como el Luminal A o Luminal B ⁽²⁹⁾. El cáncer de mama triple negativo representa del 10 al 20% entre los cánceres de mama, como se comentó, por lo general tiene un mal pronóstico, genera metástasis a los pulmones, el hígado y el sistema nervioso central ⁽³⁰⁾.

El tratamiento es un desafío continuo en este tipo de cáncer, ya que al inicio de las quimioterapias los resultados son favorables, sin embargo, debido a la inespecificidad del tratamiento, el beneficio de la quimioterapia o radioterapia no es duradero, ya que no existen blancos terapéuticos definidos como otros tipos de cáncer de mama como el Luminal A y Luminal B ^(30, 31).

En particular en esta investigación se empleó la línea celular ATCC de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (ATCC®-CRM-HTB-26) que corresponde a un adenocarcinoma epitelial basal, que no expresa los receptores ER, PR ni HER-2 ^(27, 32)

4.1.3 CANCER DE COLON

El cáncer de colon tiene gran relevancia a nivel mundial. En 2012 el GLOBOCAN reportó que es la tercera neoplasia más frecuente en hombres y la segunda más frecuente en mujeres. Representa alrededor del 55% de los casos de cáncer en países desarrollados ⁽³³⁾.

La principal función del colon es la absorción de agua, electrolitos, producción de vitaminas y eliminación de heces a través del recto ⁽³⁴⁾, se divide en colon ascendente, colon descendente, colon sigmoideo y recto (figura 6).

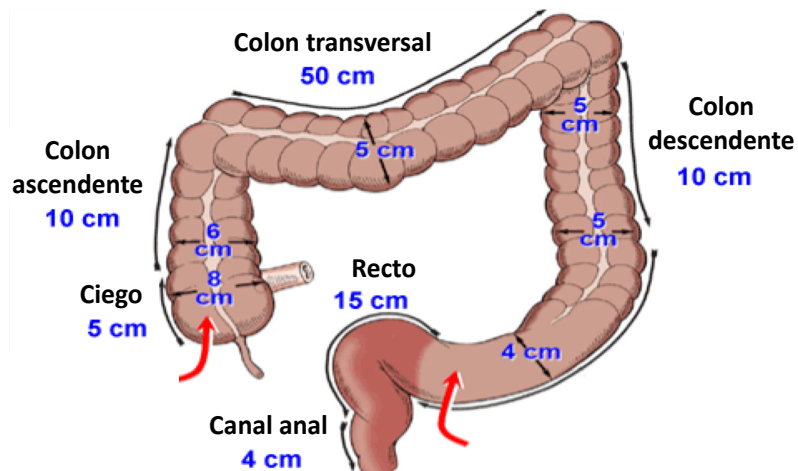


Figura 6. Anatomía general del colon. El intestino grueso mide aproximadamente 1.50 metros, se encuentra rodeando el intestino delgado. Está dividido en tres secciones: ciego, colon (colon ascendente, colon transverso y colon descendente) y recto. El recto se divide en tres secciones: recto inferior (4 a 8 cm del margen anal), recto medio (8 a 12 cm del margen anal), recto superior (12 a 16 cm del margen anal) y el canal anal (4 cm de longitud) (Recuperado de ⁽³⁵⁾).

La absorción de agua comienza en el colon ascendente, hasta formar las heces, las cuales se transportarán al colon descendente para llegar al colon sigmoideo donde se moverán al recto hasta su deposición ⁽³⁴⁾.

Los tumores de origen hereditario pueden generarse a partir de pólipos adenomatosos; el tamaño de los pólipos va de 1.5 a 2.5 centímetros, cuando el tumor se genera a partir de pólipos suele progresar de manera lenta hasta alrededor de 10 años, (Figura 7) ^(36, 37).

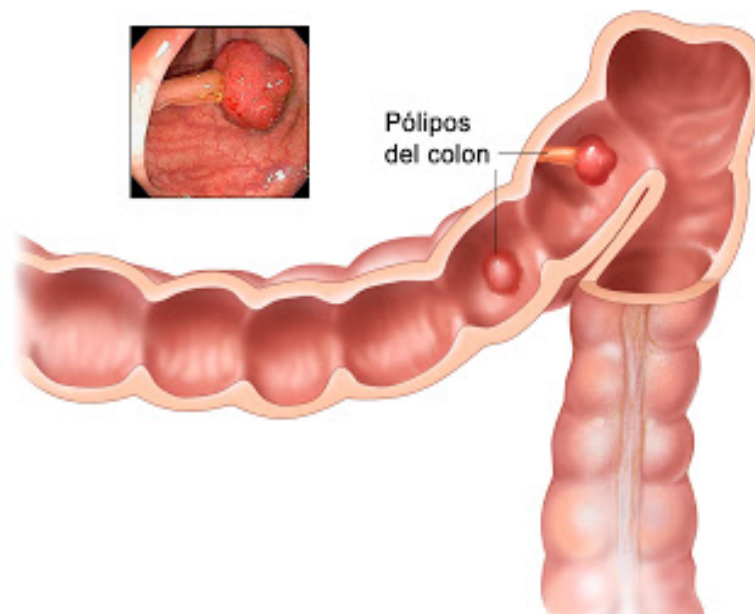


Figura 7. Representación de un pólipo, el cual como se menciona en el texto es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer (Recuperado de ⁽³⁸⁾).

Cuando el cáncer es invasivo, da lugar a metástasis, esto ocurrirá dependiendo de la ubicación del tumor, por ejemplo, la metástasis va hacia peritoneo y posteriormente se desarrolla en órganos como el hígado o pulmón, en el caso de los carcinomas de colon ubicados del lado izquierdo⁽³⁹⁾.

Existen algunas clasificaciones que permiten identificar el grado de los tumores, una de ellas es la clasificación de Dukes^(11, 40):

- A** Tumor localizado en la mucosa.
- B** Tumor localizado en la submucosa sin afectar a los ganglios linfáticos.
- C1** El tumor invade a los ganglios linfáticos sin atravesar las paredes intestinales.
- C2** Metástasis en ganglios linfáticos atravesando las paredes intestinales.

Se ha observado que, que en la mayoría de los casos los tumores se originan del lado derecho del intestino grueso, abarcando el colon transversal, colon ascendente y ciego⁽⁴¹⁾. Esto se debe a que el suministro sanguíneo de la arteria mesentérica superior recorre desde el duodeno medio hasta el colon transversal medio y la arteria mesentérica inferior recorre del colon transversal al recto, lo que favorece el diagnóstico y con ello un correcto tratamiento, los tumores del lado derecho tienen peor pronóstico a diferentes terapias en comparación con los tumores del lado izquierdo, por las variaciones que presentan a nivel molecular⁽⁴²⁾.

El cáncer de colon esporádico se clasifica por consenso principalmente por tres eventos moleculares carcinogénicos^(42, 43):

- La inestabilidad cromosómica (CIN)
- La inestabilidad microsatelital (MSI)
- Fenotipo metilado (CIMP)

Con una subclasificación molecular de la inestabilidad microsatelital:

- Canónica
- Metabólica
- Mesenquimal

Los factores de riesgo para desarrollar la enfermedad son el estilo de vida, incluyendo al tabaquismo ⁽⁴⁴⁾, consumo excesivo de alcohol ^(45,46), sedentarismo ⁽⁴⁷⁾, obesidad ⁽⁴⁸⁾, una alimentación basada en un alto contenido de colesterol, grasas trans, grasas saturadas ⁽⁴⁹⁾, otro factor es hereditario, así como la presencia de pólipos adenomatosos como se observa en la Figura 7⁽⁵⁰⁾. La tumorigénesis de cáncer colorectal es muy variada, involucra a la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad microsatélital, a varios protooncogenes, genes supresores de tumores y también regulaciones epigenéticas del DNA ⁽⁵¹⁾.

En el epitelio colónico están presentes dos receptores para estrógenos: los receptores alfa para estrógenos (ER α) y receptores beta para estrógenos (ER β), los cuales forman parte de la superfamilia de receptores nucleares de las hormonas tiroideas ⁽⁵²⁾. La diferencia entre ambos receptores es su localización en los órganos, los ER α se encuentran en mayor proporción en las glándulas mamarias, hipotálamo, en hueso cortical, endometrio, estroma ovárico y tejido cardiovascular, y los ER β se encuentran en el epitelio colónico, en hueso trabecular, riñón, corazón, pulmones, mucosa intestinal y en algunas células del endometrio ⁽⁵²⁾.

Una sobreexpresión de ER β 1 puede generar una disminución en la proliferación celular ya que entre mayor sea la expresión de este receptor, menor será el tamaño del tumor, ya que la unión de estrógeno se asocia más fuertemente a caveolina y a p38(un miembro de la MAPK), para promover la apoptosis (Figura 8) ⁽⁵³⁾. Calabrese *et al.* ⁽⁵⁴⁾ reportaron que una suplementación con fitoestrógenos puede reducir el tamaño de los adenomas duodenales en el colon y otros sitios extraintestinales ⁽⁵⁴⁾.

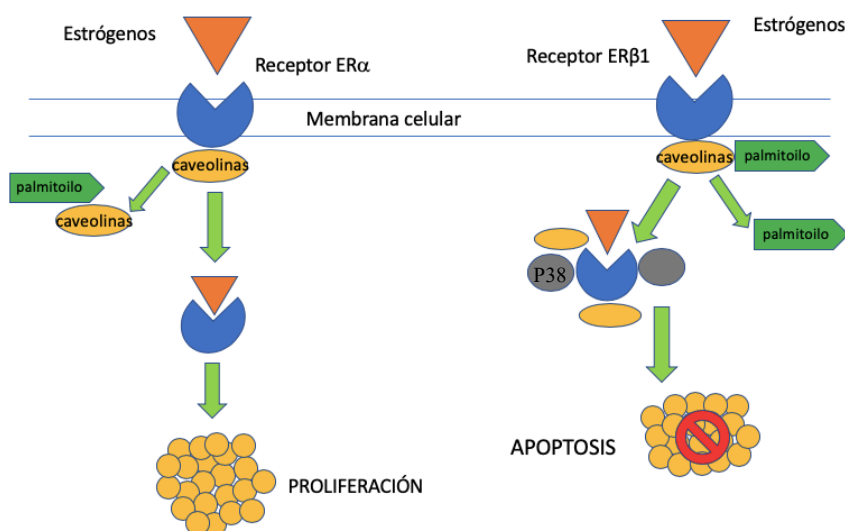


Figura 8. Receptores para estrógenos presentes en el epitelio colónico. Los receptores estrogénicos (ER) que se encuentran en la membrana plasmática, se asocian con caveolinas. En ER- α hay una despalmitoilación y se disocian de caveolina activando señales de proliferación celular. En ER- β al unirse a estrógenos, se asocian con CAV y con p38, y promueven la apoptosis (Modificado de Barone M, 2008 ⁽⁵²⁾).

En esta investigación se empleó la línea celular HCT-15 (ATCC®-CRM-HTB-26) que corresponde a un adenocarcinoma de colon humano tipo “C” de acuerdo con la clasificación de Dukes ⁽⁵⁵⁾.

4.1.4 CÁNCER CERVICOUTERINO

El GLOBOCAN reportó que el cáncer cervicouterino o también llamado carcinoma de cuello uterino o de cérvix, ocupa el cuarto lugar de incidencia a nivel mundial, en 2012 se diagnosticaron 528, 000 nuevos casos, de los cuales el 12% correspondían a países con bajos ingresos ⁽⁵⁶⁾.

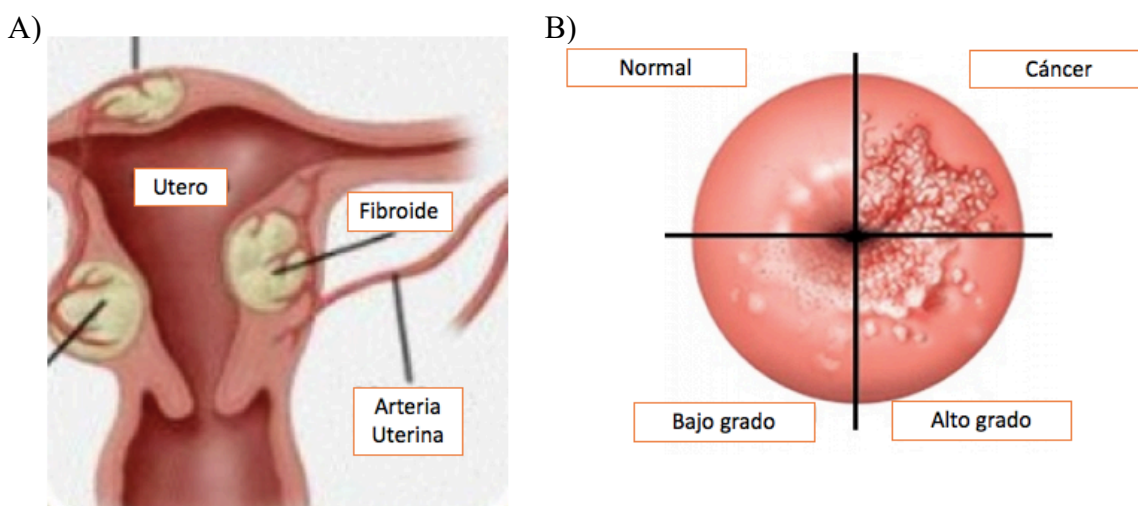


Figura 9. Anatomía del aparato reproductor femenino. A) El aparato reproductor femenino está compuesto de órganos genitales externos (los labios mayores, los labios menores, el clítoris, la pubis, las glándulas vestibulares y la uretra forman parte de los órganos externos) y los internos (los ovarios, las trompas de falopio, el útero y la vagina) siendo su principal función la reproducción. B) Además se puede apreciar las diferentes localizaciones y grados de un tumor, sin embargo en este trabajo se utilizará la del tumor cervical (Recuperado de ⁽⁵⁷⁾).

El desarrollo y funcionalidad del aparato reproductor femenino está regulado por estrógenos a través de los receptores $ER\alpha$, $ER\beta$ y el receptor 1 de estrógeno acoplado a proteína G (GPR30) y por progesterona a través del receptor de progesterona B (PRB) (Figura 10) ^(58,59).

De acuerdo con la OMS, la clasificación de tumores epiteliales en el cuello uterino es la siguiente ⁽⁶⁰⁾:

- Escamosos: Representan 70 al 80%.
- Glandulares (Adenocarcinoma): Representan del 20 al 25%.
- Otros tumores epiteliales: carcinoma adenoescamoso, tumores neuroendocrinos y el carcinoma no diferenciado: Representan menos del 5%.

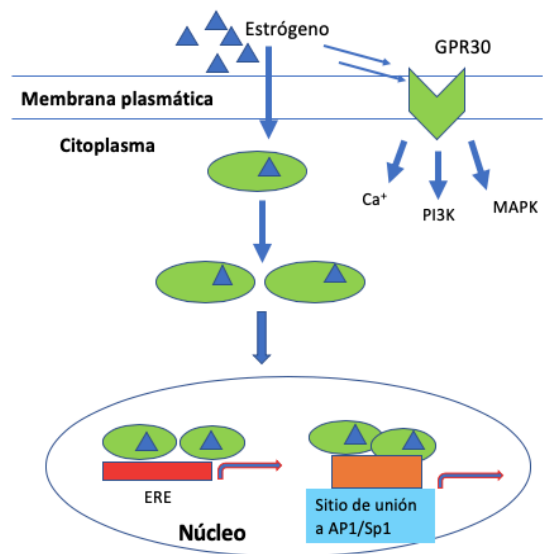


Figura 10. El estrógeno se puede unir a sus receptores ER α y ER β y al receptor de membrana GPR30 para ejercer sus funciones. El estrógeno se une a las ER e induce la heterodimerización de la ER. Los ER unidos al estrógeno se traslocan al núcleo, donde se activan o reprime los genes objetivo mediante dos mecanismos: vía clásica: ER se une a ERE y modula genes diana y vía no clásica: ER se une a la transcripción AP1 o Sp1 factores asociados. El estrógeno también se une al receptor de membrana GPR30, y transduce varias vías de señalización relacionadas con el crecimiento celular como fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), proteína activada por mitógeno quinasa (MAPK) y señalización de Ca²⁺ (Modificado de Sang-Hyuk C, 2010 ⁽⁵⁹⁾).

Existen varios factores de riesgo que favorecen el desarrollo de este tipo de cáncer, el más importante es el Virus del Papiloma Humano (VPH), con una prevalencia de 25 a 30% en mujeres menores de 25 años, diferentes subtipos están presentes en el tracto urogenital en el 70% de las personas sexualmente activas, los subtipos relacionados con el desarrollo de cáncer son el VPH16 y el VPH18 ⁽⁶¹⁾. Algunos de los factores de riesgo para adquirir este virus, incluye el número de parejas sexuales, las relaciones sexuales a temprana edad, el no usar preservativo, la frecuencia de la actividad sexual, el tiempo prolongado del uso de anticonceptivos orales y hormonales ^(61, 62).

El 90 al 95% por factores de riesgo externos están asociados con el estilo de vida como sedentarismo, dieta, radiaciones UV, de los cuales 25 al 30% corresponde al tabaco o cigarillo y 30 al 35% corresponde a factores dietéticos ⁽⁶³⁾.

En particular en esta investigación se empleó la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa (ATCC®-CRM-CCL-2) que corresponde a un adenocarcinoma epitelial adherente de virus de papiloma humano. Esta línea celular es considerada la primera línea de células inmortales ⁽⁶⁴⁾.

4.1.5 IMPORTANCIA DE LAS LÍNEAS TUMORALES EN LA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER

Dentro de la investigación científica, existe una continua búsqueda de modelos experimentales que sean viables y confiables. Las líneas celulares son de los modelos más empleados en el estudio de cáncer, tanto para la detección de nuevos blancos terapéuticos, como, para probar nuevos fármacos específicos o identificar mecanismos de acción de fármacos efectivos, pero no diseñados de manera específica ^(65, 66).

Las líneas celulares que se emplearon en esta investigación son:

MCF-7. Esta línea celular fue descubierta por el Dr. Soule y colaboradores en 1973 en el **Michigan Cancer Foundation**, se asignó el nombre de acuerdo con las iniciales de esta fundación, proviene de un derrame pleural de una paciente de 69 años, quien ya presentaba una metástasis de un adenocarcinoma severo. En ese mismo año se describieron los Receptores para estrógenos y en 1975, se descubrió la inhibición de esta línea celular por la acción del fármaco anti-estrógeno tamoxifeno ^(67,68).

MDA-MB-231. Esta línea celular se proliferó a partir de la muestra de una paciente de 51 años con un derrame pleural, quien había tenido un carcinoma intraductal. Sus resultados indicaban que se trataba de un carcinoma con componente ductal y papilar. Presentó un derrame pericárdico y un derrame pleural izquierdo, el cual contenía células semejantes a las de cáncer de mama. Murió el 13 de enero de 1974 en el Hospital **MD Anderson** en el edificio principal (**Main Building**), en la habitación **231**. El nombre de esta línea celular corresponde al nombre con que se etiquetó la muestra de la paciente de la habitación 231 (MDA-MB-231). Después de siete meses se consideró una línea inmortal celular de cáncer de mama, por las características que presentaba al cultivarla en el laboratorio, como su acelerada proliferación y formación de metástasis. Esta línea celular no expresa receptores para estrógenos ⁽⁶⁷⁾.

HCT-15. Esta línea celular fue derivada de un carcinoma de colon ⁽⁵⁵⁾. De acuerdo con los resultados de Vermeulen S y colaboradores, reportan que esta línea celular tiene un gen en común junto con DLD-1, HCT-8 y HRT-18 ⁽⁶⁹⁾.

HeLa. Esta línea es considerada “La primera línea de células inmortales humanas”. Proviene de una muestra de cáncer cervicouterino tomada a la paciente **Henrietta Lacks**, el 8 de febrero de 1951. Esta línea celular ha sido empleada por casi 70 años en investigación

por sus características de adherencia, su acelerada proliferación y por su resistencia a la apoptosis ⁽⁷⁰⁾. A partir de su cultivo, se observó la factibilidad de proliferación de otras líneas celulares, como modelos *in vitro* y fue una de las que se emplearon por primera vez como xenoinjertos para experimentación en ratones ⁽⁶⁵⁾.

Para esta investigación fue de gran importancia emplear líneas celulares de los tipos de cáncer que más afectan a la población de acuerdo con los datos de la OMS de 2018 y de INEGI 2016. Cada una de estas líneas celulares tienen en común que poseen receptores para estrógenos, por lo que, en el campo de la investigación, se ha propuesto que las isoflavonas de soya, pueden unirse a los receptores para estrógenos; por su homología estructural con el 17β estradiol; y modificar el crecimiento celular tumoral.

4.1.6 SOYA

El nombre científico de la soya es *Glycine max*, la cual pertenece a la clase Magnoliopsida, de la familia *Fabaceae* o leguminosas, de la subfamilia *Leguminosae*, *Papilionoideae*, pertenece al género *Glycine*, al reino *Plantae* y al subreino *Trachebionta* ⁽⁷¹⁾.

La soya es un alimento que por excelencia forma parte de la dieta asiática tradicional. En Asia, se emplea para la elaboración de diversos platillos como el tempeh, tofu, miso, sufu y natto (Tabla 2) ⁽⁷²⁾. A través del consumo de estos platillos, la ingesta diaria en Japón alcanza hasta 76 mg/día, en otros países asiáticos como China y Korea va de 30 a 50 mg/día en personas adultas. En países occidentales y/o europeos en donde no se consumen estos platillos la ingesta va de 0.1 - 3 mg/día de isoflavonas ^(73, 74, 75). En México, la soya se utiliza para elaborar diferentes productos como la soya texturizada, leche de soya, yogurt de soya, jugos de soya, salsa de soya, aceite de soya o se consume de manera natural como edamame, germinado de soya, sin embargo, la ingesta de estos alimentos es poco frecuente, por lo que prefieren ingerir isoflavonas de soya directamente de cápsulas.

Tabla 2. Contenido de isoflavonas en derivados de la soya (Modificado de Rizzo G, 2018 ⁽⁷⁶⁾).

Contenido de Isoflavonas en diferentes derivados de la soya	
Derivado de soya	Contenido en mg / 100g
Edamame	17.42
Frijol de soya crudo	154.53
Frijol de soya asado	148.5
Lecitina de soya	15.7
Aislado de proteína de soya	91.05
Concentrado de proteína de soya	94.65
Soya texturizada	172.55
Soya desgrasada	150.94
Leche de soya	0.7 - 10.73
Queso de Soya	6.02 - 25.72
Salsa de soya	1.18
Natto	82.29
Sufu	13.75
Tempeh	3.82
Tofu	13.1 - 34.78

La semilla de la soya contiene alrededor de 300 mg de isoflavonas por cada 100 g de harina de soya, sin embargo, debido a que es sometida a varios procesos de cocción, para la elaboración de los alimentos ya antes mencionados (miso, tofu, tempeh), su contenido disminuye entre un 40 a 50% llegando de 150 a 200 mg por cada 100g de harina de soya ⁽⁷³⁾.

Nutricionalmente la soya destaca entre todas las leguminosas por su alto contenido de proteínas de alto valor biológico (Tabla 3) ⁽⁷³⁾.

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos en algunas legumbres (Modificado de Messina M, 2016; USDA, 2015 ^(73, 77)).

Contenido proteico de leguminosas	
Alimento	Contenido de proteínas % kcal / g
Frijol de soya (16109)	42.3 / 31.3
Lentejas (16070)	31.1 / 17.9
Frijoles pintos. (16043)	25.2 / 15.4
Frijoles blancos (16038)	23.5 / 15.0
Garbanzos (16057)	21.6 / 14.5
Frijol negro (16015)	26.9 / 15.2
Frijol adzuki (16002)	23.5 / 17.3
Frijoles nortños (16025)	28.2 / 14.7
Frijoles de lima (16372)	27.1 / 14.7

La soya tiene un bajo contenido de hidratos de carbono de los cuales la mayor parte son oligosacáridos ⁽⁷³⁾. El contenido lipídico se compone principalmente de ácidos grasos mono y poliinsaturados siendo la mayor parte de ácido linoleico, además de que no contiene colesterol ⁽⁷⁵⁾. En la Tabla 4 se enlistan los macro y micro nutrientes de la soya.

Tabla 4. Composición nutricional de la soya, macro y micro nutrientes en 100 g de soya (Ledesma J, 2010 ⁽⁷⁸⁾).

COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL DE LA SOYA			
Componente alimentario	Contenido en g/ 100 g	Componente alimentario	Contenido en g/ 100 g
		Minerales	
Energía	446	Calcio	226.0
Hidratos de carbono	30.16	Fósforo	730.0
Proteínas	36.49	Hierro	15.70
Lípidos	19.94	Magnesio	280
		Sodio	2
		Potasio	1797.0
		Zinc	4.89
		Vitaminas	
Lípidos		Vitamina A	1.0
Saturados	2.88	Vitamina C	6.0
Monoinsaturados	4.35	Tiamina	1.10
Poliinsaturados	9.93	Riboflavina	0.31
		Niacina	2.20
		Piridoxina	0.38
		Ácido Fólico	375.0
		Cobalamina	0

4.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

4.2.1 FITOESTRÓGENOS

Son compuestos dietéticos que proceden de las plantas. Estructural y funcionalmente se asemejan a los estrógenos, como el 17- β -estradiol. Los compuestos identificados como fitoestrógenos son las isoflavonas, lignanos y los cumestranos ^(79,80).

Se ha demostrado que tienen efectos benéficos para la salud en la menopausia ⁽⁸¹⁾, osteoporosis ⁽⁸²⁾, enfermedad cardiovascular ⁽⁸³⁾, obesidad ⁽⁸⁴⁾, Diabetes mellitus tipo 2 ⁽⁸⁵⁾ y algunos tipos de cáncer como mama ⁽⁸⁶⁾, próstata ⁽⁸⁷⁾ y colon ⁽⁸⁸⁾.

4.2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS O POLIFENOLES

La palabra “Polifenoles” no es un término químico estrictamente hablando sin embargo se ha popularizado. Hoy en día se utiliza para referirse a los flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, y a sus diversos derivados químicamente modificados o polimerizados. Las principales clases de polifenoles en la dieta son los flavonoles (incluidas las catequinas y los taninos), las flavononas (como la hesperidina de los cítricos), los flavonoles (como la quercetina del té, las manzanas y las cebollas), los ácidos hidroxicinámicos (ácidos fenólicos a menudo llamados ácidos clorogénicos abundantes en el café y en muchas frutas y verduras) y las antocianinas responsables del color de frutas y verduras. Existe una base de datos detallada sobre las clases y la distribución de los compuestos fenólicos presentes en más de 400 alimentos ^(89,90), estos datos proceden de más de 1, 300 publicaciones científicas, además se han reportado varias revisiones sobre la ingesta de los polifenoles de acuerdo con la alimentación de diferentes poblaciones ^(91, 92, 93, 94).

La molécula estructural básica de los polifenoles es el fenol, formado por un grupo hidroxilo y un anillo aromático, aunque en general contienen en su estructura un anillo aromático con uniones de uno o más grupos hidroxilo. Los polifenoles son fitoquímicos responsables del color de algunas frutas y de la astringencia de algunas hortalizas tienen pesos moleculares entre 500 a 3000 Daltons ⁽⁹⁵⁾. En nutrición se les consideran como sustancias bioactivas esto se debe a su actividad antioxidante durante el estrés oxidativo, además de tener acciones antiinflamatorias ⁽⁹⁶⁾, anticancerígenas ^(97,98) y evitan mutaciones por daño al DNA ⁽⁹⁹⁾.

Los compuestos comúnmente identificados son: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos), cumarinas, estilbenos, benzofenonas, xanthonas, quinonas, lignanos, ligninas, antocianinas, flavonoides, flavonas, flavonoles, flavononas, flavanonoles e isoflavonas (Figura 11) ⁽¹⁰⁰⁾.

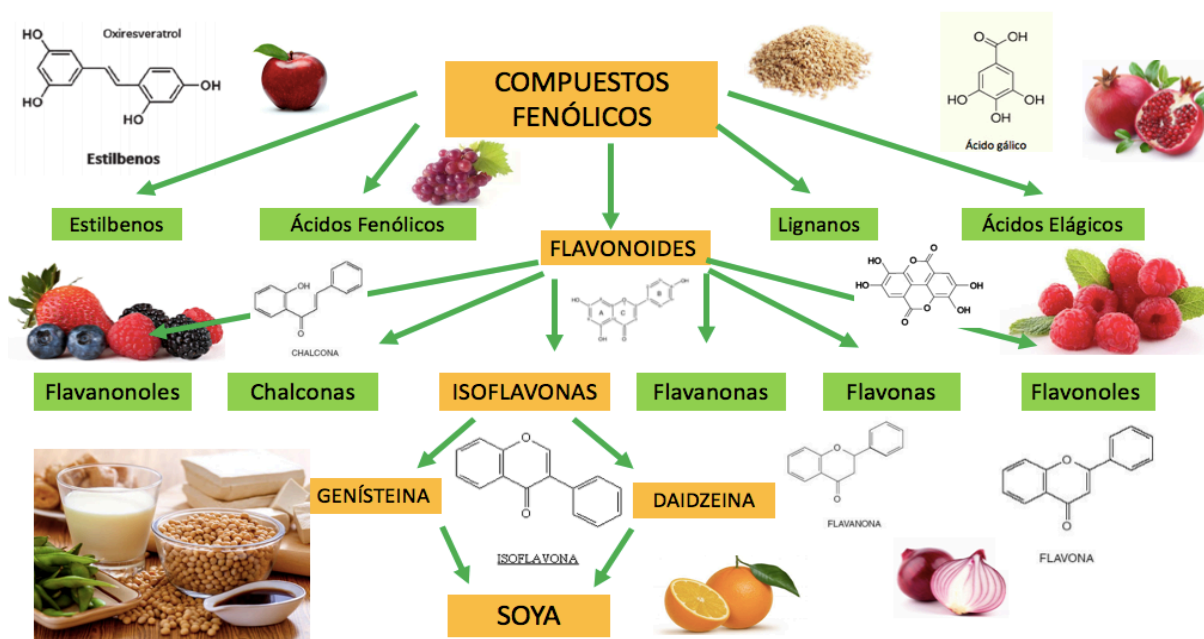


Figura 11. Clasificación de los compuestos fenólicos contenidos en diferentes alimentos. Entre esta clasificación destacan las isoflavonas de soya en diferentes presentaciones: granos, leche de soya, tofu, etc (Modificado de Zhang H, 2016 ⁽¹⁰¹⁾).

Los posibles “beneficios para la salud” de los polifenoles de la dieta se han atribuido a su actividad antioxidante directa y su impacto en la regulación del equilibrio redox de las células y de los tejidos. Sin embargo, debido a la biodisponibilidad relativamente baja de estos compuestos, sus efectos no podrían explicarse fácilmente únicamente por la acción antioxidante que puede ocurrir solo a altas concentraciones en la circulación y los tejidos.

Por lo tanto, se han realizado muchos esfuerzos para aclarar los mecanismos moleculares que subrayan el efecto biológico de los polifenoles en condiciones fisiológicas y patológicas. La disponibilidad de los polifenoles, el metabolismo y sus efectos sobre los receptores para membranas y/o nucleares, y los mecanismos de transducción de señales intracelulares pueden definir el impacto general de estos compuestos en el riesgo y la progresión del cáncer, que aún se debate y no se ha aclarado. Los polifenoles son capaces de unirse a ER- α y ER- β y por lo tanto, inducir efectos biológicos en las células humanas al

imitar o inhibir la acción de los estrógenos endógenos, incluso en concentraciones bajas, modificando la progresión y el desarrollo del tumor ⁽¹⁰²⁾.

4.2.3 FLAVONOIDES

Dentro de la clasificación de los compuestos fenólicos, destaca el grupo de los flavonoides (del latín *Flavus* que significa amarillo), presentes en frutas, verduras, chocolate, té, vino y otros productos derivados de plantas. Dentro de los flavonoides, existen 9, 000 miembros, los cuales se clasifican en: flavanoles, flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y flavanonoles ⁽¹⁰³⁾.

La estructura química de los flavonoides, está formada por dos anillos de benceno unidos por un puente de 3 carbonos (C6-C3-C6), dando lugar a un heterociclo ⁽⁹⁵⁾. Los más comunes son las isoflavonas que se encuentran glucosiladas en la soya lo que las hace hidrosolubles y favorece su absorción ^(100, 104).

Se ha reportado que los flavonoides ejercen efectos anticancerígenos contra ciertos tipos de cáncer como cáncer de mama ⁽⁷³⁾, ovario ⁽¹⁰⁵⁾ y colorrectal, debido a que tienen la capacidad de detener la apoptosis de células cancerígenas y el ciclo celular en la fase G1 o G2/M, además inhiben al Citocromo P450, el cual ayuda a disminuir el número de compuestos cancerígenos, y a reducir la formación de especies reactivas de oxígeno mediante enzimas de fase II ⁽⁹⁵⁾.

4.2.4 ISOFLAVONAS DE SOYA

Las isoflavonas de soya son compuestos naturales heterocíclicos, derivados de fenoles que poseen funciones y características en su estructura similares al estrógeno 17β - estradiol, el cual es una hormona sexual esteroidea femenina, que tiene la función de regular características sexuales femeninas ^(106, 107).

Las funciones biológicas del estrógeno 17β - estradiol, está regulado a través de dos receptores el ER α y ER β ⁽¹⁰⁷⁾. Pertenece a la superfamilia de los receptores intracelulares y están codificados en el cromosoma 14q23.2 ⁽¹⁰³⁾. Su estructura química se compone de la unión de hidroxicinamil coenzima-A éster, un precursor aromático con un precursor alifático malonil coenzima-A, además de poseer un núcleo flavona, con dos anillos de benceno unidos por un pirano heterocíclico (Figura 12) ⁽⁷¹⁾.

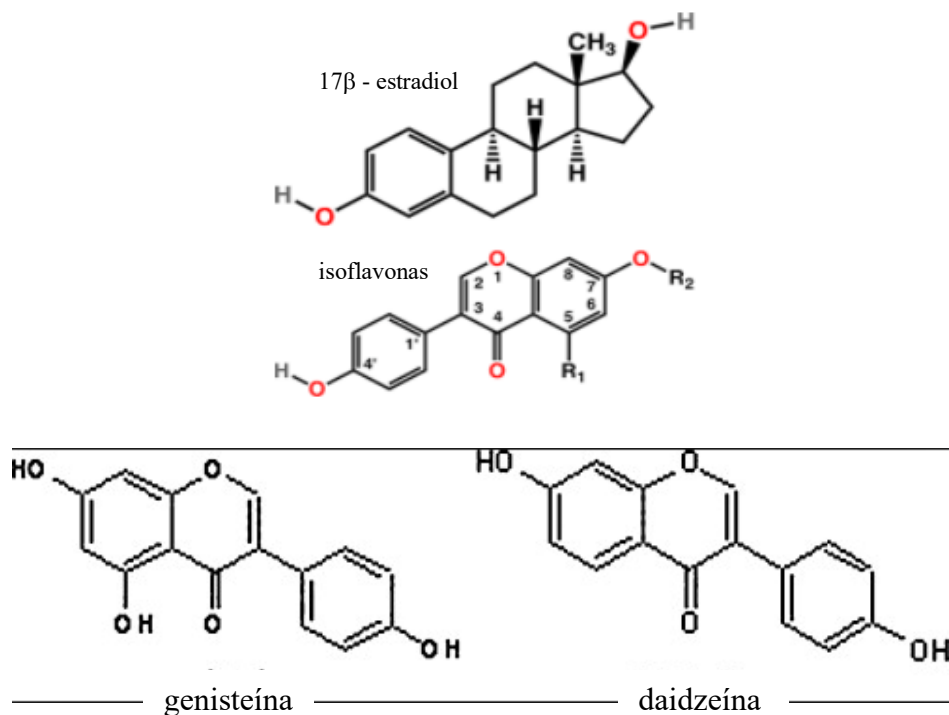


Figura 12. Similitud de la estructura química del estrógeno estradiol y estructura de dos isoflavonas contenidas en la soya en mayor concentración genisteína y daidzeína (Modificado de ⁽¹⁰⁸⁾).

Las isoflavonas, tienen la capacidad de competir con los estrógenos, unirse y activar a los receptores para estrógenos y por lo tanto ejercer acciones estrogénicas, lo que da lugar a una inhibición o promoción de la expresión de genes sensibles a estrógenos ^(74, 109).

Las isoflavonas pueden unirse a ambos receptores, sin embargo, tienen mayor afinidad al receptor ERβ, relacionado con una menor proliferación y por lo tanto un menor riesgo de desarrollo de cáncer a diferencia del ERα, relacionado con una mayor proliferación celular y entre mayor sea la propagación celular mayor será la probabilidad del desarrollo de una célula neoplásica (Figura 13) ^(103, 110).

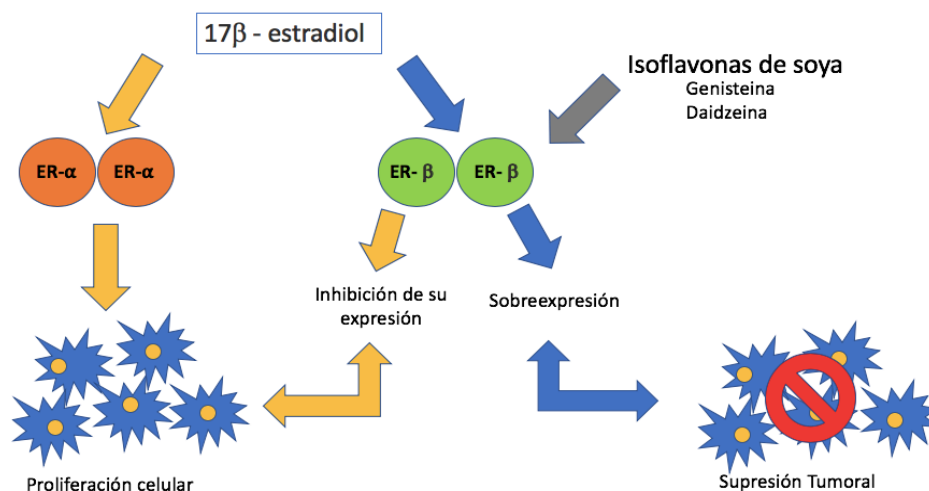


Figura 13. Receptores para los estrógenos relacionados con la proliferación celular tumoral y la supresión tumoral (Modificado de Sareddy G, 2015 ⁽¹⁰³⁾).

Las isoflavonas se encuentran en su forma glucosilada, se ha reportado que debido a que están unidas a glucosa, son solubles, ya que el azúcar cambia su polaridad, estabilidad y favorece su absorción ^(91, 104, 111, 112),

Las principales isoflavonas que están presentes en la soya son (Tabla 5):

Tabla 5. Isoflavonas de soya en su forma como gliconas y como agliconas (Modificado de Zubik L, 2003 ⁽¹¹³⁾).

ISOFLAVONAS DE SOYA	
GLICONA	AGLICONAS
Genistina (4, 5, 7 – trihydroxyisoflavone- 7- glucoside)	Genisteína (4, 5, 7 trihydroxyisoflavona)
Daidzina (7, 4 – dihydroxyisoflavone – 7-glucoside)	Daidzeína (4, 7 – dihydroxyisoflavone)
Glicitina (Glycitein –7-0 -glucoside)	Gliciteína (4' 7- Dihydroxy-6-methoxyisoflavone)

Las concentraciones de las isoflavonas en la soya son: genisteína 60%, daidzeína 30% y gliciteína 10% ⁽⁷³⁾ y se encuentran en la soya de forma natural glucosiladas, se requiere un proceso como la digestión o la fermentación para dar lugar a la aglicona ⁽¹¹⁴⁾. Estas isoflavonas ejercen diferentes efectos quimioprotectores y anticancerígenos ⁽¹⁰⁷⁾, inhiben la angiogénesis, reducen la proliferación celular, inhiben al receptor tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico, inhiben a enzimas que participan en la replicación del DNA como la topoisomerasa II, detienen el desarrollo del ciclo celular en la transición G2 – M e inhiben el proceso de metástasis ^(74, 109).

Además, una de las razones por las que aumenta el interés de la investigación de la soya, es por las bajas cifras de cáncer de mama y de próstata en Asia, reportados en varios estudios epidemiológicos, los cuales sugieren que una alta ingesta de isoflavonas de soya reduce el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer ^(73, 75, 115, 116, 117, 118) y de acuerdo con las estadísticas de Japón reportadas por la OMS, en 2018 el número de casos de cáncer fue de 883 395 (Anexo1). Además, se reportó en un estudio realizado en una población de mujeres adolescentes asiáticas que el riesgo de cáncer de mama es menor cuando se consume la soya ⁽¹⁰⁹⁾.

Sin embargo, algunos estudios epidemiológicos reportan que la migración de asiáticos a países occidentales, ha generado que los asiáticos aumenten el riesgo de cáncer, lo que sugiere que el estilo de vida, como la alimentación, es uno de los factores que intervienen para el desarrollo de cáncer ^(119, 120), lo que coincide con el reporte de la OMS, como se comentó anteriormente, que indica que un tercio de las muertes por cáncer son ocasionadas por factores de riesgo conductuales y dietéticos ⁽³⁾.

PROCESO DE DIGESTIÓN DE LAS ISOFLAVONAS

Después de ser consumida la soya, el proceso de digestión de las isoflavonas se da en cuatro fases:

Absorción: Las isoflavonas se encuentran en diversos alimentos de forma glucosidada (genistina, daidzina y glicitina), después de haber sido ingeridas, éstas ingresan al intestino y dan lugar a las agliconas: genisteína, daidzeína y gliciteína ⁽¹⁰⁶⁾.

Los tiempos de absorción de genisteína y daidzeína varían entre si, siendo de 5.2 horas para genisteína y 6.6 horas para daidzeína mientras que los valores para las formas glucosidadas genistina y daidzina son de 9.3 y 9.0 horas respectivamente. Los tiempos de absorción difieren posiblemente debido a que, en el borde del cepillo intestinal, los glucósidos se metabolizan a la forma aglicona ^(106, 121).

Distribución: La concentración plasmática máxima que alcanzan las isoflavonas ocurre de 4 a 8 horas después su ingesta, la vida media de la genisteína y de la daidzeína es de 7.9 horas en los adultos, ya que se conjugan en el plasma. La genisteína que no es conjugada se encuentra en el 1,1- 1,5% del plasma total y solo el 50% se une a albumina ⁽¹⁰⁶⁾.

Metabolismo: Por lo tanto las agliconas daidzeína, genisteína y gliciteína resultantes, son metabolizadas dando como resultado metabolitos (dihidroequol, 6-hidroxi-o-desmetilangolensina, dihidrodaidzeína, dihidrogenisteína, o-desmetilangolensina), los cuales posteriormente se transportan por la vena porta al hígado donde serán conjugadas con sulfato y ácido glucurónico, mediante la catalización de la UDP- glucoroniltransferasa para dar lugar a ciertas estructuras, en el caso de la genisteína se metaboliza a p-etil fenol y en el caso de la daidzeína a o-demetilangolensina y a equol (7-hidroxi-isoflavona) ^(100, 106). El equol es absorbido en un 50% y tiene acción antioxidante, se ha visto que solo del 30 al 40% de las personas puede metabolizarlo ^(122, 123).

Eliminación: Después de que las isoflavonas pasaron por diferentes procesos, la mayor parte son excretadas por vía fecal y por vía urinaria; en un tiempo aproximado de 6, 12 o 24 horas se excretan cantidades de 3 a 4%, a las 12 horas se excreta más del 50% y se completa su total eliminación a las 48 horas (Figura 14) ^(100,106, 122).

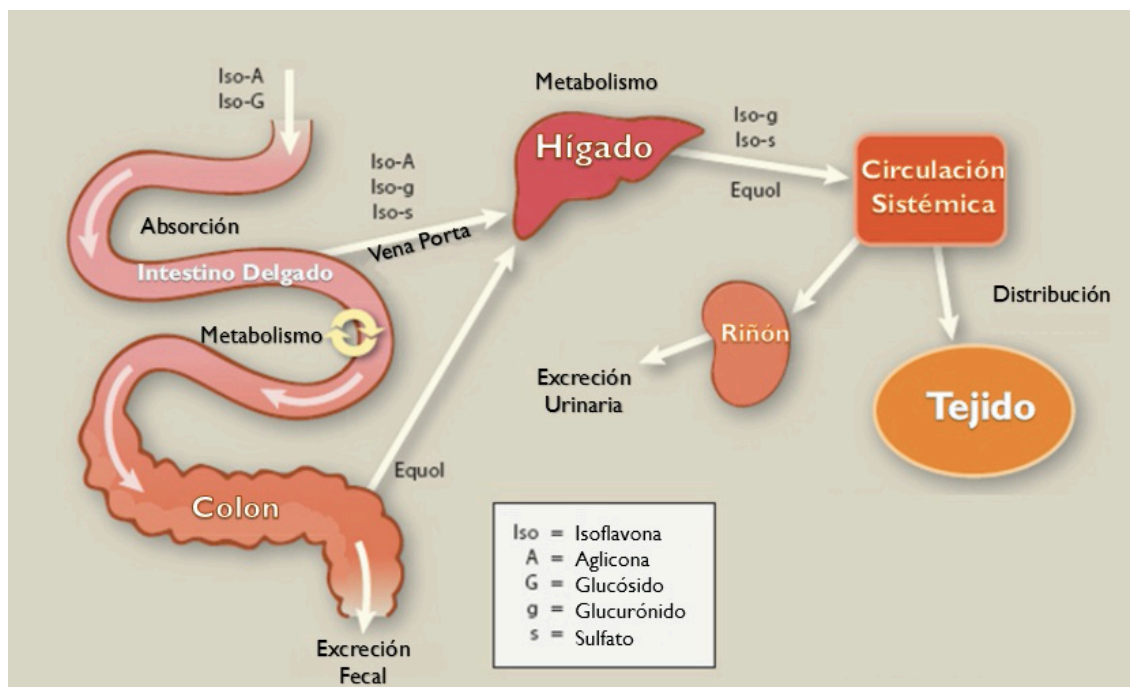


Figura 14. Metabolismo de las isoflavonas. Las isoflavonas ingresan al organismo, cuando entran al intestino, son hidrolizadas por las betaglucosidasas para ser transportadas por la vena porta hacia el hígado para ser metabolizadas para posteriormente ser distribuidas o excretadas por vía urinaria (Recuperado de Cena E, 2011 ⁽¹²⁴⁾).

En el campo de la investigación, de acuerdo con algunos estudios se ha reportado el efecto de las isoflavonas de soya en la disminución de la proliferación celular en líneas

tumorales de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y cervicouterino (HeLa), observando cambios en la morfología celular, apoptosis, fragmentación de núcleo, citoplasma y reducción del volumen celular ⁽⁷⁴⁾.

A continuación, se ampliará la información con respecto a las diferentes isoflavonas y su relación con el cáncer.

4.2.6 GENISTEÍNA Y CÁNCER

En 1928 la genisteína fue sintetizada por Baker y Robinson, y su análisis estructural fue publicado en 1941 por Walter ⁽¹²⁵⁾. Genisteína es la isoflavona más estudiada, ya que tiene una gran influencia en funciones celulares por su unión a los ER ⁽¹²⁶⁾, constituye el 60% de la composición de isoflavonas en la soya ⁽¹²⁷⁾.

Su estructura química es 4, 5, 7-trihidroxiisoflavona y 5, 7-dihidroxi-3- (4-hidroxifenil) cromen-4-ona, tiene una gran solubilidad en solventes polares como dimetilsulfoxidos, acetona, etanol y agua ⁽¹¹²⁾. A nivel de receptores la genisteína compete con el 17- β -estradiol para unirse al receptor de estrógeno, puede unirse en un 4% a ER α y en un 87% a ER β , es decir, tiene mayor afinidad por este último receptor lo que favorece que ejerza acciones similares al del estrógeno ^(103, 112, 125).

Se ha reportado en estudios *in vitro*, que la genisteína tiene la capacidad de inhibir la proliferación y conduce a la apoptosis de células cancerosas, ya que posee actividades quimiopreventivas, antitumorales y estrogénicas ⁽¹²⁸⁾, ya que inhibe a la proteína tirosina quinasa y la topoisomerasa II, las cuales están implicadas en la proliferación celular, sin embargo, altas cantidades de genisteína pueden atenuar la síntesis de DNA y detener el ciclo celular en la transición G2/M ⁽¹²⁶⁾.

En un estudio realizado por Zhou *et al.* ⁽¹²⁸⁾ se reportó que la genisteína disminuyó la migración de células de cáncer de colon HT-29 a una concentración de 200 μ M con una inhibición a las 48 horas modificando mecanismos tumorales ⁽¹²⁸⁾.

En un estudio realizado por Kaushik *et al.* ⁽¹²⁶⁾ trabajaron con genisteína y con un anticonceptivo oral no esteroideo centchroman es un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM) ya que ha demostrado tener acciones anticancerígenas en mamas, ovarios y páncreas; a nivel molecular ha demostrado su acción anticancerígena en células MCF-7 y MDA-MB-231, induciendo la inhibición en el ciclo celular. En este estudio, genisteína en

combinación con centchroman, actúan sinérgicamente ejerciendo un efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, por lo que concluyeron que el empleo de centchroman con genisteína puede ser una buena alternativa en el tratamiento de cáncer de mama ⁽¹²⁶⁾.

En otro estudio reportado por Sareddy *et al.* ⁽¹⁰³⁾, se demostró que la genisteína puede desequilibrar la homeostasis de los dos intestinos por su acción antiproliferativa, inhibiendo a las células cancerosas de colon a través de su unión a los receptores ER β ⁽¹⁰³⁾.

4.2.7 DAIDZEÍNA Y CÁNCER

La daidzeína es la segunda isoflavona más abundante en la soya, constituye el 30% del contenido total de isoflavonas en la soya ⁽¹²⁷⁾.

Se ha reportado que ejerce una inhibición en la proliferación celular, interviniendo en el ciclo celular y la angiogénesis de células cancerígenas ⁽¹²⁷⁾, sin embargo, en comparación con la genisteína aún no existen suficientes estudios que hayan evaluado a la daidzeína independientemente de las demás isoflavonas, pero si esta reportado su participación junto la genisteína.

En un estudio de Chan *et al.* ⁽¹²⁷⁾, se reporta que ambas isoflavonas genisteína y daidzeína junto con ER β -041 disminuyeron significativamente la migración, propagación y proliferación de células de cáncer de ovario induciendo retención en el ciclo celular y la apoptosis: además se redujo la expresión de p-PI3K, p-AKT, p-GSK-3 β y p21, lo que resulta una terapia alternativa para este tipo de pacientes ⁽¹²⁷⁾.

4.2.8 GLICITEÍNA Y CÁNCER

La gliciteína es una isoflavona que constituye aproximadamente del 5-10% del total de isoflavonas en la soya, posee funciones antioxidantes, estrogénicas, hipocolesterolémicas ⁽¹²⁹⁾.

En un estudio realizado por Zhang *et al.* ⁽¹²⁹⁾ demostraron que la gliciteína a 3.5 μ M es citotóxica ya que disminuye la proliferación celular con una menor síntesis de ADN regulando el ciclo celular en la transición de G1-S, induciendo una alteración en la morfología celular, causando un daño a membranas celulares, por lo que sugieren que probablemente existen otros mecanismos de acción en esta línea ⁽¹²⁹⁾.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya se mencionó en los antecedentes, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública en México y en el mundo, representando altas tasas de morbimortalidad. De acuerdo con los resultados reportados por la OMS en 2018 se evidenciaron 9 millones 500 mil defunciones y en México según INEGI en 2016, entre los 3 principales tipos de cáncer reportados que afectaron a la población mexicana adulta se encontraron **tumores digestivos, órganos genitales, tumores de mama.**

Las terapias para tratar el cáncer empleadas hasta este momento, afectan tanto a células sanas como a células cancerosas, por lo que la prevalencia, incidencia e índices de la mortalidad son cada vez más altos y aún están en desarrollo los tratamientos específicos que ayuden a controlarlo. Estos tratamientos son agresivos para los pacientes oncológicos, de tal modo que tanto la enfermedad como el mismo tratamiento, deterioran el estado nutricional del paciente oncológico. La alimentación tiene un papel muy importante durante el tratamiento, ya que el buen aporte nutricional, favorecerá la calidad de vida del paciente, antes, durante y después del tratamiento; sin embargo, actualmente el consumo de alimentos sanos y naturales es limitado, ya que hay mayor acceso a alimentos industrializados que contienen diversas sustancias químicas que pueden contribuir al desarrollo de cáncer.

La soya es un alimento que ha causado un gran impacto social, por sus propiedades nutrimentales y estrogénicas, esto ha generado una controversia, ya que, existen diversas fuentes de información popular que recomiendan su consumo de manera ilimitada lo que puede resultar delicado, especialmente cuando se recomienda a pacientes con cáncer, ya que algunos tumores cancerígenos son hormona dependiente, es decir que poseen receptores para estrógenos que favorecen su crecimiento. En la tradición mexicana, no es frecuente el consumo de platillos orientales a base de soya por ser poco palatables, sin embargo, existen otras fuentes de isoflavonas de soya como los nutraceuticos para ingerir las isoflavonas que contiene la soya y obtener el beneficio de las mismas.

Lo que genera la siguiente pregunta de investigación:
¿Cuál es el efecto de las isoflavonas de soya, sobre el crecimiento de las líneas celulares tumorales MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 y HeLa?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

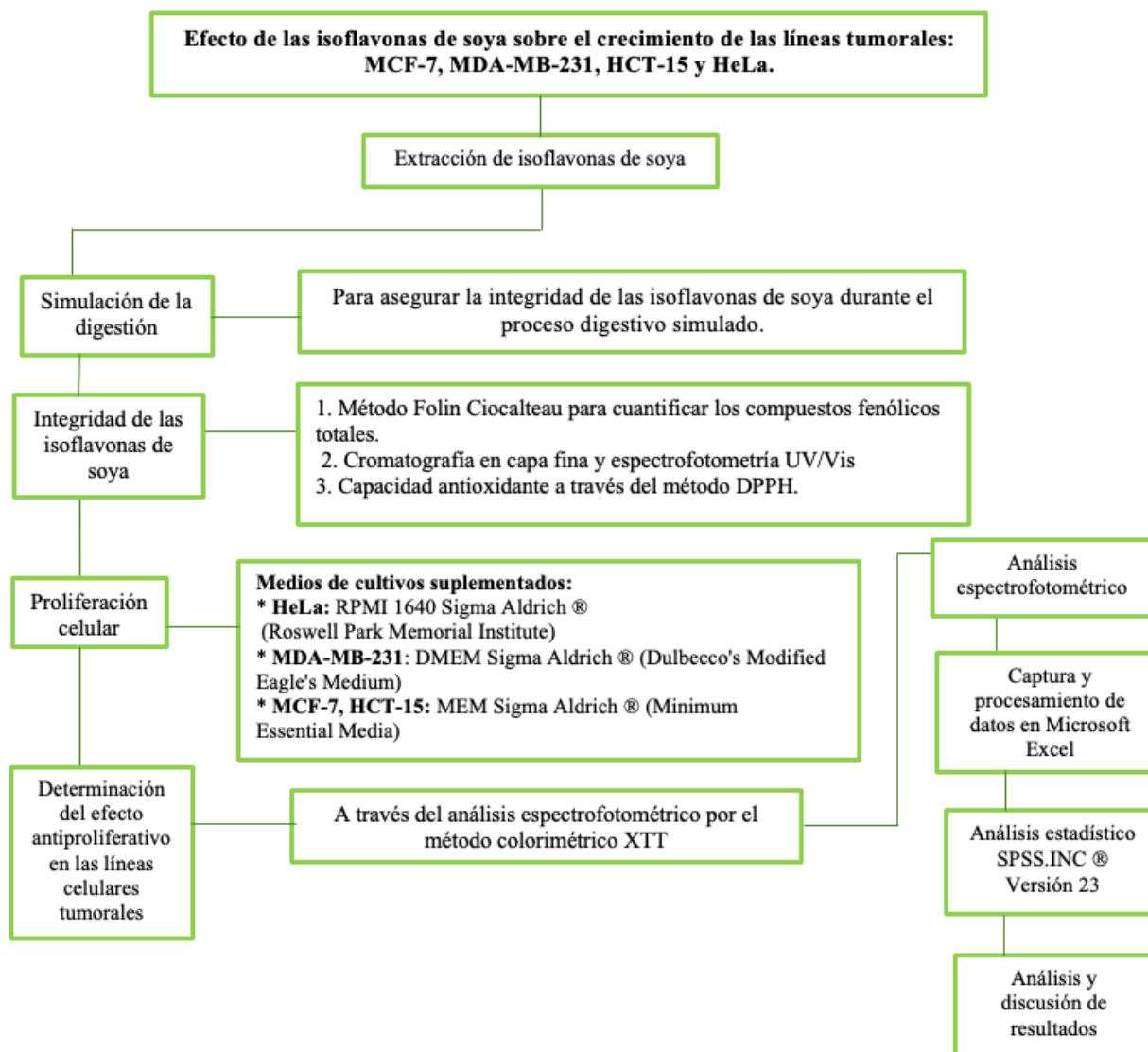
Determinar el efecto de las isoflavonas de soya en el crecimiento de las células de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 y HeLa.

5.2 Objetivos Particulares

- Comprobar la integridad y funcionalidad de las isoflavonas de soya después de una digestión simulada.
- Determinar el efecto antiproliferativo en las líneas celulares tumorales.
- Determinar la dosis letal media de las isoflavonas de soya sobre las líneas tumorales MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 y HeLa.
- Comparar el efecto de las isoflavonas de soya en las líneas celulares tumorales de cáncer de mama: MCF-7 y MDA-MB-231.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia de trabajo



6.2 Tipo de estudio

Tabla 6. Tipo de estudio.

Tipo de Estudio	
Por el objetivo	Comparativo: Se comparó el efecto de las isoflavonas sobre las líneas celulares tumorales de cáncer de mama.
Por la intervención	Experimental: Se realizaron experimentos en modelos <i>in vitro</i> , líneas celulares.
Por la temporalidad	Longitudinal: Se realizó en un lapso definido.
Por la obtención de datos	Prolectivo: Se obtienen los datos en el laboratorio.
Por componentes del grupo	Homodémico: Solo se usaron grupos <i>in vitro</i>

6.3 Ubicación espacio temporal

Los experimentos de este estudio se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el Laboratorio del Jardín Botánico del Instituto de Ciencias Ciudad Universitaria.

6.4 Selección de la muestra poblacional

La población está conformada por:

* Líneas celulares de distintos tipos de cáncer: cáncer de mama luminal A (MCF-7), cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231), cáncer de colon (HCT-15) y cáncer cervicouterino (HeLa), las cuales fueron obtenidas de la Empresa American Type Culture Collection ® de los Estados Unidos de América.

* Cápsulas de isoflavonas de soya de la marca GNC SUPERFOODS SOY ISOFLAVONE CONCENTRATE.

4.3.1 Criterios de selección de la muestra

4.3.1.1 Criterios de inclusión

* Las líneas celulares se seleccionaron de acuerdo con los tipos de cáncer que más afectan a la población y de acuerdo con la presencia de receptores para estrógenos en los órganos.

* El nutracéutico de isoflavonas de soya se seleccionó por ser la marca más empleada y disponible en tiendas naturistas.

Lotes: Frasco 1: 4750IP4191 09/18

Frasco 2: 6770LR4191 01/21

4.3.1.2 Criterios de exclusión

Cultivos celulares de otros tipos de cáncer.

4.3.1.3 Criterios de eliminación

Cultivos celulares contaminados.

4.3.1.2 Definición de las variables y escalas de medición

Tabla 7. Definición de variables y escalas de medición

Variables del estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidades de escala
Viabilidad celular	Se refiere a la cantidad de células que sobreviven o no presentan citotoxicidad al contacto con alguna sustancia en específico	Será evaluada empleando el Kit de ensayo XTT	Cuantitativa continuo	Porcentaje
Cuantificación de compuestos fenólicos	Se refiere a la cuantificación de componentes fenoles contenidos en el nutracéutico.	Se cuantificará mediante el Método Folin Ciocalteau	Cuantitativa continua	Concentración μM
Integridad de las isoflavonas	Se refiere a la presencia de isoflavonas de soya después de un proceso de digestión simulada	Se determinará su presencia mediante cromatografía en capa fina y espectrofotometría UV/Vis.	Cromatografía: Cualitativa nominal dicotómica Espectrofotometría UV/Vis: Cuantitativa continua	0= sin 1= con Absorbancia
Capacidad antioxidante	Se refiere a una molécula que tiene la capacidad de retardar la generación de radicales libres.	Se determinará empleando un radical libre DPPH.	Cuantitativa continua	Porcentaje

6.5 Técnicas y procedimientos

Los procedimientos se detallan a continuación, los experimentos con las líneas celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Se emplearon dos frascos, cada uno con 60 cápsulas de isoflavonas de soya de diferentes lotes del suplemento GNC SUPERFOODS SOY ISOFLAVONE CONCENTRATE, (0.67 g de polvo por cápsula).

Frasco 1: Lote 4750IP4191 09/18 y Frasco 2: 6770LR4191 01/21

Se homogeneizó el polvo de las 120 cápsulas, se trabajó con la porción recomendada del mismo, el peso correspondiente a 2 cápsulas (1.34 g), todos los experimentos se realizaron por triplicado.

1. SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN (Modificado de Minekus M *et al*, 2014 ¹³⁰)

En la investigación básica se han empleado modelos *in vitro* que simulan procesos de digestión, imitando condiciones fisiológicas *in vivo*, tomando en cuenta la presencia de enzimas, pH y tiempo de digestión con el objetivo de estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos o fármacos, en este caso se hizo una simulación de la digestión de las isoflavonas de soya con el objetivo de determinar si después de esta simulación, aún mantienen su actividad biológica.

La porción recomendada del nutraceutico, 2 cápsulas (1.34 g), se sometió a un fluido gástrico con volumen final de 500 ml con un pH de 3, se dejó incubando en agitación a 1200 rpm por 2 horas a 37 °C, pasando ese tiempo de incubación se puso en contacto con un fluido intestinal a un pH de 7, se dejó incubando por 2 horas en agitación a 1200 rpm. La composición de los fluidos es la siguiente:

Tabla 8. Composición de los fluidos de la digestión simulada.

Fluido Gástrico		Fluido Intestinal	
Pepsina	2000 U/ ml	Betaglucosidasas	2000 U/ml
Fosfolípidos	0,17 mM	Lipasa	2000 U/ml
KCl	6900 μM	Tripsina	100 U/ml
KH ₂ PO ₄	900 μM	Amilasa Pancreática	2000 U/ ml
NaHCO ₃	25 000 μM	Quimotripsina	25 U / ml
NaCl	200 μM	Lipasa Pancreática	2,000 U / ml
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	100 μM	Bilis	10 mM
(NH ₄) ₂ CO ₃	500 μM	KCl	6.8 mM
		KH ₂ PO ₄	0.8 mM
		NaHCO ₃	85 mM
		NaCl	38.4 mM
		MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.33 mM

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE ¹³¹)

La extracción asistida por microondas se realizó con el objetivo de extraer las isoflavonas y sus metabolitos, después de ser sometidos a una digestión simulada, considerando que son los que se absorberían a nivel intestinal.

Las microondas consisten en ondas electromagnéticas de alta frecuencia, situadas en regiones infrarrojas y de radio - frecuencia, oscilan entre 0,3 – 300 GHz. Consiste en

un calentamiento que va desde el interior hasta el exterior del cuerpo que está siendo calentado, es decir, en este caso las isoflavonas del producto de la digestión simulada. El equipo empleado Microwave Syntesis Reactor, Monowave 300 Anton, cuenta con (Figura 15):

- Un panel para la selección de las condiciones de extracción
- Un carrusel giratorio para colocar hasta 10 cámaras de extracción
- Un sistema de agitación
- Un sistema de seguridad de la presión



Figura 15. Equipo para la Extracción Asistida por Microondas

Procedimiento

1. El producto de la digestión simulada se lleva a pH fisiológico de 7.3 con PBS 1X, se coloca en un tubo para MAE, sellándolo completamente con una tapa con filtro.
2. Se verifica que el medidor de aire esté conectado al equipo, y que esté en un rango de 5.6 a 6.
3. El tubo para MAE, se coloca en la cámara de extracción y se programa el equipo a un punto de ebullición de 190° C por 3 minutos.
4. Se llevó a cabo la extracción de las isoflavonas de soya manteniendo una agitación a 600 rpm en una atmósfera entre 11 y 13 bares, sin sobrepasar 20 bares.
5. Pasado el tiempo de extracción, se esperaron 9 minutos, hasta llegar a una temperatura de 55° C. El polvo obtenido se deja secar y se reconstituye en el medio de cultivo correspondiente y se filtra en condiciones de esterilidad para su uso.

2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES. MÉTODO COLORIMÉTRICO DE FOLIN-CIOCALTEAU (Modificado de Slinkard K. & Singleton VL¹³²)

Este método colorimétrico se utilizó para cuantificar los compuestos fenólicos totales que están presentes en el polvo de las cápsulas, y el extracto posterior a la simulación de la digestión. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene volframato sódico y molibdato sódico, los cuales van a reaccionar con los compuestos fenólicos a través de una reacción redox (Figura 16) para dar lugar a una coloración azul la cual, se leerá espectrofotométricamente a 750 nm para posteriormente determinar la capacidad antioxidante.

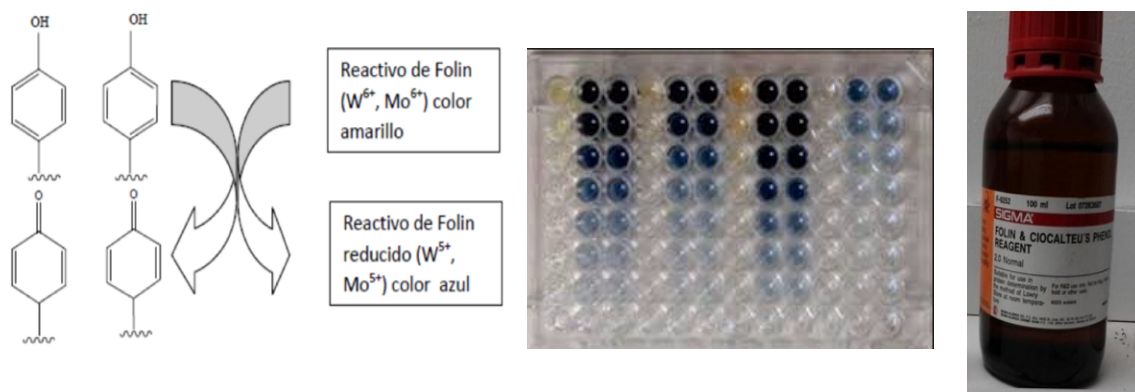


Figura 16. Reacción redox de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin Ciocalteau

Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Para la preparación del reactivo Folin-Ciocalteau: Se pesó en una balanza 0.35 g de carbonato de sodio, se aforó a un volumen de 8 ml de agua desionizada. Se hizo una dilución 1/10 a 4° C del reactivo Folin-Ciocalteau. Después se prepara una mezcla de 1250 μ L de Folin-Ciocalteau, 1000 μ L de carbonato de sodio y 250 μ L de agua desionizada.
2. Para la preparación de ácido gálico se pesó 0.46 g y se aforó a un volumen de 1 ml de agua desionizada.

3. Para realizar la curva patrón se empleó una caja de 96 pozos, a cada pozo se agregaron 200 μL de volumen final, de los cuales se agregaron concentraciones crecientes de 20 a 90 μL de ácido gálico, 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y la cantidad restante de agua. En otros pozos de la misma placa se agregaron 50 μL del extracto de isoflavonas, 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu y 50 μL de agua.
4. Se dejó en oscuridad por 2 horas y después se procedió a leerlo espectrofotométricamente a 750 nm.

3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (Modificado de Stahl E, 1979 ¹³³)

La cromatografía en capa fina es una técnica para la separación y la identificación de compuestos presentes en una mezcla, en este caso, se empleó con el objetivo de observar la presencia de isoflavonas de soya después de una digestión simulada.

PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA

1. En microtubos para centrifuga estériles con capacidad de 1.5 ml, se agregaron 0.001g de estándar de Genisteína (10005167) en uno de los microtubos y 0.002g de estándar de Daidzeína (10005166) en el otro microtubo, ambos estándares son de CAYMAN CHEMICAL COMPANY ® (Figura 17).
2. La daidzeína se disolvió en cloruro de metileno/etanol (2/1) y la genisteína se disolvió en cloroformo/etanol (2/1).



Figura 17. Estándar de Genisteína y Daidzeína

COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL

1. Acetato de Etilo 50 ml
2. Agua 45 ml
3. Ácido Acético 5 ml

APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Se emplearon placas de aluminio con silica gel con indicador fluorescente 254 nm de Fluka Analytical Silica gel para TLC.
2. Se recortaron placas de 5 x 3 cm.
3. Se colocaron cuatro puntos de aplicación con una separación de 0.5 cm del borde y entre ellos, a lo ancho de la placa. En el primer punto con ayuda de un capilar se aplicaron 10 µl del estándar de genisteína, en el segundo punto se aplicaron 10 µl del polvo de cápsulas, en el tercer punto se aplicaron 10 µl de la digestión simulada, en el cuarto punto se aplicaron 10 µl de una dilución de la digestión simulada después de MAE y en el quinto carril se aplicó 10 µl del estándar de daidzeína. Se eluyó la placa, empleando la fase móvil ya antes mencionada.
4. Se observó que fue eluyendo, (Figura 18). La placa se retiró cuando le faltaban 5 cm al frente del disolvente para llevar al borde de la placa, la placa se retiró y se secó.

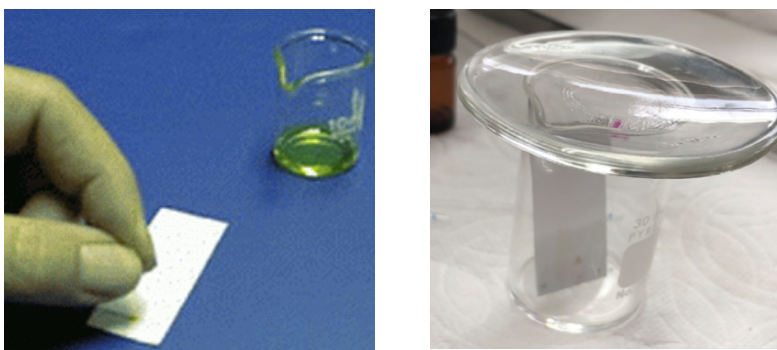
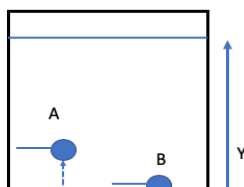


Figura 18. Cromatografía en capa fina. A) Aplicación de la muestra en la placa de silica gel.
B) Elución de las isoflavonas de soja a través de la placa.

5. Con ayuda de una pinza, la placa se sostiene y se observa bajo la luz ultravioleta de onda corta a 254 nm.
6. Después se determina el Rf. El Rf se define como la relación de las distancias recorridas por el soluto (en este caso las isoflavonas) y por el eluyente (fase móvil) desde el origen de la placa (Figura 19). De acuerdo con la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto a identificar (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$



4. ESPECTROFOTOMETRÍA UV VISIBLE (Modificado de Hirt R, 1956¹³⁴)

Se realizó un espectro UV/Vis con la finalidad de identificar la presencia de isoflavonas de soya en el polvo de cápsulas y después de la digestión simulada. La espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/Vis) es una de las técnicas analíticas más empleadas ya que es muy versátil y capaz de detectar casi cualquier molécula. Con la espectrofotometría UV-Vis, la luz de UV-Vis que va de 100 hasta 700 nm, pasa a través de una muestra y se mide la transmitancia de la luz por la muestra (Figura 20). De la transmitancia (T), la absorbancia se puede calcular como $A = -\log(T)$. Un espectro de absorbancia muestra la absorbancia de un compuesto en diferentes longitudes de onda. La cantidad de la absorbancia a cualquier longitud de onda es debida a la estructura química de la molécula.

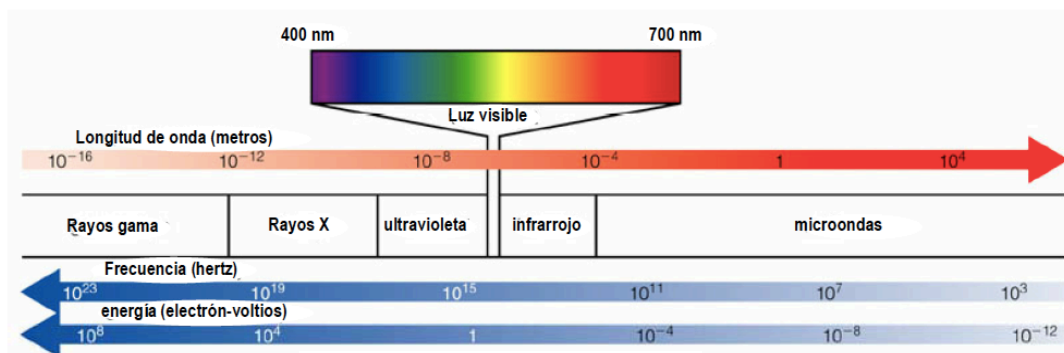


Figura 20. Espectrofotometría UV/ Vis

Para ello se utilizaron soluciones madre o stock de estándares de Genisteína y Daidzeína, ya previamente preparadas, en un microtubo se agregó 0.001g de estándar de Genisteína (10005167 CAYMAN CHEMICAL COMPANY ®) disuelta en cloroformo/etanol (2/1) y en otro microtubo se agregó 0.002g de estándar de Daidzeína (10005166 CAYMAN CHEMICAL COMPANY ®) disuelta en cloruro de metileno/etanol (2/1)

El espectro UV/Vis se realizó en un nano espectrofotómetro Thermo Scientific Nanodrop™ 2000/2000 c. Para lo cual se colocó primero 1µl de agua desionizada para calibrar el equipo (Figura 21), se seca y se coloca 1 µl del stock de genisteína y se lee el espectro de 200 a 800 nm. Posteriormente se hizo el mismo procedimiento con el estándar de daidzeína y los extractos.

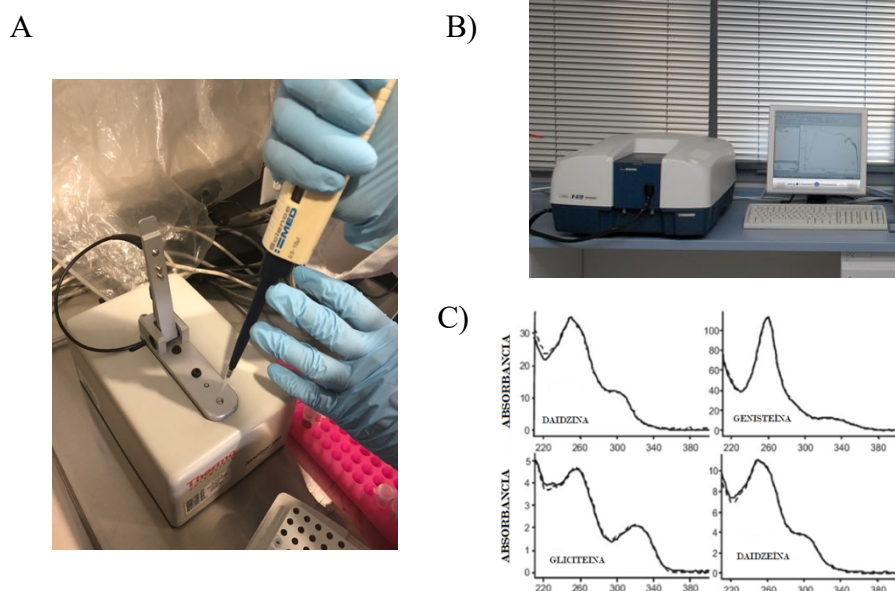
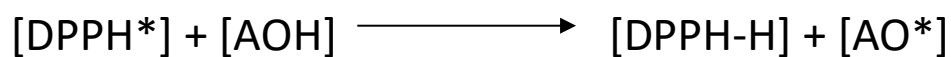


Figura 21. Equipo de espectrofotometría UV/ Vis A) colocación de muestra en el Nanoespectrofotómetro B) Espectrofotómetro C) Espectros de isoflavonas

5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH (Modificado de Prieto JM, 2015¹³⁵)

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas, la más confiable es la que emplea el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por sus siglas como el método de DPPH (Sigma-Aldrich D9132).

Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por ceder un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante, este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo. La reacción antes descrita, entre el DPPH y un antioxidante, se representarla a continuación:



Las condiciones de ensayo en que se determina la capacidad antioxidante se describen por la siguiente ecuación:

$$\delta[\text{DPPH}^+]/\delta t = k_{\text{Abs}} [\text{DPPH}^*]_t$$

1. Se emplearon las isoflavonas de soja que fueron sometidas al proceso de digestión.
2. Se empleó DPPH en una concentración 0.1 mM en metanol grado HPLC.

Procedimiento:

	1 MeOH + DPPH	2 MeOH + DPPH	3 Estándar genisteína	4 Estándar genisteína +DPPH	5 Estándar daidzeína	6 Estándar daidzeína +DPPH	7 Simulación de digestión	8 Simulación de digestión + DPPH	9	10	11 MeOH	12 MeOH + DPPH
A	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	Genisteína 200 µL	Genisteína 200 µL	Daidzeína 200 µL	Daidzeína 200 µL	Digestión 200 µL	Digestión 200 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
B	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
C	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
D	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
E	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
F	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
G	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL
H	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL	MeOH 100 µL			MeOH 100 µL	MeOH 100 µL

Figura 22. Adición de isoflavonas de soja y metanol a caja de pozos

1. En una caja de 96 pozos se colocaron las siguientes cantidades de isoflavonas y metanol grado HPLC.
2. Con una micropipeta multicanal se tomaron 100 µl de la primera fila de pozos y se transfirieron a la segunda fila de pozos re suspendiendo de 4 a 5 veces.
3. Se transfirieron 100 µl de la segunda fila a la tercera fila y así sucesivamente descartando los últimos 100 µl.

4. Se adicionaron 100 µl de DPPH 0.1 mM a cada pozo de la placa de la columna 1 a la columna 7.

	1 MEOH + DPPH	2 MEOH + DPPH	3 Estándar genisteína	4 Estándar genisteína +DPPH	5 Estándar daidzeína	6 Estándar daidzeína +DPPH	7 Simulación de digestión	8 Simulación de digestión + DPPH	9	10	11 MEOH	12 MEOH + DPPH
A	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 200 µg/ml	Genisteína 200 µg/ml	Daidzeína 200 µg/ml	Daidzeína 200 µg/ml	Digestión 200 µg/ml	Digestión 200 µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 100 µM
B	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 100 µg/ml	Genisteína 100 µg/ml	Daidzeína 100 µg/ml	Daidzeína 100 µg/ml	Digestión 100 µg/ml	Digestión 100 µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 50 µM
C	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 50 µg/ml	Genisteína 50 µg/ml	Daidzeína 50 µg/ml	Daidzeína 50 µg/ml	Digestión 50 µg/ml	Digestión 50 µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 25 µM
D	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 25 µg/ml	Genisteína 25 µg/ml	Daidzeína 25 µg/ml	Daidzeína 25 µg/ml	Digestión 25 µg/ml	Digestión 25 µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 12.5 µM
E	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 12.5 µg/ml	Genisteína 12.5 µg/ml	Daidzeína 12.5 µg/ml	Daidzeína 12.5 µg/ml	Digestión 12.5 µg/ml	Digestión 12.5 µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 6.25 µM
F	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 5.25 µg/ml	Genisteína 5.25 µg/ml	Daidzeína 6.25 µg/ml	Daidzeína 6.25 µg/ml	Digestión 6.25 µg/ml	Digestión 6.25 µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 3.125µM
G	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 3.125µg/ml	Genisteína 3.125µg/ml	Daidzeína 3.125µg/ml	Daidzeína 3.125µg/ml	Digestión 3.125µg/ml	Digestión 3.125µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 1.075µM
H	DPPH 0.1mM	DPPH 0.1 mM	Genisteína 1.075µg/ml	Genisteína 1.075µg/ml	Daidzeína 1.075µg/ml	Daidzeína 1.075µg/ml	Digestión 1.075µg/ml	Digestión 1.075µg/ml			DPPH 100 µM	DPPH 100 µM

Figura 23. Adición de DPPH a caja de pozos

5. La placa tapa y se cubre con papel aluminio para evitar la evaporación y proteger al DPPH de la luz.

6. La placa se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos.

7. Pasado el tiempo de incubación se determinó la absorbancia a 500 nm.

Porcentaje de radical libre= $100 \times \frac{[(\text{Abs muestra +DPPH}) - (\text{Abs muestra})]}{[(\text{Abs DPPH}) - (\text{Abs Solvente})]}$

[(Abs DPPH) – (Abs Solvente)]

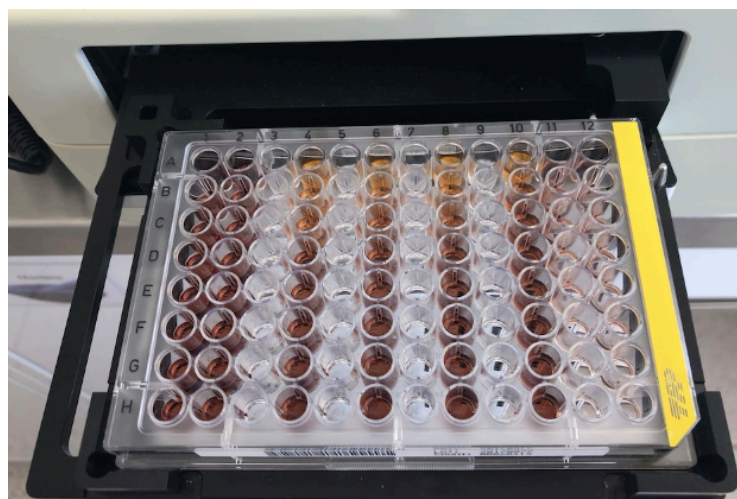


Figura 24. Caja de 96 pozos con isoflavonas de soja con el radical DPPH.

6. TÉCNICA DE CULTIVOS CELULARES (Modificado de ATCC, 2019 ¹³⁶)

Se descongeló un criovial de cada línea celular (MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 y HeLa) (Figura 25A) y se procedió a centrifugar cada uno por 10 minutos a 1,500 rpm. Se retiró el sobrenadante que contiene principalmente suero fetal bovino y dimetilsulfoxido al 10% (DMSO). La pastilla se re suspendió en 2 ml de medio RPMI 1640 Sigma Aldrich® (Figura 25 B) y la suspensión se pasó a una caja T-25. Se agregaron 3 ml más de medio hasta cubrir completamente la superficie de la caja (Figura 25 C). El medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino al 10%, 1% de mezcla de antibiótico y antimicótico y 1% L-glutamina. Después se observaron al microscopio para ver la cantidad de células y viabilidad de las mismas (Figura 25 D), se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% (Figura 21E) el medio de cultivo se cambió cada 48 horas.



Figura 25 A). Criovial con células



Figura 25 B). Medios de cultivos utilizados

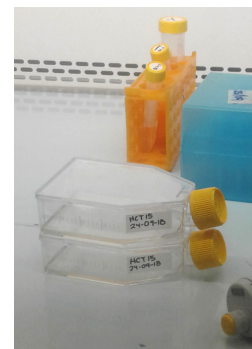


Figura 25 C). Cajas T-25 con líneas celulares

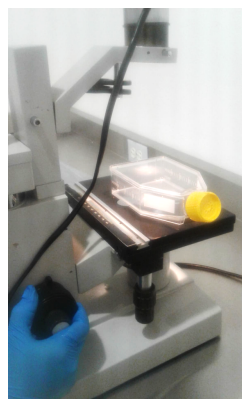


Figura 25 D). Microscopio invertido y cámara digital



Figura 25 E). Incubadora de CO₂

Figura 25. Cultivos celulares. A) Criovial con células. B) Medios de cultivo utilizados, C) Cajas T-25 con líneas celulares, D) Microscopio invertido y cámara digital. E) Incubadora de CO₂.

Los cultivos celulares se observaron al microscopio cada 24h, Cuando se obtuvo una confluencia celular de 80% como lo muestra la figura 26, se separaron de la caja empleando Solución de Tripsina- EDTA 10 X, 5.0 g tripsina porcina y 2g EDTA 4Na por litro y 0.9% cloruro de sodio, para proceder al conteo celular.

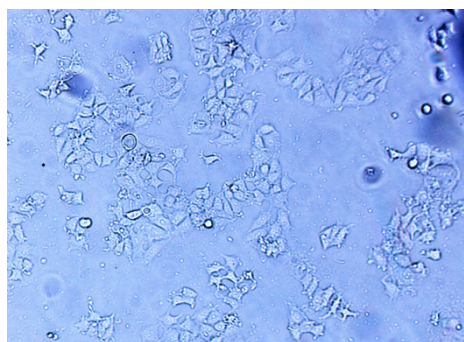


Figura 26 A)
MCF-7 (ATCC®-HTB-22)

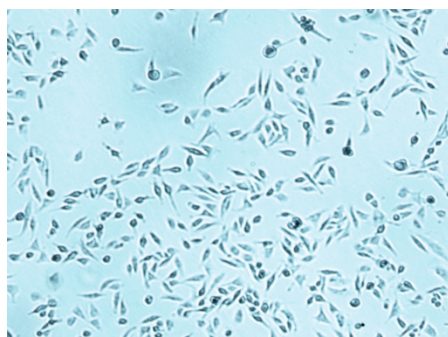


Figura 26 B)
MDA-MB-231 (ATCC®-CRM-HTB-26)

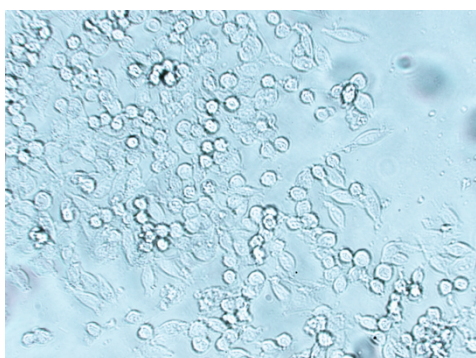


Figura 26 D)
HCT-15 (ATCC®-CRM-HTB-26)

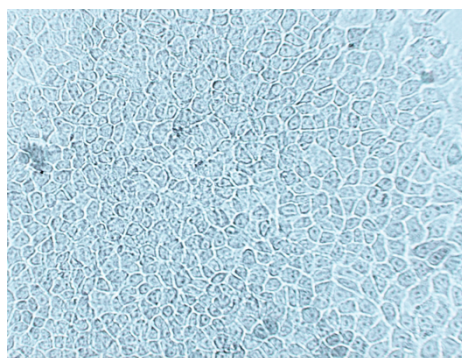


Figura 26 C)
HeLa (ATCC®-CRM-CCL-2)

Figura 26. Diferentes grados de confluencia en líneas celulares A). MCF-7 (ATCC®-HTB-22), **B)** MDA-MB-231 (ATCC®-CRM-HTB-26), **C)** HeLa (ATCC®-CRM-CCL-2), **D)** HCT15 (ATCC®-CRM-HTB-26)

CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR (Modificado de Phillips JM, 1973 ¹³⁷).

Para el conteo celular se empleó azul de tripán, el cual es un colorante azóico que permite diferenciar a través de la tinción a células vivas y muertas, las células muertas se observan en el microscopio de color azul y las células vivas con su membrana integra sin teñir. Se empleó una cámara de Neubauer, con 0.1 mm de profundidad figura 27 A).

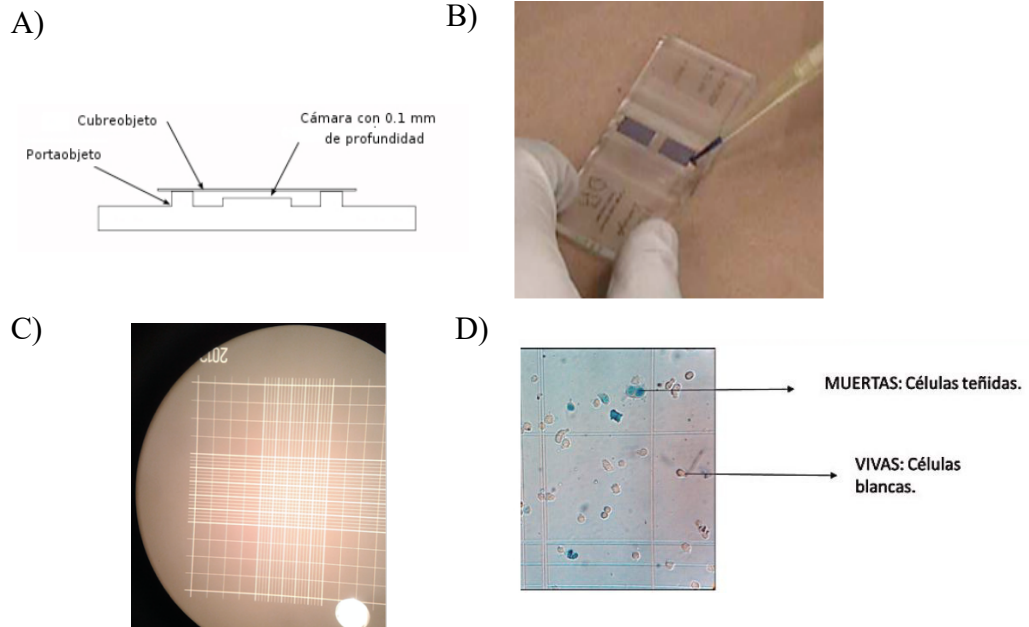


Figura 27. Conteo celular. A) Preparación de la cámara de Neubauer, B) Llenado del hemocitómetro, C) Cuadrícula microscópica, D) Células vivas (blanco) y células muertas (azul).

Esta cámara cuenta con una cuadrícula microscópica, en cada esquina se encuentran cuatro cuadros, cada uno de 1mm² con 16 cuadros de 0.0625 mm² donde se podrá localizar a las células. En un tubo eppendorff estéril se colocan 90 µl de la suspensión celular y 10 µl de azul de tripán y se mezclan. El cubreobjetos se adhiere a la cámara y posteriormente se colocan 10 µl en cada una de las hendiduras de la cámara sin mover el cubreobjetos como se muestra en la figura 27 A.

Se observa al microscopio y se procede al conteo de células vivas de los 5 cuadros centrales y se calcula la concentración de células en la suspensión con la siguiente fórmula.

$$\text{Células /}\mu\text{l} = (\text{No. de células}) / [\text{superficie contada (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad de la cámara (mm)}] * \text{Dilución}$$

Kit de Ensayo de Proliferación de células XTT (sodium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) (Modificado de Meshulam, 1995 ¹³⁸)

Es un ensayo colorimétrico para la cuantificación no radioactiva de la viabilidad celular. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas van a reducir la sal de tetrazolio a cristales de formazán, el cual es un metabolito soluble de color rojo-naranja. El formazán tiene una absorbancia a 500 nm.

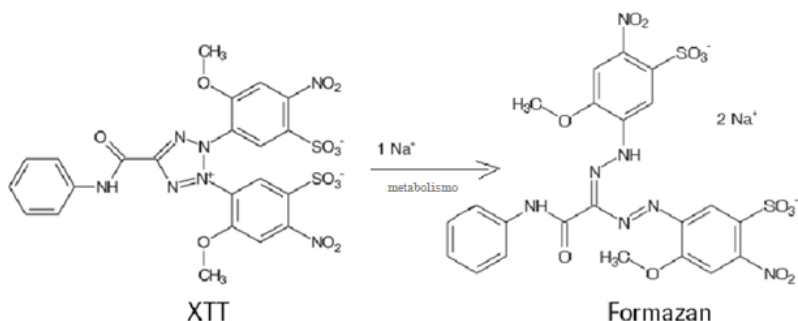


Figura 28. Reacción química XTT. Reducción de sal de tetrazolio a cristales de formazán

1. Se prepararon 4 cajas de 96 pozos para cada una de las líneas celulares.
2. Se sembraron 5,000 células (100 μ L) / pozo en cada uno de los pozos de las 4 cajas y se incubaron por 24 horas.
3. Pasando las 24 horas, se retiró el medio de cultivo de cada pozo.
4. Se agregaron diferentes concentraciones de isoflavonas de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 220 μ M / pozo, por triplicado (Figura 29), complementando con medio de cultivo suplementado cada pozo, con la finalidad de tener un volumen final de 200 μ l y se incubó por 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	121 μ M	141 μ M	161 μ M	181 μ M	201 μ M	221 μ M
B	0 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	121 μ M	141 μ M	161 μ M	181 μ M	201 μ M	221 μ M
C	0 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	121 μ M	141 μ M	161 μ M	181 μ M	201 μ M	221 μ M

Figura 29. Concentraciones de isoflavonas sobre las líneas celulares

5. Pasando el tiempo de incubación, se prepara el Reactivo XTT mezclando reactivo de marcaje XTT 5ml y reactivo de acople de electrones 100 μ l. Después se adicionan 50 μ L/pozo del reactivo XTT preparado.

6. Se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 4 horas. Pasando el tiempo se observó un cambio de color y se determina la absorbancia a 500 nm.

7. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados por triplicado para determinar la dosis letal media de las 4 líneas celulares se almacenaron en una base de datos de Microsoft Excel para la elaboración de las gráficas, mismos que fueron codificados para las pruebas estadísticas realizadas en el programa Statistical Package for the Social Sciences SPSS. INC® Versión 23.

Se empleó la prueba estadística ANOVA (por sus siglas en ingles **AN**alysis **Of** **V**ariance) por prueba post hoc Bonferroni, utilizando un valor significativo $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

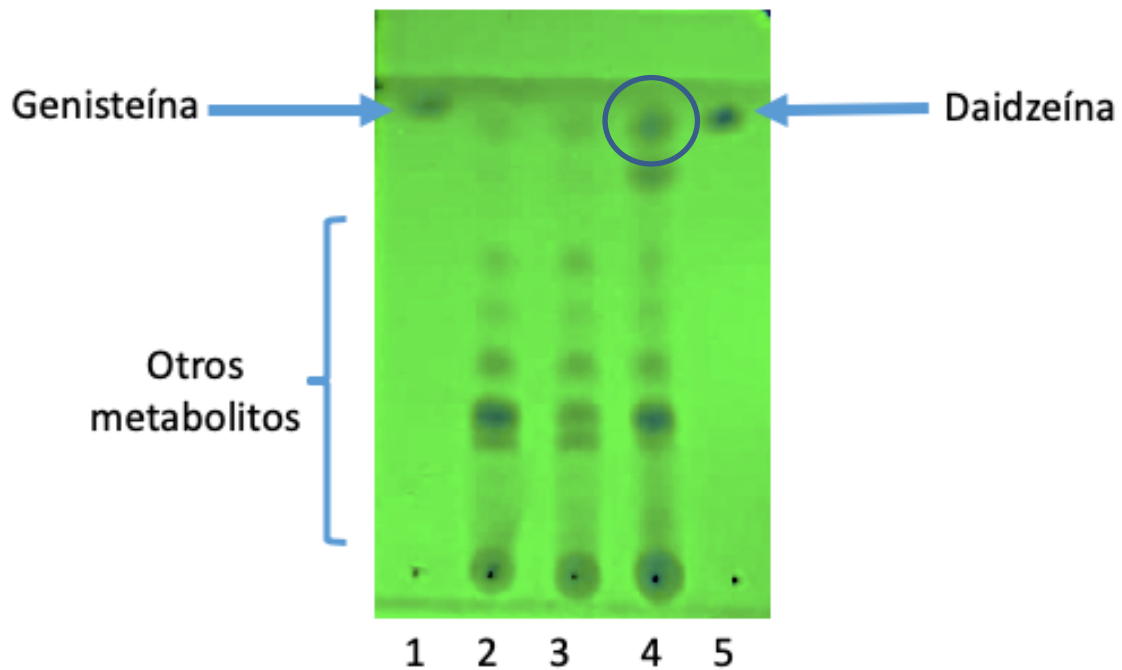
Se evaluó el efecto de las isoflavonas de soya de un nutracéutico comercial, sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales, de cáncer de mama, de colon y cervicouterino. El experimento se realizó en 3 etapas; la primera etapa corresponde a la determinación de la presencia y funcionalidad de las isoflavonas de soya después de una digestión simulada, la segunda etapa corresponde a la determinación del efecto antiproliferativo de las isoflavonas de soya sobre las líneas celulares de cáncer y finalmente en la tercera etapa se realizó el análisis de los resultados.

1º Etapa: Determinación de la integridad de las isoflavonas de soya posterior a una digestión simulada

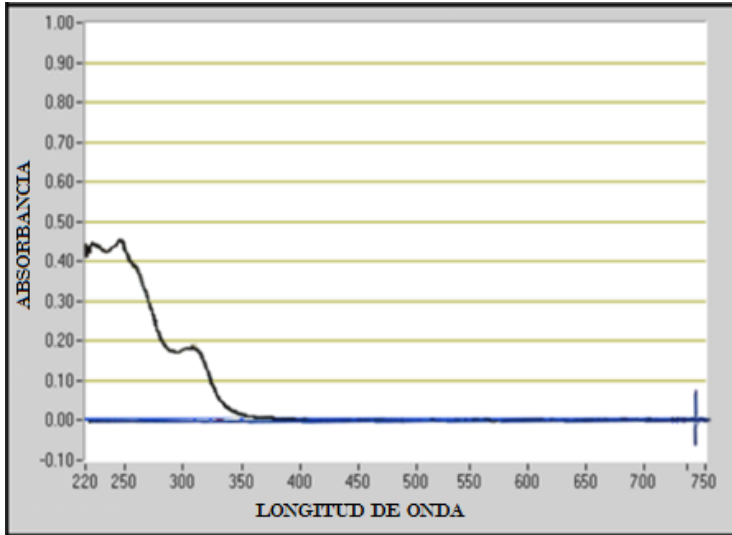
Los primeros resultados corresponden a la determinación de la integridad de las isoflavonas después de una digestión simulada, lo cual se identificó a través de cromatografía en capa fina, se observó la presencia de genisteína y daidzeína, y de otros metabolitos que pueden ser derivados tanto de genisteína, como de daidzeína y gliciteína (figuras 30).

En la figura 30, se puede observar la placa de cromatografía en capa fina. En la parte inferior se encuentran los 5 puntos de aplicación:

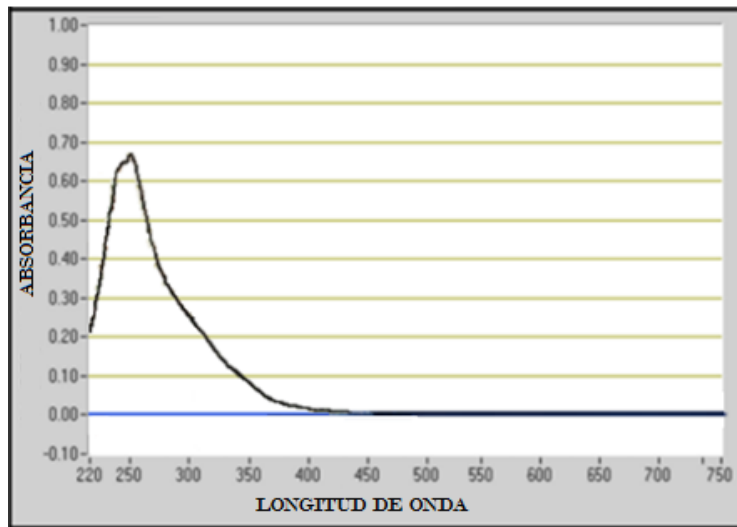
- **Carril 1:** Estándar de genisteína 1mg/ml
- **Carril 2:** Polvo del extracto crudo
- **Carril 3:** Producto de la digestión simulada concentrada
- **Carril 4:** Producto de la digestión simulada después de MAE
- **Carril 5:** Estándar de daidzeína 1 mg/ ml
- **Fase móvil:** Acetato de etilo 50 ml, Agua 45 ml y Ácido Acético 5 ml



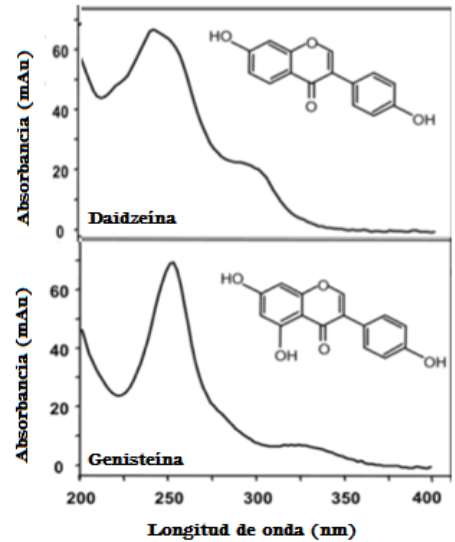
Después de identificar la presencia de isoflavonas de soya tras la digestión simulada a través de la cromatografía en capa fina, se realizó una espectrofotometría UV/Visible, con la finalidad de observar la presencia de ambas isoflavonas. En la figura 31 se presentan los resultados, tanto en el panel A como en el B, se pueden observar los espectros UV/Vis de los dos estándares genisteína y daidzeína, el eje de las “x” corresponde a la longitud onda en nanómetros y el eje de la “y” corresponde a la absorbancia.



A) Espectro UV/ Vis Daidzeína. Como se puede observar el espectro de daidzeína coincide con el reportado en la literatura



B) Espectro UV/ Vis Genisteína. Como se puede observar el espectro de Genisteína coincide con el reportado en la literatura.



C) Espectro UV / Vis reportado por Vacek y colaboradores, ⁽¹³⁹⁾.

Figura 31. Espectrofotometría UV/ Vis. A) Espectro de absorbancia de genisteína obtenido por nosotros. B) Espectro de absorbancia de daidzeína obtenido por nosotros. C) Espectros reportados en la literatura de Vacek, 2008 ⁽¹³⁹⁾.

El espectro del extracto acuoso de isoflavonas de soya sometido a la digestión simulada se presenta en la figura 32; en donde se puede observar la presencia de genisteína y daidzeína, así como la presencia de otros compuestos.

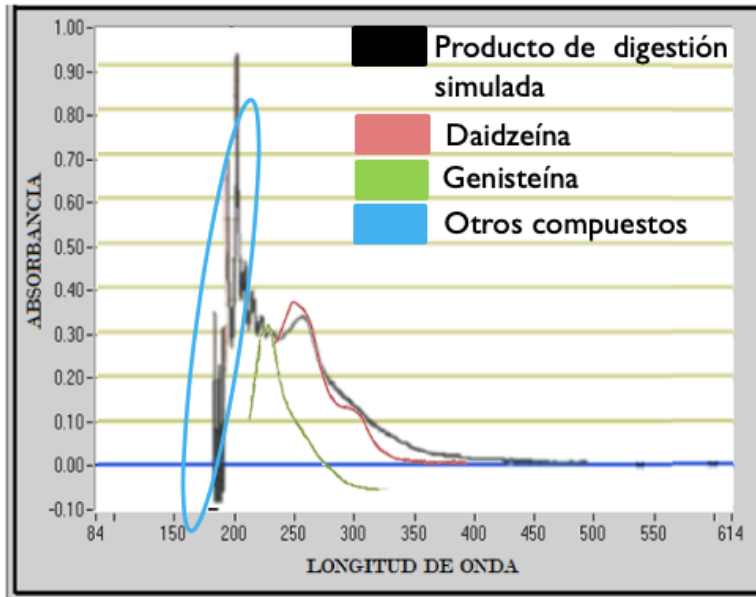


Figura 32. Espectrofotometría UV/Vis del producto de la digestión simulada. En el eje de las X se encuentra la longitud de onda y en el eje de las Y se encuentra la absorbancia. Se observa absorbancias correspondientes a los espectros de Daidzeína y Genisteína.

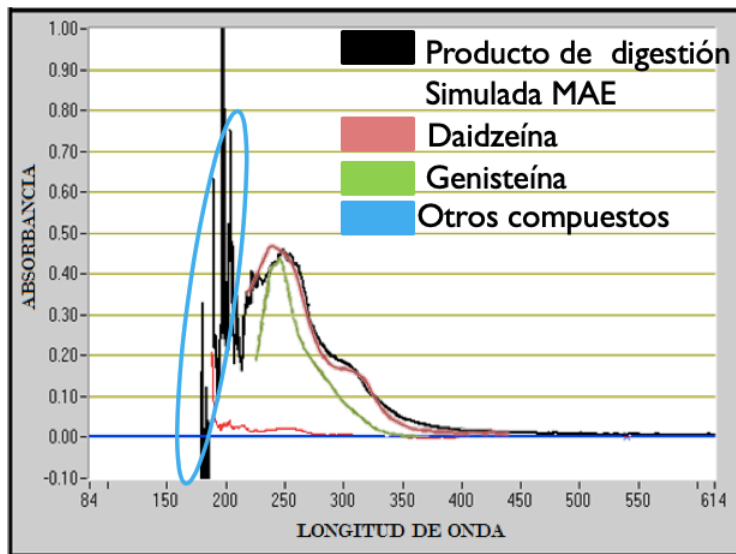


Figura 33. Espectrofotometría UV/Vis del producto de la digestión simulada. En el eje de las X se encuentra la longitud de onda y en el eje de las Y se encuentra la absorbancia. Se observa que después de la extracción por microondas es más claro el espectro correspondiente a Daidzeína y Genisteína.

Finalmente, se determinó si las isoflavonas seguían teniendo actividad mediante la cuantificación de su capacidad antioxidante al contacto con el radical libre DPPH. En la Tabla 9, se presenta la capacidad antioxidante del producto obtenido de la digestión simulada de isoflavonas.

Extracto	Porcentaje de capacidad antioxidante
Genisteína	100 %
Daidzeína	86.11 %
Producto de la digestión simulada después de MAE	100 %

Después de haber realizado los experimentos que permiten determinar la actividad de las isoflavonas, se determinó el efecto de las isoflavonas sobre las líneas celulares.

2º Etapa: Determinación del efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer de mama, de colon y cervicouterino

Antes de determinar el efecto antiproliferativo del extracto de isoflavonas sobre las diferentes líneas celulares, se cuantificaron las mismas como compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

A continuación, se presentan los resultados del efecto antiproliferativo obtenidos en las 4 líneas celulares de cáncer. En cada una de las gráficas se presenta en el eje “x” concentraciones micromolares crecientes de isoflavonas de soya expresados como compuestos fenólicos totales y en el eje de la “y” se encuentra el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control.

La siguiente gráfica (Figura 34) muestra los resultados de la línea celular MCF-7 correspondiente al cáncer de mama Luminal A, hormona dependiente:

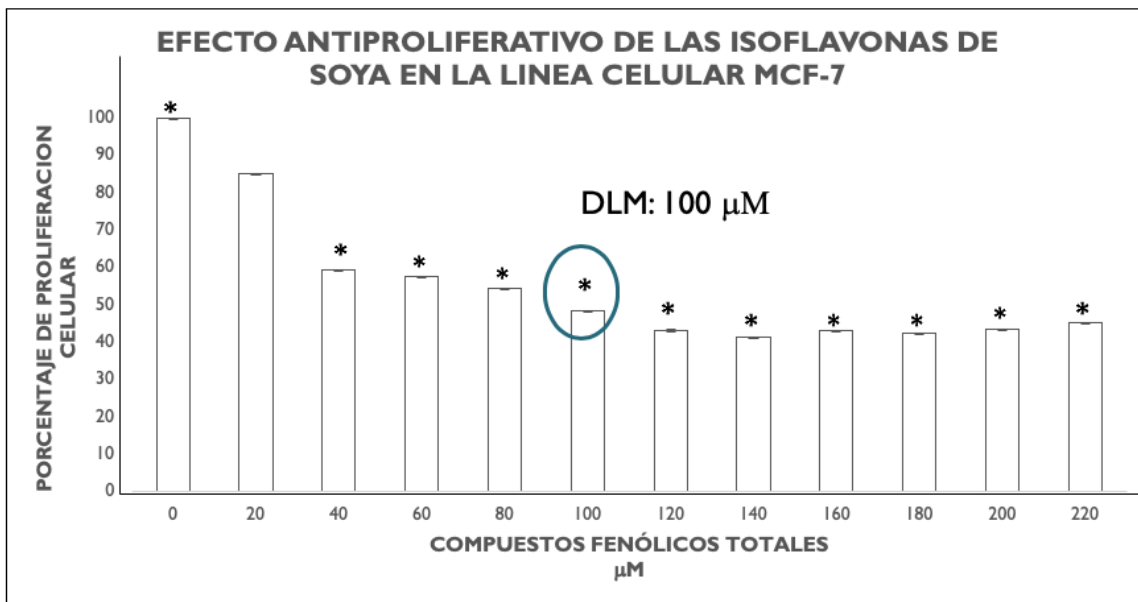


Figura 34. Efecto antiproliferativo en la línea celular MCF-7 correspondiente a cáncer de mama Luminal A. En esta gráfica se observa una inhibición en la proliferación celular con una dosis letal media de $100 \mu\text{M} \pm 0.038$. *Datos estadísticamente significativos con ANOVA, prueba post- hoc Bonferroni $p < 0.05$

Los resultados del efecto antiproliferativo de la línea celular tumoral MCF-7, presentado en la figura 34, se observa una inhibición de la proliferación celular de la línea tumoral MCF-7 correspondiente a cáncer de mama Luminal A, obteniendo una dosis letal media significativa de $100 \mu\text{M} \pm 0.038$. Los resultados son estadísticamente significativos calculados con prueba ANOVA con prueba Post-hoc Bonferroni con una $p < 0.05$. Los valores de las desviaciones estándar son muy pequeños y no se aprecian completamente en el gráfico por lo que se presentan en la tabla 10.

Desviaciones Estándar calculadas con Microsoft Excel y SPSS. INC ® Versión 23

DESVIACIONES ESTÁNDAR	
Concentraciones	Desviaciones
MCF-7	
0	0.063
20	0.061
40	0.05
60	0.056
80	0.036
100	0.038
121	0.056
141	0.002
161	0.02
181	0.009
201	0.018
221	0.012

Tabla 10. Desviaciones estándar de MCF-7. debido a que los valores de las desviaciones estándar son muy pequeños no se visualizan en el gráfico sin embargo lo presento en esta tabla.

A continuación, se presenta el efecto antiproliferativo en la línea celular tumoral MDA-MB-231 correspondiente a cáncer de mama triple negativo, hormona independiente (Figura 35):

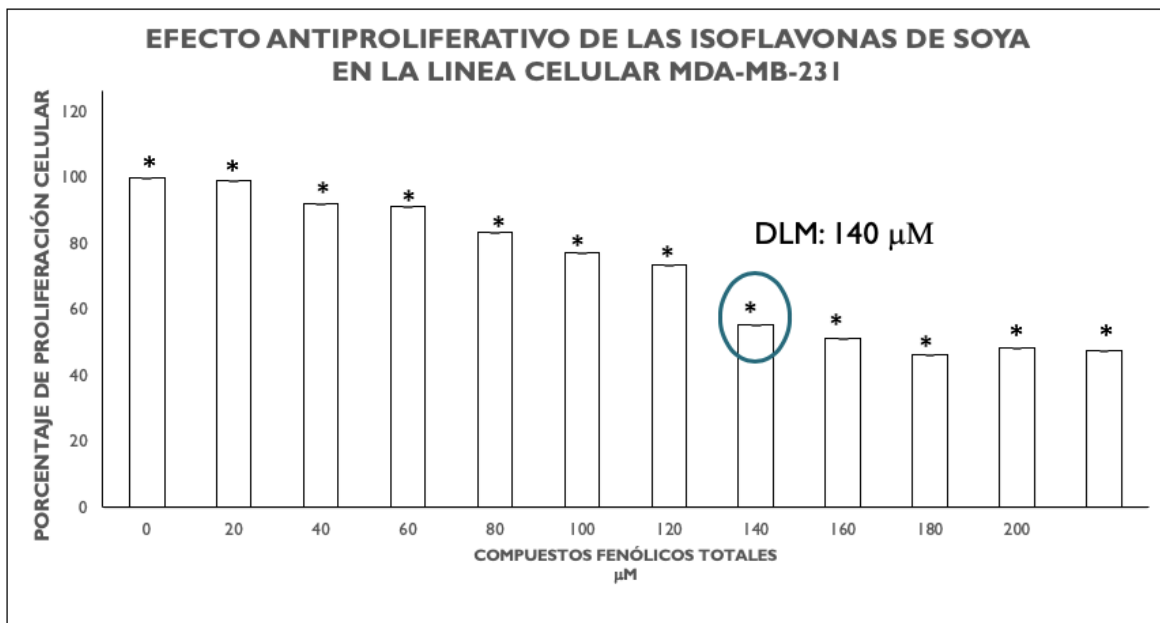


Figura 35. Efecto antiproliferativo en la línea celular MDA-MB-231 correspondiente a cáncer de mama triple negativo. En esta gráfica se observa una inhibición en la proliferación celular con una dosis letal media de $140 \mu\text{M} \pm 0.009$. *Datos estadísticamente significativos con ANOVA, prueba post- hoc Bonferroni $p < 0.05$

En la figura 35, se observa una disminución en el porcentaje de proliferación celular de la línea celular MDA-MB-231, al incrementar la concentración de isoflavonas de soja en este caso, la dosis letal media significativa es de $140 \mu\text{M} \pm 0.009$. Los datos son estadísticamente significativos calculados con prueba ANOVA con prueba post – hoc Bonferroni con una $p < 0.05$.

Las desviaciones estándar presentadas en el gráfico son muy pequeñas por lo que no se pueden observar completamente, sin embargo, se presentan en la tabla 11.

Desviaciones Estándar calculadas con Microsoft Excel y SPSS. INC ® Versión 23

DESVIACIONES ESTÁNDAR	
Concentraciones	Desviaciones
MDA-MB-231	
0	0.055
20	0.033
40	0.019
60	0.029
80	0.018
100	0.022
120	0.059
140	0.064
160	0.027
180	0.035
200	0.008
220	0.017

Tabla 11. Desviaciones estándar de MDA-MB-231. Debido a que los valores de las desviaciones estándar son muy pequeños no se visualizan en el gráfico sin embargo lo presento en esta tabla.

Se comparó el efecto de las isoflavonas de soya en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, con los datos obtenidos de las líneas celulares de cáncer de mama se realizó una prueba estadística con la finalidad de observar la relación que existe entre las dosis empleadas en cada una, los datos fueron determinados con una prueba ANOVA con prueba Post-hoc Bonferroni con una $p < 0.05$.

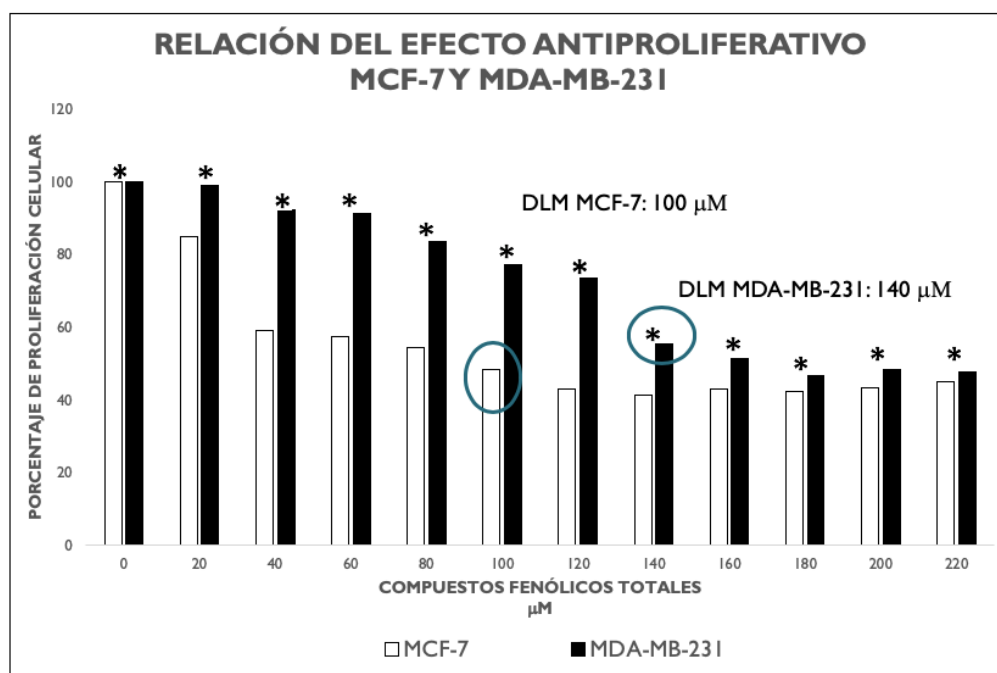


Figura 36. Efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. En esta gráfica se observa la relación de las dosis empleadas en ambas líneas celulares, observando que para MDA-MB-231 se requiere de una mayor concentración de isoflavonas, para alcanzar la dosis letal media que para MCF-7. *Datos estadísticamente significativos con ANOVA con prueba post-hoc Bonferroni $p < 0.05$.

A continuación, se presenta el efecto de las isoflavonas en el crecimiento de células de la línea tumoral de cáncer de colon HCT-15 (Figura 36). Se presenta el efecto del producto de la digestión de isoflavonas sobre la línea tumoral HCT-15, correspondiente a cáncer de colon, donde se puede observar una disminución en el porcentaje de células a mayor concentración de isoflavonas de soya. La dosis letal media se presenta en una concentración significativa de $130 \mu\text{M} \pm 0.226$. Los datos son estadísticamente significativos determinados con una prueba ANOVA con prueba Post-hoc Bonferroni con una $p < 0.05$. Los valores de las desviaciones estándar no se aprecian completamente en el gráfico, por lo que se presentan en la tabla 12.

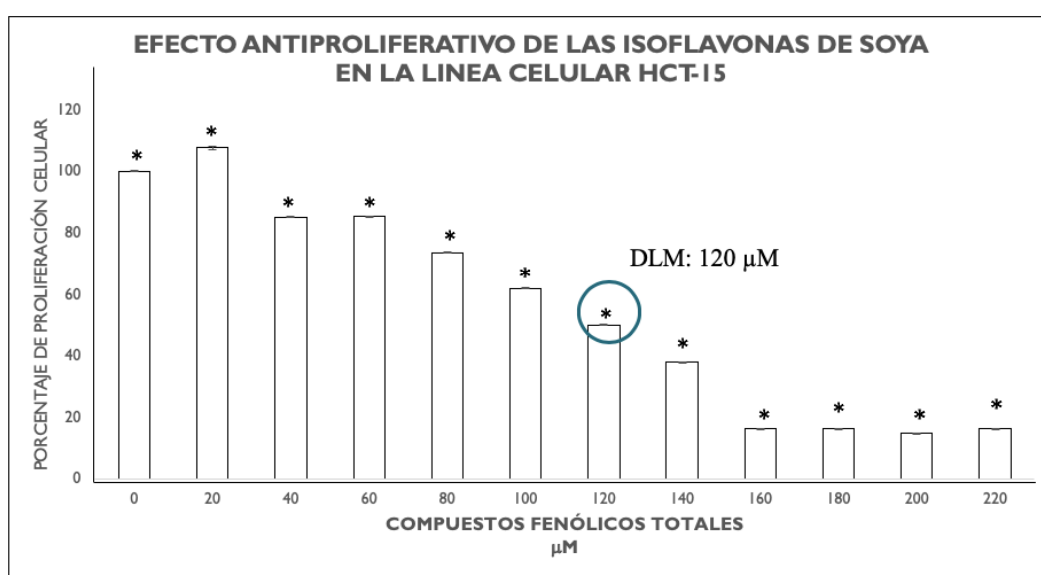


Figura 36. Efecto antiproliferativo en la línea celular HCT-15 correspondiente a cáncer de colon. En esta gráfica se observa una inhibición en la proliferación celular con una dosis letal media de $120 \mu\text{M} \pm 0.022$. *Datos estadísticamente significativos con ANOVA, prueba post- hoc Bonferroni $p < 0.05$

Desviaciones Estándar calculadas con Microsoft Excel y SPSS. INC ® Versión 23

DESVIACIONES ESTÁNDAR	
Concentraciones	Desviaciones
HCT-15	
0	0.081
20	0.038
40	0.014
60	0.079
80	0.079
100	0.036
120	0.026
140	0.022
160	0.052
180	0.019
200	0.009
220	0.036

Tabla 12. Desviaciones estándar de HCT-15. Debido a que los valores de las desviaciones estándar son muy pequeños no se visualizan en el gráfico sin embargo lo presento en esta tabla.

A continuación, se presenta el efecto antiproliferativo de la línea celular HeLa correspondiente a cáncer cervicouterino (Figura 37):

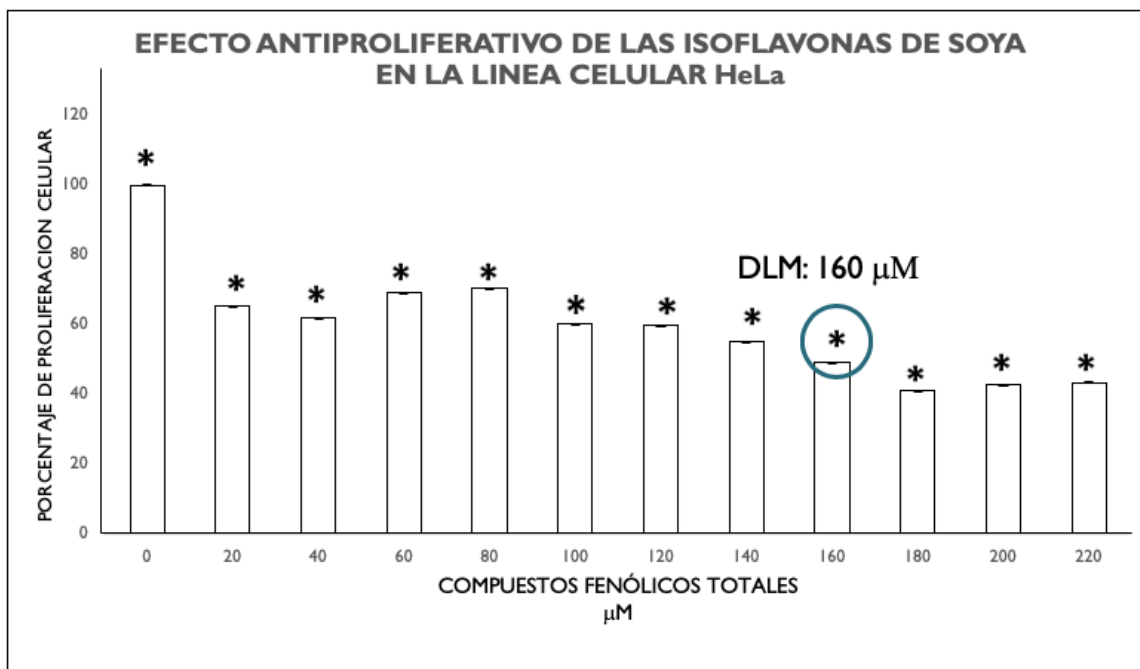


Figura 37. Efecto antiproliferativo en la línea celular HeLa correspondiente a cáncer cervicouterino. En esta gráfica se observa una inhibición en la proliferación celular con una dosis letal media de $160 \mu\text{M} \pm 0.4$. *Datos estadísticamente significativos con ANOVA, prueba post- hoc Bonferroni $p < 0.05$

En la figura 37, se presenta el efecto antiproliferativo que presentó la línea tumoral HeLa, donde se puede observar que la dosis letal media se da en una concentración significativa de $160 \mu\text{M}$. Los valores de las desviaciones estándar son muy pequeñas por lo que no se visualizan completamente en la gráfica, sin embargo, se presentan la tabla 13. Los datos son estadísticamente significativos con prueba ANOVA, prueba post-hoc Bonferroni $p < 0.05$.

Desviaciones Estándar calculadas con Microsoft Excel y SPSS. INC ® Versión 23

DESVIACIONES ESTÁNDAR	
Concentraciones	Desviaciones
HeLa	
0	0.66
20	0.189
40	0.253
60	0.432
80	0.382
100	0.194
120	0.194
140	0.117
160	0.4
180	0.195
200	0.2
220	0.079

Tabla 13. Desviaciones estándar de HeLa. Debido a que los valores de las desviaciones estándar son muy pequeños no se visualizan en el gráfico sin embargo se presentan en esta tabla.

9. DISCUSIÓN

1ª Etapa: Determinación de la integridad y funcionalidad de las isoflavonas de soya posterior a una digestión simulada

Las isoflavonas de soya fueron sometidas a una digestión simulada. Debido a que se empleó un nutracéutico en cápsula, se simuló únicamente la digestión intestinal y gástrica y no la salival. Las isoflavonas se encuentran en el nutracéutico en su forma glucosilada, fueron sometidas a un proceso de digestión simulada, en un fluido gástrico y un fluido intestinal teniendo contacto con enzimas principalmente pepsina y pancreatina respectivamente.

Después de este procedimiento, se procedió a la extracción de isoflavonas, empleando MAE. Esta técnica permitió extraer las isoflavonas de soya y sus metabolitos después de tener contacto con el fluido gástrico e intestinal, considerando que son los que se absorberían a nivel intestinal, esto se logró a través del calentamiento del producto de la digestión simulada desde el núcleo hacia el exterior de las moléculas, permitiendo su extracción en poco tiempo.

Después, a través de la cromatografía en capa fina presentada en la imagen 30, se puede observar la presencia de isoflavonas en el extracto crudo (carril 2), después de la digestión simulada (carril 3) y en el extracto MAE (carril 4), el Rf que presentan las isoflavonas después de ser sometidas al proceso de MAE, es similar al de los estándares de genisteína y daidzeína ubicados en el carril 1 y 5 respectivamente. Lo que confirma que la extracción de isoflavonas empleando MAE es efectiva.

La cromatografía en capa fina permitió identificar a las isoflavonas presentes en el producto de la digestión simulada después del contacto con un fluido gástrico e intestinal simulado, sin embargo, al no tener estándares de otras isoflavonas, así como de sus metabolitos, no se puede identificar a estos. Como perspectiva a futuro será necesario realizar un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés HPLC) la cual es una técnica que permitiría conocer con exactitud cuáles son los compuestos que están presentes en el extracto.

Aunado a este procedimiento, para confirmar la presencia de isoflavonas de soya se realizó una espectrofotometría UV/ Vis presentado en la Figura 31, de los estándares de genisteína y daidzeína. Los espectros obtenidos coinciden con los reportados en la literatura de Vacek J y colaboradores mostrado en el panel C de la misma figura. Además, en la figura

31 A se presenta el espectro correspondiente al producto de la digestión simulada antes de la extracción por microondas representado de color negro, de color amarillo se representa el espectro de daidzeína, en color verde el espectro de genisteína y encerrados en un ovalo azul otros compuestos, observando que no es tan evidente el espectro de las isoflavonas en comparación con el de la figura 31B, que muestra de color negro el espectro de las isoflavonas de soya, señalados de amarillo el espectro de daidzeína, de color verde el espectro de genisteína y señalados en un ovalo azul el espectro de otros compuestos, lo que coincide con la cromatografía en capa fina donde se observa en el carril 4, un aumento de la concentración de isoflavonas del extracto después de la digestión simulada después de la extracción por microondas.

Después, de que las isoflavonas de soya se sometieron a un fluido gástrico e intestinal, se confirmó su actividad biológica determinando su capacidad antioxidante, empleando el radical libre DPPH. En los resultados presentados en la figura 33, se puede observar que la capacidad antioxidante que tiene el producto de la digestión simulada es similar a la que tienen los estándares de genisteína y de daidzeína, lo que nos indica que las isoflavonas mantienen su funcionalidad, es decir, su capacidad antioxidante después de una digestión simulada.

La importancia de esta etapa fue conocer la integridad y funcionalidad de las isoflavonas de soya contenidas en el nutracéutico comercial, desde que se encuentra en su forma glucosilada en las cápsulas del producto hasta que son ingeridas y absorbidas a nivel intestinal, y después de haber tenido contacto con enzimas digestivas comprobar su presencia y su capacidad antioxidante empleando un radical libre.

2º Etapa: Determinación del efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer de mama, de colon y cervicouterino

Después de que se demostró en la etapa 1 que las isoflavonas están presentes y son funcionales en el producto de la digestión simulada se procedió a probar su efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama, de colon y cervicouterino.

La dosis letal media obtenida en MCF-7 de esta investigación coincide con lo reportado por el Dr. Wen Fang C et al. ⁽¹⁴⁰⁾, quienes investigaron el mecanismo involucrado en la acción inhibitoria del estándar de genisteína sobre las células MCF-7, encontrando la

misma dosis letal media para genisteína que en este trabajo 100 μM , lo que reportan los autores es que la genisteína detuvo significativamente el crecimiento de células MCF-7 en la fase G2 / M y disminuyó la fase S. A su vez por medio de tecnología de microarreglos de DNAC identificaron dos genes regulados por genisteína: HSP (por sus siglas en inglés heat shock protein, proteínas de choque térmico) y SRF (Serum Response Factor, factor de respuesta sérica, el cual es activado por el IGF-1), que son proteínas relacionadas directamente con la regulación de la proliferación celular. Sus resultados sugieren que la acción inhibitoria de la genisteína en esta línea celular de cáncer de mama, parece ser compleja y solo está mediada parcialmente por la alteración de las vías dependientes de los receptores para estrógenos⁽¹⁴⁰⁾.

Por lo que, como perspectiva a futuro de esta investigación, se tendría que determinar mediante citometría de flujo, en qué fase del ciclo celular se detienen las diferentes líneas celulares con el producto de la digestión empleado en este estudio, además de realizar un análisis genético con la tecnología de microarreglos la cual es una prueba que permite la identificación de la expresión génica de 20 a 35 mil genes de manera simultánea, para identificar los genes que son regulados positiva y negativamente por las isoflavonas del nutraceutico y de acuerdo a su función de los productos protéicos de los genes identificados, determinar el posible mecanismo de acción del producto de la digestión simulada del nutraceutico.

En un artículo de revisión de la Dra. Jia et al.⁽¹⁴¹⁾, reportan que las células epiteliales de la glándula mamaria expresan los ER α y ER β , el 80% de células expresan ER β , sin embargo, cuando se desarrolla una neoplasia, la expresión de ER β va disminuyendo, por una hipermetilación de la región promotora y la de ER α se incrementa⁽¹⁴¹⁾. Como ya se comentó en los antecedentes, los receptores ER β están relacionados con la disminución de la proliferación celular mientras que los ER α la promueven, y están relacionados con el desarrollo de cáncer, también se comentó que las isoflavonas tienen semejanza estructural con el 17 β -estradiol, y tienen mayor afinidad por ER β (87%) que por ER α (4%). En esta investigación se empleó la línea celular MCF-7 que son células de origen epitelial, y expresan ER α en mayor proporción que ER β , aunque la afinidad es mayor por los receptores beta, probablemente las isoflavonas de soya del nutraceutico se unieron al ER β e inclusive pudieron tener un efecto sobre la regulación de la desmetilación del promotor de los ER β ,

como perspectivas a futuro será conveniente realizar experimentos, que nos permitieran identificar los transcritos primarios de ER β y de esta manera determinar si hay una regulación a nivel de desmetilación de la región promotora del mismo, lo cual favorece la inhibición del crecimiento en esta línea celular.

Es importante mencionar que actualmente existen terapias dirigidas a receptores, que han resultado ser una buena opción de tratamiento por tratarse de fármacos dirigidos a genes y proteínas específicos relacionados con el desarrollo del cáncer, sin embargo, resultan de alto costo y de difícil acceso para algunos pacientes lo que ha ocasionado que la mayoría de los pacientes abandonen el tratamiento. Esta investigación sugiere el comienzo de una amplia investigación enfocada al efecto que producen las isoflavonas de soya sobre la línea celular tumoral de cáncer de mama, resultando una posible alternativa de tratamiento coadyuvante en cáncer de mama de fácil acceso, consumo y no invasiva.

En el caso de la otra línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, también hubo un efecto inhibitorio. Como ya se mencionó en los antecedentes, esta línea celular tumoral no expresa receptores estrogénicos, por lo que el si el efecto de las isoflavonas fuera únicamente a través de la unión a dichos receptores, su aplicación no debía presentar ningún efecto significativo, sin embargo, el efecto inhibitorio coincide con estudios reportados por otros autores, por lo que el efecto inhibitorio observado, podría deberse a la regulación de diferentes vías de señalización.

Por ejemplo el Dr. Pan et al ⁽¹⁴²⁾, observaron que empleando un estándar de genisteína, obtuvieron una dosis letal media de 20 μ M en la misma línea celular; al tratarse de una línea celular que no expresa ninguno de los receptores para estrógenos, dilucidaron a través de diferentes métodos, que la vía de señalización a través de la cual se presentó el efecto inhibitorio que causa el arresto de las células en G2/M, fue por la activación de la vía NF-kB ⁽¹⁴²⁾; esto coincide con el Dr. Gong et al, quienes de igual manera encontraron un efecto inhibitorio en células MDA-MB-231 con una dosis letal de 50 μ M, el efecto inhibitorio y la inducción de apoptosis causado por un estándar de genisteína, se debió por la unión al ADN de NF-kB y AKT. En el caso de la Dra. Rajah et al, encontraron que un efecto inhibitorio sobre la misma línea tumoral, se debe a una regulación sobre AKT, BAX / BCL-2, las cuales son vías de señalización que están implicadas en el proceso de apoptosis, por lo que las isoflavonas pudieron actuar a este nivel.

El resultado que se observó en el presente estudio al emplear la misma línea celular es mayor al que encontraron estos autores, por lo que probablemente se deba a que, en esta investigación, se utilizó el producto de la digestión del nutracéutico que únicamente contiene isoflavonas de soya, y podría estar regulando también la vía NF-kB, por lo que el efecto sobre la línea celular podría estar resultando diferente a comparación de un estándar de isoflavonas. Será necesario determinar mediante inmunofluorescencia indirecta el incremento en NF-kB, para determinar si el producto de la digestión provoca el mismo efecto al encontrado por estos autores.

De acuerdo a la información de estos autores, se considera de gran importancia este resultado ya que como se comentó anteriormente, MDA-MB-231 corresponde al cáncer de mama triple negativo y no expresa receptores estrogénicos, por lo que es el cáncer de mama más difícil de erradicar a diferencia del cancer de mama Luminal A de MCF-7. Actualmente los tratamientos dirigidos a receptores no tienen efecto sobre este cáncer de mama triple negativo, por lo que la quimioterapia y radioterapia son los tratamientos médicos oncológicos más empleados y resultan ser procedimientos muy invasivos y desgastantes para el paciente, ya que no solo afecta a células cancerígenas, sino también afecta a células sanas siendo la cirugía la única opción para estos pacientes. Las isoflavonas de soya han demostrado tener efecto sobre el cáncer de mama, sobre todo es importante resaltar su amplio mecanismo de acción que actúa en varias vías de señalización; a pesar de que aún hace falta darle continuidad a la investigación tanto *in vitro* como *in vivo*, el efecto que han demostrado las isoflavonas sobre el crecimiento de MDA-MB-231, plantea una posible alternativa con un alto valor terapéutico coadyuvante para este tipo de cáncer.

Además de acuerdo con la figura 36, que presenta el efecto antiproliferativo en los dos tipos de cáncer de mama Luminal A y triple negativo, ambas mostraron una disminución en la proliferación celular. A pesar de que ambas son líneas celulares de cáncer de mama, no comparten similitudes entre ellas, como la expresión de receptores, se esperaba efecto inhibitorio sobre la línea celular MCF-7 y no se esperaba un efecto sobre MDA-MB-231, observándose que se requiere una mayor concentración de isoflavonas, para alcanzar la dosis letal media en esta última línea celular. Estos resultados demuestran que las isoflavonas de soya no solo pueden actuar a nivel de los receptores estrogénicos, sino que pueden actuar regulando otras vías de señalización alternas que favorecen una inhibición del crecimiento

celular en la glándula mamaria. A pesar de que este estudio forma parte de una investigación básica, nos sugiere que el nutraceutico de isoflavonas de soya empleado en este estudio, podría ser considerado para formar parte de futuros tratamientos más específicos, a través de planes de alimentación personalizados de pacientes con cáncer de mama.

En el caso de HCT-15, línea celular tumoral correspondiente a cáncer de colon, presentó un efecto inhibitorio como se mencionó anteriormente. A diferencia de cáncer de mama, no se han encontrado suficientes estudios en la literatura, que reporten el efecto que ejercen las isoflavonas de soya sobre el control de la proliferación celular en el cáncer de colon, especialmente de la línea celular HCT-15. Se realizó una búsqueda exhaustiva de información en la base de datos PubMed, sobre estudios del efecto de las isoflavonas de soya sobre la línea celular HCT-15; únicamente se reportan estudios que evalúan el efecto de las isoflavonas sobre la línea celular de cáncer de colon HT-29, HCT-15 es una línea celular derivada de HT-29 ⁽¹⁴⁴⁾.

De acuerdo a lo reportado por el Dr. Zhou P et al. ⁽¹²⁸⁾, determinaron el efecto del estándar de genisteína en células de cáncer de colon en la línea HT-29. En sus resultados observaron que la genisteína puede disminuir el proceso de migración celular a una concentración de 200µM (concentración mayor a la encontrada en este trabajo), a través de la inhibición de la expresión de Notch1/ NF-κB/ slug/ E-cadherin, mientras promueven la expresión de BAX/BCL-2 y caspasa-3 los cuales son mediadores de la apoptosis celular, por lo que la genisteína podría considerarse como potencial coadyuvante para la prevención de metástasis en el cáncer de colon ⁽¹²⁸⁾. Será necesario determinar mediante inmunofluorescencia indirecta los niveles de Notch1, BAX/BCL-2, NFκB, para determinar si el producto de la digestión provoca el mismo efecto al encontrado por estos autores.

Se considera que la respuesta inhibitoria obtenida en este estudio es importante, ya que existe una escasa información del efecto que pueden causar las isoflavonas de soya en el crecimiento celular de cáncer de colon, especialmente en la línea celular HCT-15. A diferencia de otras líneas celulares de cáncer de colon, se considera que es importante investigar más en esta línea tumoral ya que expresa receptores para estrógenos especialmente los receptores beta, relacionados con la disminución de la proliferación tumoral, lo que ayudaría a encontrar estrategias no solo farmacológicas, sino nutricionales, dirigidas a receptores estrogénicos u otras vías de señalización que puedan causar una modificación en

el crecimiento celular tumoral. Además, como ya se mencionó en los antecedentes el cáncer de colon es el principal tipo de cáncer que está afectando a la población mexicana, siendo la alimentación uno de los principales factores de riesgo que predispone al desarrollo de cáncer, sin embargo, cambios en el estilo de vida, principalmente la alimentación de pacientes oncológicos, pueden modificar el aporte nutricio y tener un beneficio sobre la enfermedad.

Para la línea tumoral HeLa correspondiente a cáncer cervicouterino de igual manera se obtuvo un efecto inhibitorio significativo, lo que coincide con la literatura del Dr. Hussain A et al. ⁽¹⁴⁵⁾, quienes reportan el potencial antiproliferativo de la genisteína en células HeLa, en sus resultados muestran que el estándar de genisteína, causa una inhibición significativa en la viabilidad celular con una dosis de 100 μ M. En su estudio, demuestran que la genisteína indujo apoptosis y detuvo el ciclo celular en la fase G2/M además de modular la expresión en MMP-9 (matriz metalopeptidasa 9) y TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metallopeptidase 1, inhibidor tisular de metaloproteinasa 1) involucrados en la migración y metástasis celular ⁽¹⁴⁵⁾. Esto sugiere que será necesario determinar mediante inmunofluorescencia indirecta los niveles de MMP-9 y TIMP-1, para determinar si el producto de la digestión provoca el mismo efecto al encontrado por estos autores.

Como resumen, la siguiente tabla muestra el efecto inhibitorio que causaron las isoflavonas de soya sobre las líneas tumorales, destacando principalmente la posible intervención de los mecanismos de las isoflavonas de soya sobre las líneas celulares tumorales, principalmente en MDA-MB-231, de acuerdo a lo reportado en la literatura; como ya se ha mencionado anteriormente, es necesario darle continuidad a este estudio para determinar el mecanismo por el cual las isoflavonas causaron dicho efecto. Además, de acuerdo a la búsqueda de información que se realizó en la base de datos de PubMed, existe información sobre el efecto de estándares de isoflavonas de soya o semillas de soya sobre líneas celulares de cáncer, sin embargo, no se ha encontrado evidencia de haber evaluado el efecto que pudiera tener un nutraceutico de isoflavonas de soya sobre líneas celulares de cáncer de mama, lo que este estudio contribuye a generar más investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabla 14. Efecto de las isoflavonas de soya sobre las líneas celulares tumorales.

MDA-MB-231	MCF-7	HeLa	HCT-15
Triple negativo	Luminal A	Cáncer cervicouterino	Cáncer de colon
No expresa receptores para estrógeno	Expresa ER α y ER β	Expresa ER α y ER β	Expresa ER β
DLM: 140 μ M	DLM: 100 μ M	DLM: 160 μ M	DLM: 130 μ M
Efecto inhibitorio			
Las isoflavonas pudieron actuar sobre vías de señalización alternas a receptores estrogénicos	Las isoflavonas pudieron actuar a nivel de los receptores estrogénicos y/o vías de señalización alternas.		

Finalmente, se ha documentado en la literatura la importancia de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a diversas vías de señalización que estén implicadas en el proceso de apoptosis de células cancerígenas, por lo que especialmente las isoflavonas han sido consideradas por su acción moduladora en el crecimiento celular y en la muerte programada ⁽¹⁴⁸⁾ especialmente su intervención destaca en la modulación de NF- κ B, AKT, WNT, Notch, p53 y AR, como lo muestra la figura 38 donde se puede observar que las isoflavonas intervienen en diversas vías de señalización. De color verde se muestra la vía de señalización de WNT, de color rosa se observa la vía de EGF (factor de crecimiento), de color morado se observa la vía de señalización de NF- κ B y de color naranja la vía Notch. De color amarillo, se observa la acción que tiene las isoflavonas en cada una de estas vías, por ejemplo, las isoflavonas activan a p53, la cual se considera guardián del genoma, ya que determina que el DNA esté integro antes de continuar en el ciclo celular específicamente en las fases G2 y M y de acuerdo con la literatura probablemente las isoflavonas de este nutraceutico pudieron actuar a este nivel; a su vez las isoflavonas pueden inhibir a NF- κ B el cual juega un papel importante en el control del crecimiento celular, en la apoptosis, inflamación y respuesta al estrés, por lo que al ser inhibida por las isoflavonas, estas no permiten que continúe con su actividad de factor de transcripción. Del lado izquierdo de la imagen se puede observar que las isoflavonas pueden inhibir a AKT, el cual desempeña papeles importantes en la regulación en la supervivencia celular, por lo que, al ser inhibida por las isoflavonas, estas no permiten que haya una inhibición de caspasas y de BAD por lo que habría una apoptosis

de células cancerígenas. A su vez, las isoflavonas pueden actuar sobre las betacateninas en conjunto con WNT-1 que son de gran importancia en la diferenciación y adherencia celular, además de estar implicada en la transición de células epiteliales a células mesenquimales, por lo que las isoflavonas inhiben este proceso y detienen esta transición evitando la invasión a tejidos adyacentes y probablemente prevenga la metástasis.

Por lo que se puede concluir que empleando este nutracéutico se puede llegar a una inhibición de crecimiento celular, inclusive en aquellas líneas celulares como la MDA-MB-231, que no expresa receptores para estrógenos; será necesario determinar mediante inmunofluorescencia indirecta los niveles de marcadores moleculares de estas vías, para determinar si el producto de la digestión provoca el mismo efecto al encontrado por los diferentes autores.

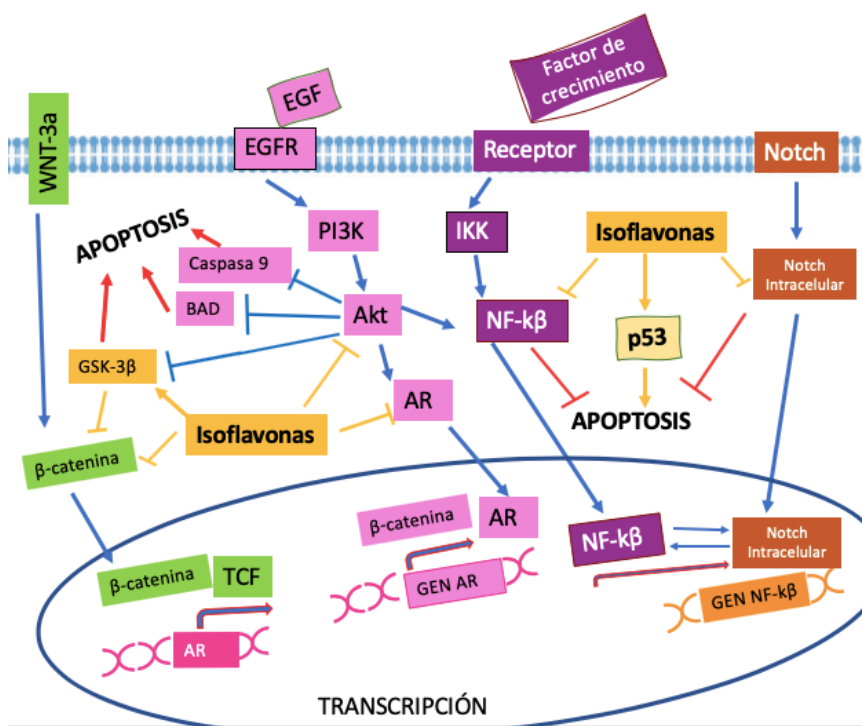


Figura 38. Esquema de las posibles vías de señalización de las isoflavonas de soja en la disminución de la proliferación celular. Se observa que las isoflavonas de soja podrían tener un efecto inhibitorio, por la interacción en vías de señalización como NF-κB, PI3K, kt, vía Notch, entre otras (Modificado de Yiwei L,¹⁴⁶).

10. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la presencia e integridad en la actividad de isoflavonas de soya después de haber sido sometidas a un proceso de digestión simulada.
2. Se comprobó su actividad al determinar la capacidad antioxidante que ejerce sobre el radical libre DPPH.
3. El producto de la digestión ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las líneas tumorales.

Línea Celular	Dosis Letal
MCF-7	100 $\mu\text{M} \pm 0.038$
MDA-MB-231	140 $\mu\text{M} \pm 0.009$
HCT-15	130 $\mu\text{M} \pm 0.226$
HeLa	160 $\mu\text{M} \pm 0.4$

4. La dosis letal media encontrada en este estudio es similar a la reportada por diferentes autores.
5. Existe una relación significativa entre las dosis empleadas en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.
6. El empleo de un nutracéutico con isoflavonas de soya, aún después de pasar por un proceso de digestión simulada, da lugar a un efecto similar al observado al emplear estándares de isoflavonas de soya directamente sobre el crecimiento de las líneas celulares.

11. PERSPECTIVAS A FUTURO

La nutrición, además de enfocarse en el aspecto dietético, tiene una importante intervención en la investigación, ya que el éxito de los tratamientos surge por el interés de encontrar nuevas estrategias nutricionales como opciones coadyuvantes en el cáncer, por lo que, el presente trabajo, contribuye en la nutrición clínica a generar futuras investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo* entorno al efecto que pueden causar las isoflavonas de soya sobre los principales tipos de cáncer que están afectando más a la población mexicana, lo que permitirá al personal del área de nutrición clínica a ampliar el panorama en el que un nutriólogo puede desempeñarse y tener un mejor conocimiento de los beneficios que puede aportar, en este caso la soya, recomendarlo con mayor responsabilidad y entender mejor la nutrición como complemento a un tratamiento en el cáncer, para ofrecer a este tipo de pacientes planes de alimentación más personalizados. Para lograrlo es necesario llevar a cabo algunas estrategias, se pretende a futuro:

1. Identificar el posible mecanismo por el cual el producto de la digestión de las isoflavonas de soya ejerce su efecto inhibitorio especialmente sobre la línea celular MDA-MB-231 que corresponde a cáncer de mama triple negativo.
2. Determinar el efecto del producto de la digestión de las isoflavonas de soya sobre diferentes líneas celulares de otros tipos de cáncer.
3. Será necesario realizar diferentes experimentos, que incluyen citometría de flujo, inmunofluorescencia indirecta y tecnología de microarreglos, para identificar el posible mecanismo de acción que ejerce el producto de la digestión de las isoflavonas de soya, sobre las diferentes líneas celulares.
4. Realizar experimentos en modelos experimentales *in vivo*, para determinar si se observa el mismo efecto del nutracéutico sobre el crecimiento tumoral.
5. Como perspectiva a largo plazo, se propondría una recomendación de ingesta de isoflavonas para la población mexicana, lo que permitirá tener un mayor control en la dosificación de isoflavonas, dentro de sus planes de alimentación, especialmente de pacientes que cursan con cáncer de mama, de colon y cervicouterino.

12. ANEXOS

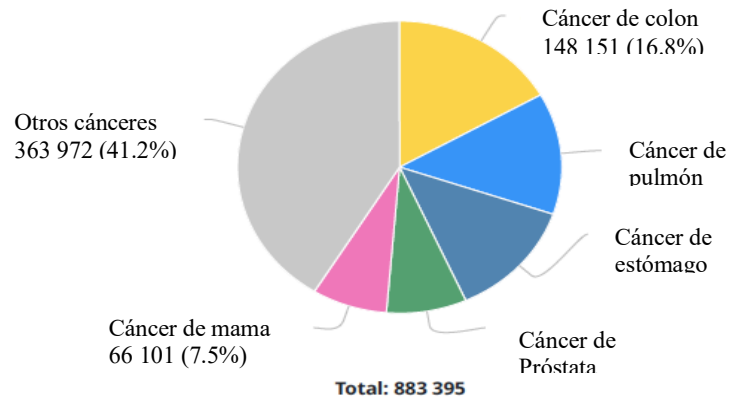
International Agency for Research on Cancer



Japan

Source: Globocan 2018

Número de nuevos casos en 2018 en ambos sexos, todas las edades



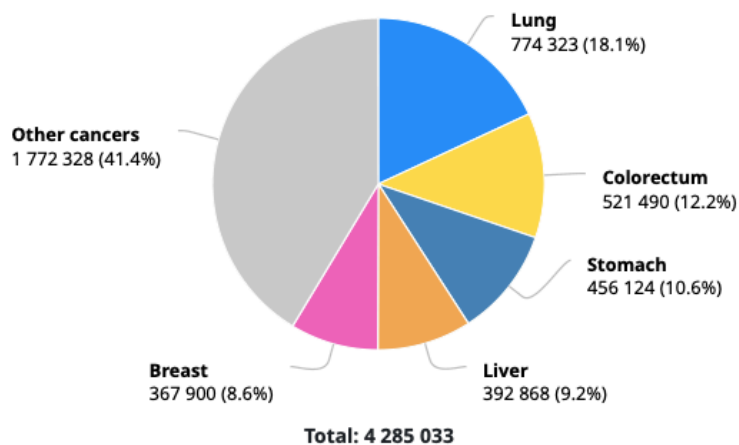
Total: 883 395

Anexo 1. Estadística de cáncer en Japón. Número de nuevos casos en 2018 en ambos sexos, todas las edades con un total de 883 395. (OMS, 2018)

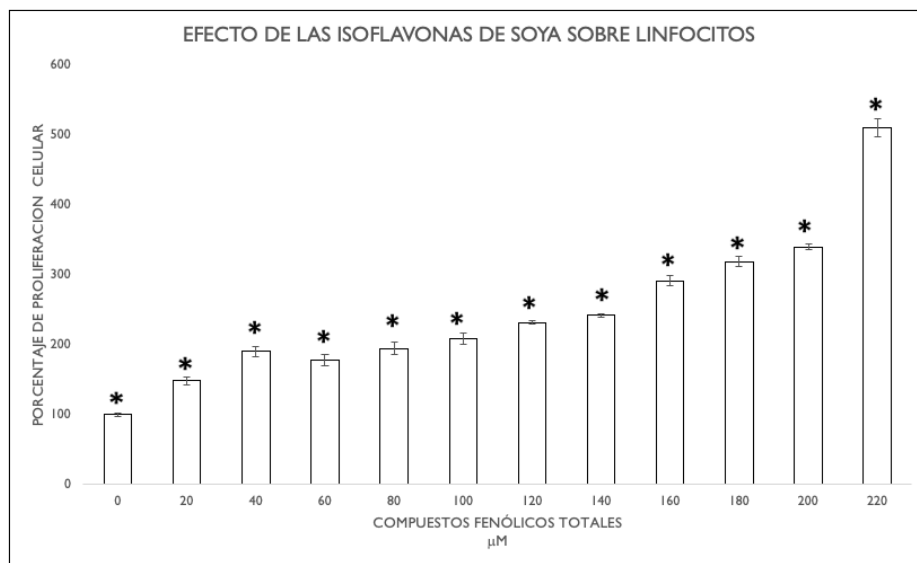
China

Source: Globocan 2018

Number of new cases in 2018, both sexes, all ages



Anexo 2. Estadística de cáncer en China. Número de nuevos casos en 2018 en ambos sexos, todas las edades con un total de 4 285 033. (OMS, 2018)



Anexo 3. Efecto de las isoflavonas de soya sobre linfocitos. Las isoflavonas presentan un efecto dosis-dependiente benéfico sobre el crecimiento de linfocitos. *Datos estadísticamente significativos con prueba ANOVA con prueba post-hoc Bonferroni $p < 0.05$

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Carruba G, Cocciadiferro L, Di Cristina A, Granata OM, Dolcemascolo C, Campisi I, et al. Nutrition, aging and cancer: lessons from dietary intervention studies. *Immun Ageing* [Internet]. 2016;13(1):13.
2. Real Academia Española [Internet]. Edición del Tricentenario. 2018; Recuperado a partir de: <http://dle.rae.es/?id=742bRjf>
3. Organización Mundial de la Salud. Definición de Cáncer. 2018; Recuperado a partir de: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
4. Guamán LM. From Mutagenesis to Metastasis: A General Description of Cancer Development. *Journal of Cancer Biology & Research*. 2018; 6 (3): 1123
5. De IU, Kremenutzky E, Vázquez AH, Vázquez AH. Guía de Genética. 2015;1–11.
6. Sisinio de Castro, Pérez Arellano J. Manual de patología general. Editorial Masson El Servier, 2006. 6p
7. Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, et al. American cancer society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *Obstet Gynecol Surv*. 2007; 62(7): 458–60.
8. Xu X, Wang H, Murphy PA, Hendrich S. Human Nutrition and Metabolism — Research Communication of Soy Food Affects Short-Term Isoflavone Bioavailability in. 2000; 2: 798–801.
9. Organización Mundial de la Salud. Definición de Cáncer. 2018. Recuperado a partir: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
10. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Clasificación Internacional de Enfermedades - 10. 2018: (2). Recuperado a partir de: https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/normalizacion/CIE10/CIE10ES_2018_diag_pdf_20180202.pdf
11. Neslin Akkoca A, Yanik S, Tuğba Özdemir Z, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int Journal Clinic Exp Med*. 2014: 7 (9): 2828-2835
12. Organización Mundial de la Salud. 2018. Recuperado a partir de: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic->

isotype?type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0

13. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadística a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. México. 2015; 1– 15.
14. World Health Organization. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. France, 2015. International Agency for research on cancer. Recuperado de:
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal
15. Pró E. Anatomía Clínica. Panamericana. 2013
16. Moore K, Dalley A, Agur A. Anatomía con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana; 2013
17. Herrera Gómez A & Granados García M. Manual de Oncología. Procedimientos médico quirúrgicos. Mc Graw Hill. 2013; 664
18. Sánchez RC, Acevedo CF, Petric GM, Galindo AH, Domínguez CF, León RA, et al. Cáncer de mama metastásico. Caracterización de una cohorte según subtipos. Revista Medica de Chile. 2014; 142 (4): 428-435
19. Becerro JF M. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. RAMD, 2013; 1(1), 26-27
20. Santillan Benitez JG, Quiroz Ordoñez A, Mendieta Zerón H, Gómez Oliván LM, Expresión génica y receptors hormonales en cancer mamario. El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas. Revista de Medicina e Investigación, 2013; 1(1): 17-24
21. Aceto N, Duss S, MacDonald G, S Meyer D, Roloff T, Hynes N et al. Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion. Breast Cancer Res, 2012: 14 (5).
22. Jordan VC, MacGregor JI, & Tonetti DA. Tamoxifen: from breast cancer therapy to the design of a postmenopausal prevention maintenance therapy. Osteoporosis International. 1997; 7(1): 52-57.
23. Ariza Márquez YV, Briceño Blalcázar I, Ancizar Aristizábal F. Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. Rev. Colomb Biotecnol. 2016; 8(1): 121-134

24. Kaplan Morgenstern, & Díaz S Aceves. Effects of Trastuzumab as Coordinating Therapy for Her2-Positive Breast Cancer Patients: A Systematic Review. *iMedPub Journals*, 2017: 13 (3:2).
25. Colombo PE, Milanezi F, Weigelt B, Reis-Filho J. Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Research*. 2011; *13*(3), 212
26. Astudillo de la Vega H., Ruiz García E., Muñoz González D., Barajas Figueroa J., Lázaro León J., Maldonado Martínez H., Valero V., Biomarcadores del cáncer de mama vs firmas genómicas: hacia la búsqueda de una terapia personalizada. *Revista Mexicana de Mastología*, 2014: *4*(1), 9-17. Recuperado a partir de <http://www.medigraphic.com/revmexmastol>
27. Subik, K., Lee, J. F., Baxter, L., Strzepak, T., Costello, D., Crowley, P., ... & Tang, P. (2010). The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast cancer: basic and clinical research*, *4*, 117822341000400004.
28. American Type Culture Collection. MCF-7 Breast adenocarcinoma SOP: Thawing, Propagating and Cryopreserving. *Atcc*, 2012: *1*(6), 22. Recuperado de http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB22_MCF7_SOP-508.pdf
29. Liu YR, Jiang Y, Xu X, Yu K, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2016; *18*(1), 33.
30. Zaharia M, & Gómez, H. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2013; *30*(4): 649-656.
31. Xu X, Zhang Y, Jasper J, Lykken E, Alexander P, J Markowitzg, Mc Donnell D. MiR-148^a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 2016: 1-6p disponible en: www.impactjournals.com/oncotarget

32. American Type Culture Collection. MDA-MB-231 Breast adenocarcinoma SOP: Thawing, Propagating and Cryopreserving. ATCC, 2012: 1(6), 22. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>
33. World Health Organization. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. France, 2015. International Agency for research on cancer. Recuperado a partir de: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal
34. Azzouz L, Sharma S. Physiology, Large Intestine. StatPearls Publishing. 2018
35. Mahan LK, Raymond J. Krause: Dietoterapia. Elsevier.
36. Montenegro Quesada E, & Brenes Coto LA. Revisión bibliográfica de cáncer de colon (Contenido de Especialidad de Cirugía Oncológica). Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica. 2013; 70(605): 103-108
37. Kuipers J, Grady W, Lieberman D, Seufferlein T, Sung J, Boelens P, et al. Colorectal Cancer. HHS Public Access. 2016; 1
38. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2018/paf-erlotinib-sulindac-polipos-colorrectales>
39. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach, Heinz-Josef L. Understanding the role of primary tumour localization in colorectal cancer treatment and outcomes. European Journal of Cancer. 2017; 84; 69-80
40. Dukes CE, Bussey HJ. The Spread of Rectal Cancer and its Effect on Prognosis. Br Journal Cancer. 1932; 12: 309-320.
41. Hosseini S, Mohammad A, Mohammadianpanah M, Salek R, Taghizadeh-Kermani. Prognostic significance of adjuvant radiation therapy in adenocarcinoma of the cecum. Radiation Oncology Journal. 2018
42. Salem M, Weinberg B, Xiu J, El-Deiry W, Hwang J et al. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. Oncotarget. 2017; 8(49), 86356 – 86368
43. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nature medicine, 2015: 21(11), 1350.

44. Wang Y, Kong W, Lv N, Li F, Chen J et al. Incidence of radiation enteritis in cervical cancer patients treated with definitive radiotherapy versus adjuvant radiotherapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2018: 14
45. Ratna A, Mandrekar P. Alcohol and cancer: Mechanism and therapies. *Biomolecules Journal*, 2017: 7 (61). 2 – 20p.
46. Rossi M, Jahanzaib Anwar M, Usman A, Kershavarzian A, Bishehsari F. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption – Populations to Molecules. *MDPI Journal Cancers*. 2018: 10(38)
47. Vallance J, Boyle T, Courneya K, Lynch B. Associations of objectively assessed physical activity and sedentary time with health-related quality of life among colon cancer survivors. *Cancer*. 2014.
48. Nunez C, Nair – Shalliker V, Egger S, Sitas F, Bauman A. Physical activity, obesity and sedentary behavior and the risks of colon and rectal cancers in the 45 and up study. *BMC Public Health*. 2018: 18 (325): 2-12.
49. Karunanithi S, Levi L. High-fat and colorectal cancer: myths and facts. *Future Oncology*. 2017: 14(6): 493-495.
50. Guilherme Campos F, Real Martinez CA, Bustamante Lopez LA, Toshio Kanno D, Nahas S, Ceconello I. Advanced duodenal neoplasia and carcinoma in familial adenomatous polyposis: outcomes of surgical management. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2017: 8(5): 877 – 884. <http://dx.doi.org/10.21037/jgo.2017.09.03>
51. Sameer, A.S. (2013). Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Frontiers in oncology*, 3, 114.
52. Barone M, Tanzi S, Lofano K, Scavo MP, Guido R, Demarinis L, et al. Estrogens, phytoestrogens and colorectal neoproliferative lesions. *Genes Nutr*. 2008; 3: 7-13.
53. Bustos V, Nolan A, Nijhuis A, Harvey H, Parker A, Poulosom R, et al. GPER mediates differential effects of estrogen on colon cancer cell proliferation and migration under normoxic and hypoxic conditions. *Impact Journals*. 2017; 8(48): 84258-84275
54. Di Leo A, Nesi G, Principi M, Piscitelli D, Girardi B, Pricci M, et al. Epithelial turnover in duodenal familial adenomatous polyposis: A possible role for estrogen receptors?. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(11): 3202-3211.

55. American Type Culture Collection. HCT-15 adenocarcinoma SOP: Thawing, Propagating and Cryopreserving. *Atcc*, 2012; 1(6), 22. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>
56. World Health Organization. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. France, 2015. International Agency for research on cancer. Recuperado a partir de: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal
57. Recuperado de: <http://www.innovaticias.com/medicina-y-salud/5899/detector-cancer-cervico-uterino->
58. Mun Kun H, Jen Hung W, Cheng Chuan S, Ming Hsun Li et al. Expression of Estrogen and Progesterone Receptor in Tumor Stroma Predicts Favorable Prognosis of Cervical Squamous Cell Carcinoma. 2017. *Int J Gynecol Cancer*. 2017; 27: 1247-1255
59. Sang-Hyuk C, Franceschi S, Lambert P. Estrogen and ER- α : Culprits in cervical cancer?. *Trends Endocrinology Metabolism*. 2010; 21 (8)
60. Marth C, Landoni F, Mahner M, McCormack, González Martin A et al. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Clinical Practice Guidelines*. 2017; 28 (4): iv72 – iv83
61. Aranguren Pulido LV, Burbano Castro JH, Gonzalez D, Mojica Cachope AM, Plazas Veloza DJ, Prieto Bocanegra BM. Barreras para la prevención y detección temprana de cáncer de cuello uterino. *Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo*. 2017; 19 (2)
62. Deen boon J, Pyeon D, Wang S, Horswill M, Schiffman M et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *PNAS PLUS*. 2015: E3255-E3264
63. Nuñez Troconis J, Cigarrillo y cáncer de cuello uterino, *Rev Chil Obstet Ginecol* 2017; 82(2)
64. American Type Culture Collection. HeLa adenocarcinoma SOP: Thawing, Propagating and Cryopreserving. *Atcc*, 2012: 1(6), 22. Recuperado de: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>

65. Gillet JP, Varma S, Gottesman M, the Clinical relevance of Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Inst*; 2013; 105: 452–458
66. Qu W, Zhao Y, Wang X, Qi Y, Zhou C et al. Culture characters, genetic background estrogen/ progesterone receptor expression and tumorigenic activities of frequently used sixteen endometrial cancer cancer cell lines. *Clinica Chimica Acta*. 2018
67. Martinez Carpio PA, Navarro Moreno MA. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista Oncologica*. 2016; 5 (4): 184 – 191
68. COMŞA B. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*. 2015; 35: 3147-3154
69. Vermeulen SJ, Chen TR, Speleman F, Nollet F, Van Roy FM et al. Did the four human cáncer cell lines DLD-1, HCT-15, HCT-8, and HRT-18 originate from one and the same patient?. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 107: 76 – 79
70. Carrera Páez L, Pirijan Quintero I, Urrea Suarez MC, Gómez Jiménez M, Monroy Cano LA et al. Comparison of cell culture HeLa and Hep-2: Studies prospects *Chlamydia trachomatis*. *NOVA*; 2015: 12 (21): 17-29
71. Ludueña B, Mastandrea C, Chichizola C, Franconi MC. Isoflavonas de soya, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Revista Bioquímica y Patología Clínica*. 2007; 71(1)
72. Fernández López A, Lamothe V, Delamplé M, Denayrolles M, Bennetau Pelissero C. Removing isoflavones from modern soyfood: Why and How?. *Food Chemistry*. 2016; 286-294
73. Messina M. Soy and health update: Evaluation of the clinical and epidemiologic literature. *Nutrients*. 2016; 8(12).
74. Ziaei S & Halaby R. Dietary Isoflavones and Breast Cancer risk. *Medicines Basel*. 2017: 4(2).
75. Martin Salinas C, López Sobaler A. Beneficios de la soya en la salud femenina. *Nutrición Hospitalaria*. 2017; 34(4): 36 – 40.
76. Rizzo G, Baroni L. Soy, Soy foods and their role in vegetarian diets. *Nutrients Journal*. 2018; 10 (43).

77. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Version Current: September 2015. Available online: <http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/ndl> (Accessed on 17 August 2016).
78. Ledesma Solano JA, Chavéz Villasana A, Pérez Gil F, Mendoza Martínez E, Calvo Carrillo C. Composición de alimentos Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo. Mc Graw Hill; 2010
79. Jargin S. Soy and phytoestrogens: possible side effects. German Medical Science. 2014; 12: 1-5
80. Rietjens I, Beekmann JL, Beekman K. The potencial health effects of dietary phytoestrogens. British Journal of Pharmacology. 2017; 174; 1263-1280
81. Chen MN, Lin CC, Liu CF. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. Climacteric. 2015; 18: 260-269
82. Mirela Tit D, Bungau S, Iovan C, Nistor Cseppento DC, Endres L et al. Effects of the hormone replacement therapy and of soy isoflavones on bones resorption in posmenopause. Journal of Clinical Medicine. 2018; 7 (297).
83. González Cañete N, Durán Agüero S. Isoflavonas de soya y evidencias sobre la protección cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 2014; 29: 1271 – 1282.
84. Grossini E, Farruggio S, Raina G, Mary D, Deiro G et al. Effects of genistein on differentiation and viability of human visceral adipocytes. Nutrients. 2018; 10 (978): 2-18
85. Odle B, Dennison M, Al-Nakkash L, Broderick TL, Plochocki JH. Genistein treatment improves fracture resistant in obese diabetic mice. BMC Endocrine Disorders. 2017; 17 (1): 1-8
86. Zhao Q, Zhao M, Parris A, Xing Y, Yang X. Genistein targets the cancerous inhibitor of PP2A to induce growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells. International Journal of Oncology. 2016; 49
87. Zhang HY, Cui J, Zhang Y, Wang ZL, Chong T, Wang ZM. Isoflavones and prostate cáncer: A review of some of critical issues. Chinese Medical Journal. 2016; 129 (3)
88. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. HHS Public Access. 2017; 372 (1): 48-56

89. Phenol Explorer Database on polyphenol content in foods. [Internet]. (2015). Recuperado de: www.phenol-explorer.eu
90. Neveu V, Pérez Jiménez J, Vos F, Scalbert A. Systematic Analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the phenol – explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 4959 - 4969
91. Perez Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Identification of the richest dietary sources of polyphenols: an application of the phenol – explorer data base. *Eur J Clin Nutr*. 2011; 64 (3)
92. Vogiatzoglou A, Mulligan AA, Lentjes MAH, Luben RN, Spencer JPE et al. Flavonoid intake in European Adults (18 to 64 years). *PLOS One*. 2015
93. Matsumoto T, Matsubara Y, Nitzuhara Y, Sekiguchi A, et al. Plasma pharmacokinetics of polyphenols
94. Pinto P, Santos CN. Worldwide (poly) phenol intake: assesment methods nd identified gaps. *European Journal Nutrition*. 2017; 56: 1393 - 1408
95. Amawi H, Ashby Jr C, Samuel T, Peraman R, Tiwari A. Polyphenolic nutrients in cancer chemoprevention and metastasis: Role of the epithelial to Mesenchymal (EMT) pathway. *Nutrients Journal*. 2017; 9 (911)
96. Lutz M, Fuentes E, Ávila F, Alarcón M, Palomo I. Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk of Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 2019: 24 (366)
97. Kapinova A, Kubatka P, Golubnitschaja O, Kello M, Zubor P et al. Dietary phytochemicals in breast cancer research: anticancer effects and potencial utility for effective chemoprevention. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2018; 23 (36): 2-18
98. Yadav V, Prasad S, Sung B, Aggarwal B. The Role of Chalcones in Suppresion of NF-kB-Mediated Inflammation and Cancer. *National Institutes of Health*. 2011; 11(3): 295-309
99. Ben Miled H, Saada M, Jallali I, Ben Barka Z, Tlili M, Alimi H, et al. Variability of antioxidant and biological activities of *Rhus Tripartitum* related to phenolic compounds. *EXCLI Journal*. 2017; 16. 439-447
100. Gil Hernández A. Tratado de nutrición, tomo III; Nutrición humana en el estado de salud. Editorial Médica panamericana. 2010; 57.

101. Zhang H, Tsao R. Dietary Polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current opinion in Food Science*. 2016; 8: 33 – 42
102. Cipolletti, M., Solar Fernandez, V., Montalesi, E., Marino, M., & Fiocchetti, M. (2018). Beyond the Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols in Cancer: The Modulation of Estrogen Receptors (ERs) Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2624.
103. Sareddy G, Vadlamudi R. Cancer therapy using natural ligands that target estrogen receptor beta. *Chin Journal Nat Medicine*. 2015; 13 (11): 801 – 807
104. Slámová K, Kapešová J, Valentová K. “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-Catalyzed Modifications. *International Journal of Molecular Science*. 2018;19 (2126); 2-19
105. Hua X, Yu L, You R, Yang Y, Liao J et al. Association among dietary flavonoids, flavonoids subclasses and ovarian cancer risk: A meta – analysis. *PLOS One*; 2016: 1 - 15
106. Mattison D, Lakind J, Karyakina N. Pharmacokinetics and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: A review of the data and identification of knowledge gaps. *Critical Reviews in Toxicology*. 2014; 44(8): 696-724
107. Colinas Rodríguez M. Bioconversión de isoflavonas de la soya por microbiota intestinal mediante incubaciones *ex vivo*. Universidad de Oviedo. 2014.
108. Modificado de: <http://lifeofplant.blogspot.com/2011/04/estrogens-from-plants.html>
109. Lee S, Xu H, Li H, Yang G, Cai H, et al. Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women’s Health Study. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1920–6
110. Cópola F, Nader J, Aguirre R. Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev Med Uruguay*. 2005; 21: 15-22
111. Szeja W, Gryniewicz G, Rusin A. Isoflavones, their glycosides and glycoconjugates. Synthesis and biological activity. *Current Organic Chemistry*. 2017; 21 (3): 218 – 235
112. Spagnuolo C, Luigi Russo G, Erdogan Orhan I, Habtemarian S et al. Genistein and cáncer: current status, challenges and future directions. *American Society for Nutrition*. 2015; 6: 408 – 19.
113. Zubik L, Meydani M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77: 1459 – 1465

114. Murphy P, Barua K, Hauk C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy food. *Journal of Chromatography*. 2002; 777: 129 – 138
115. Sharma S, Kaur M, Goyal R, Gill BS. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L). Merrill) genotypes. *Journal Food Science Technology*. 2014; 51 (3): 551 – 557
116. Jia Yi D & Li Qiang Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta- analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 125: 315-323
117. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE et al. Cancer of the prostate and breast among Japanese and White immigrants in los Angeles County. *Br Journal Cancer*. 1991; 63: 963 - 966
118. Yan L & Spitznagel EL, Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of meta-analysis. *Am Journal Clinic Nutrition*. 2009; 89: 1155-63
119. Sak K. Epidemiological evidences on dietary flavonoids and breast cancer risk: A narrative review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017; 18(9). 2309-2328p.
120. Goodman MT, Shvetsov YB, Wilkens LR, Franke AA et al. Urinary phytoestrogen excretion and postmenopausal breast cancer risk: The multiethnic cohort study. *National Institutes of Health*. 2009; 2 (10): 887 – 894.
121. Setchell K, Brown N, Desai P, Zimmer Nechemias L, Wolfe B, Brashear W, et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *The Journal of Nutrition*. 2001; 131 (4): 1362s – 1375s
122. González Cañete N, Durán Agüero S. Isoflavonas de soya y evidencias sobre la protección cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2014; 29 (6): 1271-1282
123. Torres Torres N, Tovar Palacio AR. La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. *Salud Pública México*. 2009; 51: 246 – 254
124. Cena E, Steinberg F. Soy may help protect against cardiovascular disease. *California Agriculture*. 2011; 65(3): 118-123.
125. Mukund V, Mukund D, Sharma V, Mannarapu M, Alam A et al. Genistein: It's role in metabolic diseases and cancer. *Critical Reviews in Oncology*. 2017; 119: 13-22

126. Kaushik S, Shyam H, Sharma R, Balapure A. Genistein synergizes centchroman action in human breast cancer cells. *Indian Journal Pharmacology*. 2016; 48 (6): 637-642
127. Chan K, Siu M, Jiang Y, Jing Jing W, Leung T et al. Estrogen receptor modulators genistein, dadizein and ERB-041 inhibit cell migration, invasion, proliferation and sphere formation via modulation of FAK and PIEK/AKT signaling in ovarian cancer. *Cancer Cell International*. 2018; 18 (65): 2-14
128. Zhou P, Wang C, Hu Z, Chen W, Qi W et al. Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial to mesenchymal via a Notch1/NF – kB /slug/ E-cadherin pathway. *BMC Cancer*. 2017; 17 (813): 2-10
129. Zhang Bo, Jun Ping S, Bai Y, Li J, Yong Hong L. Inhibitory effects of O-methylated isoflavone glycitein on human breast cancer SKBR-3 cells. *International Journal Clin Exp Pathol*. 2015; 8 (7): 7809- 7817
130. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Balance S, Bohn T et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*. 2014; 5: 1113 - 1124
131. Ariel Rostagno M, [Tesis doctoral en Internet]: Universidad de Cádiz; 2005. Recuperado a partir de: <https://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/14781/32486820.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
132. Slinkard K. & Singleton VL. Total Phenol analysis: automation and comparison with manual methods. 1977. *Am. J. Enol. Viticult*. 28; 49–55.
133. Stahl E. *Journal of chromatography Library*. 1979: 425 - 435
134. Hirt R. *Ultraviolet Spectrophotometry*. *Anal Chem*. 1956; 28 (4): 579-583
135. Prieto JM. Procedure: Preparation of DPPH radical and antioxidant scavenging assay. 2012.
136. American Type Culture Collection. MDA-MB-231 Breast adenocarcinoma SOP: Thawing, Propagating and Cryopreserving. ATCC, 2012: 1(6), 22. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>

137. Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. *Tissue Culture: Methods and Applications* ed. by Kruse, P.F., Jr. and Patterson, M.J. Academic Press. 1973: 406-408.
138. Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diaamond RD. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl) - (2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *Journal of Infections diseases*. 1995: 172 (4); 1153-1156
139. Vacek J, Klejdus B, Lojkóva, Kubán V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *JSS Journal*. 2008. 31. 2054-2067
140. Wen Fang C, Ming Hui H, Chi Hung Tzang, Yang M, Man Sau W. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochímica et Biophysica*. 2003. 187-196.
141. Jia M, Dahlman Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015: 29; 557 – 568
142. Pan H, Zhou W, He W, Liu X, Ding Q, et al. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-kB activity via the Notch -1 pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012: 337 – 343
143. Rajah T, Peine KJ, Du N, Serret C, Drews N. Physiological concentrations of genistein and 17- β -estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing BAX/BCL -2 and reducing pERK 1/2. *Anticancer Research*. 32: 1182 – 1192.
144. Forgue Lafitte ME, Coudray AM, Bréant B, Mester J. Proliferation of the human colon carcinoma cell line HT29: Autocrine growth and deregulated expression of the c-myc oncogene. *Cancer Research*. 1989: 49; 6566 – 6571
145. Hussain A, Harish G, Alwin Prabhu S, Mohsin J, Ali Khan M et al. Inhibitory effect of genistein on the invasive potential of human cervical cancer cells via modulation of matrix metalloproteinase – 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase -1 expression. *The International Journal of Cancer Epidemiology*. 2012: 36
146. Yi Wei L, Kong D, Bao B, Ahmad A, Sarkar F. Induction of cancer cell death by isoflavone: The role of multiple signaling pathways. *Nutrients*. 2011: 3; 877 – 896.