

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

VOL IV

 EDITORA
ARTEMIS
2024

Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços
e Possibilidades

Manuel Simões
(organizador)

VOL IV

 EDITORA
ARTEMIS
2024



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Manuel Simões
Imagem da Capa	Vivilweb/123RF
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil
Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil
Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México
Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil
Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof. Dr. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. José Cortez Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yañez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*
Prof. Dr. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodriguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*



Prof.ª Dr.ª Maria da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil
Prof.ª Dr.ª MªGraça Pereira, Universidade do Minho, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana, Cuba*
Prof.ª Dr.ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof. Dr. Melchor Gómez Pérez, *Universidad del Pais Vasco, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México
Prof.ª Dr.ª Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru*
Prof.ª Dr.ª Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.ª Dr.ª Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil
Prof.ª Dr.ª Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University, Russia*
Prof.ª Dr.ª Susana Álvarez Otero – Universidad de Oviedo, Espanha
Prof.ª Dr.ª Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal
Prof.ª Dr.ª Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Colômbia*
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León, Espanha*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades IV/ Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2024.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilingue

ISBN 978-65-81701-33-8

DOI 10.37572/EdArt_311024338

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina.
I. Simões, Manuel.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



PREFÁCIO

O volume IV da edição “Estudos em Biociências e Biotecnologia: Desafios, Avanços e Possibilidades” disponibiliza ao leitor informação científica avançada de caráter fundamentalmente aplicado. O livro está organizado em sete capítulos que focam essencialmente em conhecimento avançado em ciências biomédicas, neurociências, parasitologia, saúde animal e em processos avançados e sustentáveis de produção alimentar.

Manuel Simões

<https://orcid.org/0000-0002-3355-4398>

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE QUERCETINA ENZIMÁTICAMENTE MODIFICADA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX Y DE COLON

David Alejandro Macías Martín

Iliana del Carmen Barrera Martínez

Flor Yohana Flores Hernández

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243381

CAPÍTULO 2..... 13

DEVELOPMENTAL HETEROCHRONY AND ITS RELATIONSHIP WITH THE CELLULAR SENESCENCE: A NEW PERSPECTIVE ON THE ETIOLOGY OF NEURODEGENERATION

Ana Karen Ramírez- Reyes

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243382

CAPÍTULO 3..... 22

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS RENAL Y DEL BAZO (ISKNV) DEL PEZ CEBRA EN COLONIAS DE EXPERIMENTACIÓN DE ARGENTINA

Juan Martín Laborde

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243383

CAPÍTULO 4..... 36

PRESENCIA DE *ANAPLASMA MARGINALE* Y *BABESIA SPP.* EN *HAEMATOBIA IRRITANS* COLECTADAS EN NUEVO LEÓN

José Pablo Villarreal Villarreal

Pilar Elizabeth Rincón González

Jesús Jaime Hernández Escareño

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243384

CAPÍTULO 5..... 45

EVALUACIÓN DE LÍNEAS ÉLITE DE MAÍZ AZUL PARA VALLES ALTOS DE MÉXICO

José Luis Arellano-Vázquez

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

Luis Fernando Ceja-Torres
Martín Filiberto García Mendoza
Estela Flores-Gómez
Patricia Vázquez-Lozano
Donají Ariadna Ramírez López

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243385

CAPÍTULO 6..... 54

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE PROTEÍNAS DE *SPHENARIUM PURPURASCENS* EXTRAÍDAS CON ULTRASONIDO EN SALCHICHAS TIPO VIENA

Salvador Osvaldo Cruz-López
Yenizey Merit Alvarez-Cisneros

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243386

CAPÍTULO 7 68

PRODUCCIÓN ARTESANAL DE PILONCILLO CON ENFOQUE SOSTENIBLE

Luisiana Fabiola Palomo González
José Antonio de los Reyes
Marco A. Sánchez Castillo

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243387

SOBRE O ORGANIZADOR 118

ÍNDICE REMISSIVO 119

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE QUERCETINA ENZIMÁTICAMENTE MODIFICADA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX Y DE COLON¹

Data de submissão: 15/09/2024

Data de aceite: 02/10/2024

David Alejandro Macías Martín

Maestro en Ciencias en la
Unidad de Biotecnología
Médica y Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)
Guadalajara, Jalisco, México
<https://orcid.org/0000-0002-8287-8823>

Iliana del Carmen Barrera Martínez

Doctora en la Unidad de Biotecnología
Industrial del Centro de
Investigación y Asistencia en
Tecnología y Diseño del
Estado de Jalisco (CIATEJ)
Zapopan, Jalisco, México
<https://orcid.org/0000-0001-5391-6299>

Flor Yohana Flores Hernández²

Maestra en Ciencias en la
Unidad de Biotecnología
Médica y Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)
Guadalajara, Jalisco, México
<https://orcid.org/0000-0002-4231-1195>

RESUMEN: Actualmente, el cáncer es una enfermedad de alta incidencia en todo el mundo y uno de los principales tratamientos para destruir las células cancerosas es la quimioterapia. Sin embargo, las células sanas también son afectadas, provocando efectos secundarios graves que reducen la calidad de vida del paciente. Varios informes se centran en la investigación de nuevas moléculas como la quercetina, un conocido agente contra el cáncer que se consume en gran medida en la dieta humana. Sin embargo, tiene una baja biodisponibilidad debido a su escasa solubilidad, productos metabólicos inactivos y su corta vida media. Por tanto, es necesario desarrollar estrategias para mejorar los efectos antineoplásicos de la quercetina evitando daños graves a las células sanas. En este trabajo evaluamos si quercetina modificada enzimáticamente (EMQuer) conserva o ejerce una mayor actividad citotóxica contra células cancerosas que contra células no tumorales. La quercetina fue sometida a reacciones enzimáticas con lacasa. El material resultante (EMQuer-4 y EMQuer-8) y la quercetina se aplicaron en cultivos de células cancerosas HeLa y Caco-2 y células no tumorales Vero a diferentes concentraciones, seguido de un ensayo por citometría de flujo utilizando un kit de viabilidad celular para determinar la citotoxicidad. Cada condición experimental se ejecutó tres veces. Los resultados sugieren que EMQuer-4 y EMQuer-8 tienen un menor efecto inhibitorio sobre las células Vero no tumorales, en comparación con la quercetina,

¹ Agradecimientos a Proyecto Frontera 2019CF-2095609, financiado por CONAHCYT.

² Autor correspondiente.

y que se mejora la citotoxicidad contra las células de cáncer de cérvix HeLa y de cáncer de colon Caco-2. Una mejor eficacia de EMQuer en contraste con quercetina para suprimir el crecimiento de células cancerosas podría deberse al hecho de que se espera que la modificación enzimática, como la oxidación catalizada por lacasas, mejore la biodisponibilidad de la quercetina. Son necesarios más estudios utilizando derivados en diferentes líneas celulares tumorales y modelos animales de cáncer.

PALABRAS CLAVE: Quercetina. Citotoxicidad. Lacasa. Células de Cáncer.

IN VITRO CYTOTOXIC ACTIVITY OF ENZYMATICALLY MODIFIED QUERCETIN ON CERVIX UTERI AND COLON CANCER CELLS

ABSTRACT: Currently, cancer is a high incidence disease throughout the world and one of the main treatments to destroy cancer cells is chemotherapy. However, non-tumoral cells also get damaged or their growth turns slow, causing severe side effects that reduce patient's life quality. Several reports focus on anticancer analysis of new molecules such as quercetin, a well-known anticancer agent largely consumed in human diet. However, it has low bioavailability due to its poor solubility, inactive metabolic products and short half-life. Thus, it is necessary to develop strategies to improve quercetin anticancer effects avoiding severe damage to non-tumoral cells. In this work we evaluated whether enzymatically modified quercetin (EMQuer) preserves or exerts higher cytotoxic activity against human cancer cells than against non-tumoral cells. Quercetin was subjected to an enzymatical reaction with laccase. The resulting material (EMQuer-4 and EMQuer-8) and quercetin were applied on cultured HeLa and Caco-2 cancer cells and non-tumoral Vero cells at different concentrations for 72 h, followed by flow cytometry viability assay using the BD Cell Viability Kit to determinate cytotoxicity. Each experimental condition was run three times. The results suggest that EMQuer has lower inhibitory effect on non-tumoral Vero cells, when compared with unmodified quercetin, and cytotoxic activity against HeLa cervix cancer cells and Caco-2 colon cancer cells is improved. Better efficiency of EMQuer than unmodified quercetin on suppressing cancer cells growth might come from the fact that enzymatical modification such as laccase-catalyzed oxidation is expected to improve bioavailability of quercetin. Further studies are necessary by using derivatives on different tumoral cell lines and cancer animal models.

KEYWORDS: Quercetin. Cytotoxic activity. Laccase. Cancer cells.

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, siendo la tercera en México y la sexta a nivel global (INEGI 2024). En 2021, se reportaron 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes a nivel mundial, incluyendo 90,645 en México (OMS 2022; INEGI 2022). Se espera que para 2040 estas cifras aumenten significativamente (OMS 2023).

Existen varios tratamientos para el cáncer, una de las principales es la quimioterapia, aunque tiene desventajas debido a la resistencia que desarrollan las

células cancerosas (Xu et al., 2021). Por eso, se combinan con otros tratamientos para mejorar la efectividad (NIH 2021). En este contexto, la quercetina ha mostrado resultados prometedores en estudios recientes, inhibiendo la migración y crecimiento de células cancerosas, lo que la convierte en un potencial tratamiento (Zhaorigetu et al., 2021; Lin et al., 2017). Sin embargo, su baja biodisponibilidad es una limitante, es por ello que diversas investigaciones se enfocan en mejorar esta característica (Manzoor et al., 2021). Es por ello que la quercetina modificada enzimáticamente busca mejorar su biodisponibilidad y actividad antineoplásica (Khlopova et al., 2016; Karaki et al., 2016; Kurisawa et al., 2003). La lacasa es una enzima utilizada para obtener la quercetina modificada, actúa como oxidorreductasa que oxida un sustrato mediante la transferencia de cuatro electrones de moléculas de oxígeno diatómico originando moléculas de agua y reacciones de tipo cascada, de Diels-Alder, de oxigenación, de adición de Michael o acoplamientos oxidativos (Cardullo et al. 2022).

2 METODOLOGÍA

Se realizó un diseño experimental mediante triplicados de cada muestra para cada prueba, implementándose un control con quercetina estándar, en las líneas celulares de mamífero: VERO, correspondientes a células de riñón de mono verde africano (ATCC® CCL-81) como control de células sanas; y HeLa, adenocarcinoma de cérvix humano (ATCC® CRM-CCL-2) y Caco-2, adenocarcinoma colorrectal (ATCC-HTB-37). Estas se cultivaron con procedimientos recomendados por el proveedor, en ambiente controlado con medio de crecimiento D'MEM alto en glucosa (Medio Eagle modificado de Dulbecco, marca SIGMA) suplementado con 1% de antibióticos (10,000 U/ml Penicilina, 10,000 µg/ml Estreptomina, producto P4333 de la marca Sigma del lote 109323) y 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), a 37°C y 5% CO₂, con humedad relativa, realizando cambios de medio cada 2-3 días. Los ensayos *In vitro* se realizan cuando los cultivos alcanzan el 80% de confluencia (Campos-Silva y cols., 2018; Monsees y cols., 2005).

2.1 OBTENCIÓN DE QUERCETINA MODIFICADA ENZIMÁTICAMENTE

Se mezclan vigorosamente 10 mL de solución de quercetina 20 mM; 5 mL de solución de lacasa 1.6 U/mL con 5 mL de solución de quercetina 20 mM y 5 mL de solución de lacasa 0.8 U/mL con 5 mL de solución de quercetina 20 mM durante 24 h a 35°C, protegidos de la luz.

Así pues, se obtiene como control de comparación quercetina estándar (Quer), así como quercetina modificada por lacasa en concentración de 0.4 U/mL (EMQuer-4) y quercetina modificada por lacasa en concentración de 0.8 U/mL (EMQuer-8).

2.2 CITOTOXICIDAD POR MTT

Se preparan cantidades suficientes de soluciones y se retira el medio de cada uno de los pozos, puesto que la quercetina causa interferencia en la medición del analito; se realiza un lavado con PBS 1X a cada pocillo. Se mide la absorbancia de la solución de la prueba a la longitud de onda de 570 nm.

2.3 VIABILIDAD POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El marcaje para la determinación de la viabilidad utiliza el kit de viabilidad (BD™ *Cell Viability Kit* 349483). Se llevan al citómetro de flujo BD Accuri™ C6, se utilizan los gráficos SSC-A y FSC-A (*Side SCatter* y *Foreward SCatter*) para seleccionar la población celular y marcaje con solución acuosa de yoguro de propidio [4.3 mM (1X)] (detección FL3) y con solución de anaranjado de tiazol [42 μM (1X)] en DMSO (detección FL1) para mostrar las células vivas y muertas.

2.4 IDENTIFICACIÓN DE CONCENTRACIONES IC₅₀

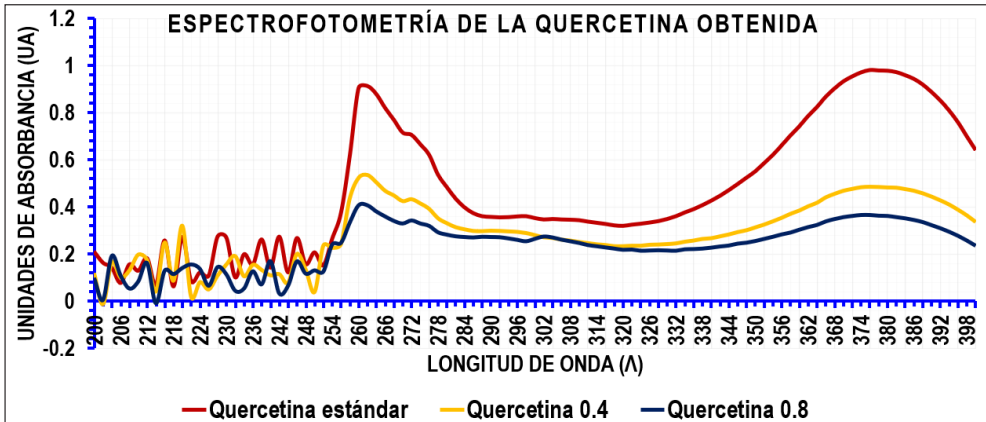
Se realiza el análisis por función probit utilizando el método gráfico de la pendiente para estimar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) al 50% de viabilidad celular y se eligen las concentraciones implementadas más próximas. Cada una de las concentraciones seleccionadas deberán de ser igualmente evaluadas en las correspondientes líneas de células sanas Vero.

3 RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DE QUERCETINA MODIFICADA ENZIMÁTICAMENTE

La quercetina se oxida al reaccionar con la lacasa tras 24 horas, cambiando su color de amarillo intenso a tonos ocre y pardo, siendo más oscuro en EMQuer-8 que en EMQuer-4. Según la figura 1, la quercetina presenta dos bandas características a longitudes de onda de 260 nm y 374 nm. Al oxidarse, la absorbancia de estas bandas disminuye, pero no aparece una nueva banda a 290 nm, como se reporta en estudios previos, lo que posiblemente se deba a la formación de una quinona conjugada.

Figura 1. Barrido espectrofotométrico de las soluciones de Quer, EMQuer-4 y EMQuer-8 elaboradas.

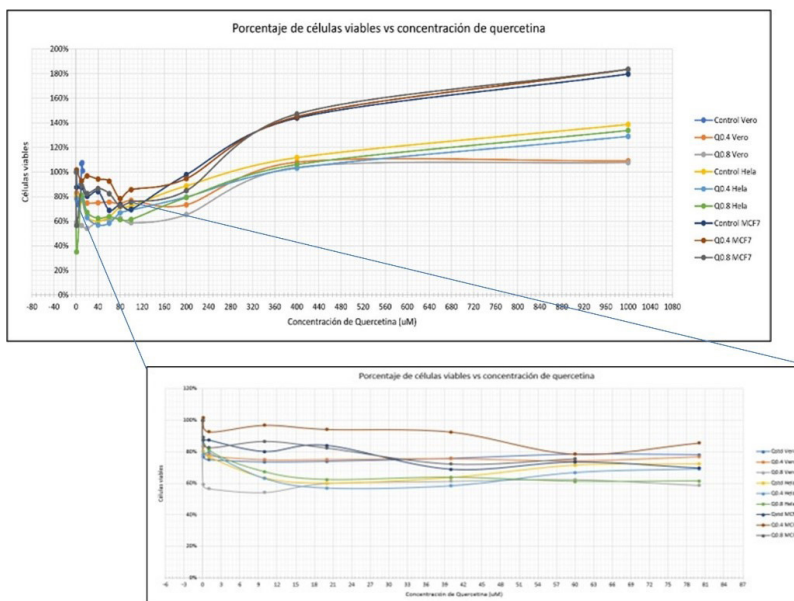


3.2 CITOTOXICIDAD POR MTT (3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE)

Líneas celulares Vero y Hela fueron expuestas a las concentraciones de quercetina en las soluciones preparadas con medio de cultivo durante 72 h para después haber sido sometidas a la prueba de MTT en la que finalmente se mide la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Como se muestra en la figura 3 contrariamente a lo esperado, la absorbancia en los cultivos aumenta con la concentración de quercetina, debido a su interacción con el compuesto MTT, fenómeno también observado en otros flavonoides (Peng et al., 2005). Sin embargo, a bajas concentraciones de quercetina, se notan ligeros descensos en la respuesta, lo que indica cierto grado de citotoxicidad antes de que interfiera en las mediciones a concentraciones más altas. Dado que la quercetina afecta la precisión del análisis, se decidió utilizar citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular, permitiendo distinguir entre células vivas, muertas, y otros fragmentos.

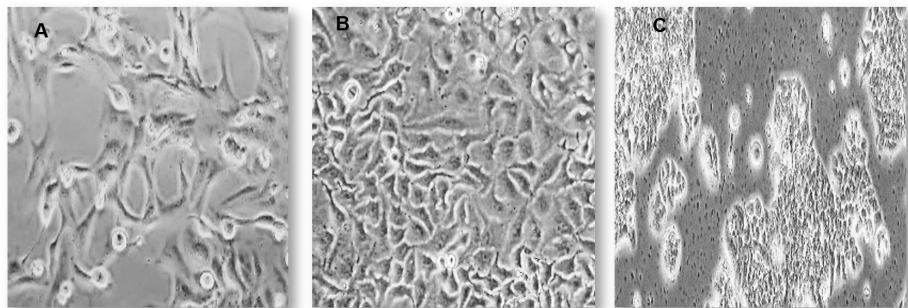
Figura 3. Se puede apreciar un incremento consistente de absorbancia nivel por nivel, sugiriendo que la biomolécula quercetina, en interacción con el compuesto MTT, produce absorbancia como lo haría el metabolito formazan a una longitud de onda de aproximadamente 570 nm.



3.3 VIABILIDAD POR CITOMETRÍA DE FLUJO

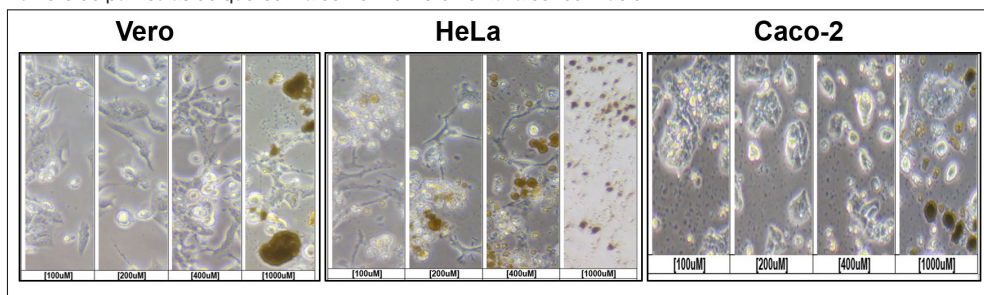
Se aplicó una solución de tratamiento de quercetina a cultivos celulares en tres placas de 12 pozos, incubadas durante 72 horas en reposo y protegidas de la luz. En la figura 4 se observan imágenes representativas de los controles celulares sin tratamiento, mostrando un cultivo de células Vero. Debido a que la quercetina es insoluble en agua, se observan precipitados finos en concentraciones de 100 μM, 200 μM, 400 μM y 1000 μM en los cultivos de células Vero, lo cual se mantuvo constante a lo largo del tratamiento. En cambio, en las células Hela (figura 5), el precipitado comenzó siendo fino y terminó aglomerándose en todas las concentraciones.

Figura 4. Fotografías representativas de los cultivos celulares implementados en las evaluaciones a un aumento de 200X. A. Células Vero (ATCC-CCL-81). B. Células Hela (ATCC-CCL-2). C. Células Caco-2 (ATCC-HTB-37).



Se observaron células Vero adheridas en todos los pozos donde fueron expuestas a diferentes concentraciones de quercetina de todos los tratamientos en el medio de cultivo, como se muestra en las figura 5 se puede apreciar cómo la confluencia celular disminuye y el detrito se incrementa conforme se aumenta la concentración de quercetina en el medio.

Figura 5. Fotografías representativas de los cultivos celulares expuestos a quercetina oxidada, a un aumento de 200X. Se observan cambios evidentes en la morfología, adhesión y proliferación. Se puede apreciar el aumento del número de partículas de quercetina conforme incrementa la concentración.



Asimismo, se observaron células HeLa adheridas en los pozos donde fueron expuestas a las concentraciones de quercetina de todos los tratamientos en el medio de cultivo, se puede apreciar cómo desde las más bajas concentraciones la confluencia celular disminuye y el detrito se incrementa conforme se aumenta la concentración de quercetina en el medio. Las células Hela se presentan muy afectadas, nivel a nivel, con morfologías cada vez más alteradas.

Se observaron células Caco-2 adheridas en los pozos donde fueron expuestas a las concentraciones de quercetina de todos los tratamientos en el medio de cultivo, se puede apreciar cómo la confluencia celular disminuye, las morfologías se alteran y el detrito se incrementa conforme se aumenta la concentración de quercetina en el medio. Posteriormente las suspensiones celulares pasaron a adquirirse en el citómetro Accuri C6.

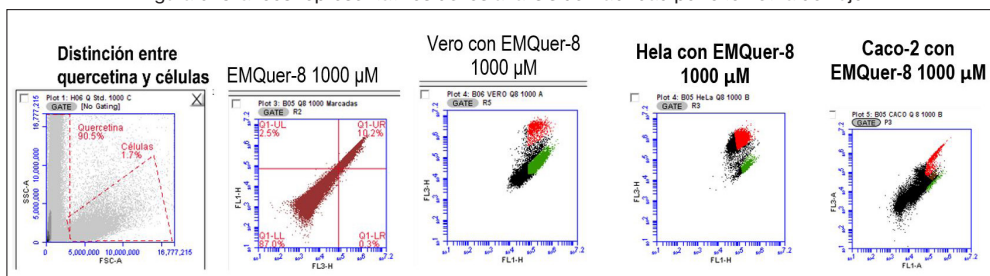
3.4 ADQUISICIÓN DE SOLUCIONES DE TRATAMIENTO CON QUERCETINA

Las soluciones de tratamiento con quercetina fueron adquiridas por el citómetro como blanco para visualizar y determinar las áreas de respuesta de la biomolécula a las diferentes concentraciones de prueba, obteniéndose los gráficos mostrados en la figura 6.

3.5 ADQUISICIÓN DE CÉLULAS Y PRUEBA DE VIABILIDAD

Como se muestra en la figura 6, se verificó que los campos de detección de las diferentes muestras no se invadieran para evitar conteos erróneos de las células evaluadas; así se aseguró que las respuestas de las células viables (color verde, positivas por naranja de tiazol) son agrupadas en un área exclusiva donde no se agrupan ni la quercetina (color marrón), ni las células alteradas y no viables (color rojo, positivas por yoduro de propidio), ni el medio de cultivo, ni el detrito. Dicha área ha sido abarcada por los controles positivos y evitada por los controles negativos.

Figura 6. Gráficos representativos de los análisis de viabilidad por citometría de flujo.

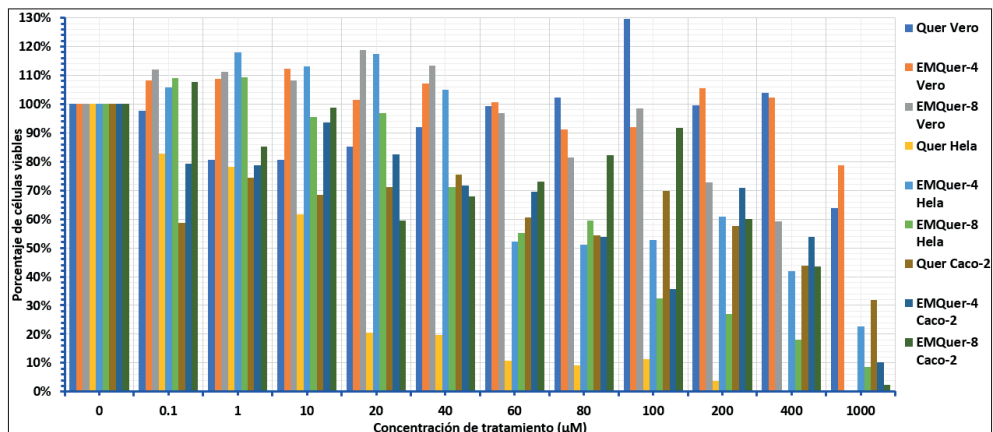


En la microscopía se observó que la línea celular Vero mantuvo un número considerable de células viables incluso a las concentraciones más altas de quercetina, con pequeñas variaciones en cada tratamiento. En cambio, la línea celular HeLa mostró una disminución progresiva en el número de células viables a medida que aumentaba la concentración de quercetina, especialmente con el tratamiento con quercetina. Ambos comportamientos se pueden apreciar en la figura 6.

El número de células viables de la línea Caco-2 disminuye de manera menos pronunciada, como se observa en la figura 6. Las agrupaciones de células viables (puntos verdes) disminuyen de tamaño con cada concentración de quercetina, especialmente con EMQuer-8. Al mismo tiempo, las agrupaciones de células no viables (puntos rojos) aumentan de tamaño con el incremento de quercetina. También se observan unidades de color negro fuera de las áreas de conteo, debido a alteraciones en la integridad celular.

La contabilización celular de las líneas Vero, Hela y Caco-2 se realizó calculando mediante el software *Microsoft Office Excel* el porcentaje de células viables respecto al control negativo correspondiente, obteniendo los gráficos mostrados en la figura 7.

Figura 7. Se puede apreciar cómo las células de las líneas HeLa y Caco-2 pierden más del 60% de su viabilidad, llegando a presentar 0% de viabilidad en HeLa con la quercetina Quer (Qstd) y un comportamiento similar de Caco-2 con la quercetina EMQuer8 (Q0.8); mientras que las células de la línea Vero se ven menos afectadas, perdiendo no más del 40% de su viabilidad.



Se puede apreciar cómo las células de las líneas HeLa y Caco-2 pierden más del 60% de su viabilidad, llegando a presentar 0% de viabilidad de HeLa con la Quer, así como de Caco-2 con la EMQuer-8; mientras que las células de la línea Vero se ven menos afectadas, perdiendo no más del 40% de su viabilidad. Los resultados encontrados arrojan los datos mostrados en la tabla 1, para las IC_{50} según el análisis probit.

Tabla 1. Concentraciones IC_{50} de las líneas celulares evaluadas. Quer: Quercetina estándar; EMQuer-4: Quercetina reaccionada con 0.4 U/mL de lacasa; EMQuer-8: Quercetina reaccionada con 0.8 U/mL de lacasa; IC_{50} : Concentración inhibitoria 50. Las concentraciones se encuentran expresadas en μM .

	Vero	HeLa	Caco-2
Compuesto	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
Quer	110	50	200
EMQuer-4	290	20	100
EMQuer-8	240	20	400

Como se muestra en la tabla 1, la IC_{50} de quercetina estándar para la línea celular HeLa se encuentra muy próxima a una concentración de [20 μM]; resultado similar a algunos otros encontrados: [30 μM] según Xu y cols. y HERNI y cols. 2021; [26 μM] según Pani y cols. 2020, o [110 μM] según Eren y cols. 2021.

Asimismo, se pueden encontrar publicaciones con resultados variados para la línea celular Caco-2 como concentraciones de [50 μM] según Psahoulla y cols. 2007; [70 μM] según Volstatova y cols. 2019, o [200 μM] según Chabane y cols. 2009 y Gonzales y cols. 2016.

Las concentraciones inhibitorias identificadas coinciden con algunas publicaciones previas y los resultados nos muestran de manera contundente una distinción marcada en los efectos ejercidos por la quercetina entre la línea de células sanas Vero y las líneas de células cancerosas HeLa y Caco-2.

4 CONCLUSIÓN

Se identificaron IC_{50} de quercetina modificada enzimáticamente en líneas celulares de cáncer de colon (EMQuer-4: 400 μ M y EMQuer-8: 200 μ M) y cérvix (EMQuer-4: 60 μ M y EMQuer-8: 80 μ M). Estas concentraciones coinciden con lo reportado previamente. Los resultados indican una disminución notable de los efectos citotóxicos de la quercetina EMQuer en las células sanas Vero, pero no en las células cancerosas HeLa y Caco-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Campos-Silva I., M. Palomar-Pardavé, R. Pérez Pastén-Borja, O. Kahvecioglu Feridun, D. Bravo-Bárceñas, C. López-García, R. Reyes-Helguera, Tribocorrosion and cytotoxicity of FeB-Fe2B layers on AISI 316 L steel, *Surface and Coatings Technology*, Volume 349, 2018, Pages 986-997, ISSN 0257-8972, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.05.085>

Cardullo Nunzio, Muccilli Vera & Tringali Corrado (2022) Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues, *RSC Chem. Biol.*, 2022,3, 614-647, <https://doi.org/10.1039/D1CB00259G>

Chabane, Y. N., Bouchard, H., & Sancey, L. (2009). Cellular uptake and cytotoxicity of flavonoids in the human colon cancer cell line Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(9), 870-879. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.001>

Eren, M., Kilic, E., & Ozturk, N. (2021). Quercetin-induced apoptosis in HeLa cells: A comprehensive study on the molecular mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(2), 147-157. <https://doi.org/10.1002/jcb.29900>

Gonzales, C., Lima, F. S., & de Castro, M. (2016). Quercetin effects on oxidative stress and cell death in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.019>

Herni, L., Suzuki, K., & Takano, Y. (2021). Quercetin inhibits the proliferation of HeLa cells through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Journal of Medicinal Food*, 24(8), 802-811. <https://doi.org/10.1089/jmf.2021.0011>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2022). Estadísticas de mortalidad. <https://www.inegi.org.mx/temas/mortalidad/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2024). Mortalidad por cáncer en México. <https://www.inegi.org.mx/>

Karaki Nadine, Abdulhadi Aljawish, Catherine HµMeau, Lionel Muniglia, Jordane Jasniowski, Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 90, 2016, Pages 1-18, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>

Khlupova Maria, Irina Vasil'eva, Galina Shumakovich, Olga Morozova, Vyacheslav Chertkov, Alla Shestakova, Alexander Kisin, Alexander Yaropolov, Laccase-mediated biotransformation of dihydroquercetin (taxifolin), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 123, 2016, Pages 62-66, ISSN 1381-1177, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.11.010>

Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H. and Kobayashi, S. (2003), Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly(catechin). *Macromol. Biosci.*, 3: 758-764. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300038>

Lin, J., Chen, Y., Cai, T., & Lee, C. (2017). Quercetin suppresses tumor growth by inhibiting the expression of heat shock protein and blocking autophagy in human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 37(2), 928–934. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5453>

Manzoor Muhammad Faisal, Abid Hussain, Aysha Sameen, Amna Sahar, Sipper Khan, Rabia Siddique, Rana Muhammad Aadil, Bin Xu, Novel extraction, rapid assessment and bioavailability improvement of quercetin: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 78, 2021, 105686, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105686>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417721002285>)

Monsees T, K, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk R, H, W: Effects of Different Titanium Alloys and Nanosize Surface Patterning on Adhesion, Differentiation, and Orientation of Osteoblast-Like Cells. *Cells Tissues Organs* 2005;180:81-95. doi: 10.1159/000086749

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). Global cancer statistics. <https://www.who.int/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2023). Cancer facts and projections. <https://www.who.int/>

Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2020). Quercetin-induced autophagy and apoptosis in HeLa cells: The role of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 161, 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.004>

Pani, S., Mohapatra, S., Sahoo, A., Baral, B., Debata, P. R.. Shifting of cell cycle arrest from the S-phase to G2/M phase and downregulation of EGFR expression by phytochemical combinations in HeLa cervical cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022; 36:e22947. <https://doi.org/10.1002/jbt.22947>

Peng, L., Hao, Y., & Wang, Q. (2005). Flavonoids' interactions with MTT and their effect on cell viability assays. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 63(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.12.002>

Pshoulla, E., Costas, M., & Paraskevi, A. (2007). Effects of quercetin on the growth and survival of human colorectal cancer cells (Caco-2). *Cancer Letters*, 258(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.09.006>

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

Timbola, A. K., Souza, C. D. de., Giacomelli, C., & Spinelli, A.. (2006). Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(J. Braz. Chem. Soc., 2006 17(1)). <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100020>

Volstatova, K., Mertlikova-Kaiserova, H., & Martinek, J. (2019). Differential cytotoxicity of flavonoids in Caco-2 cells: A role of metabolism. *Toxicology in Vitro*, 57, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.003>

Xu, J., Cao, K., & Wu, C. (2021). Mechanistic insights into quercetin's anticancer effects on HeLa cells: A role of p53 signaling. *European Journal of Pharmacology*, 902, 174091. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174091>

Xu, W., Xie, S., Chen, X., Pan, S., Qian, H., & Zhu, X. (2021). Effects of Quercetin on the Efficacy of Various Chemotherapeutic Drugs in Cervical Cancer Cells. *Drug design, development and therapy*, 15, 577–588. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S291865>

Zhaorigetu, S., Omoigui, S., & Fang, X. (2021). Quercetin's role in cancer treatment: Mechanisms and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6531. <https://doi.org/10.3390/ijms22126531>

SOBRE O ORGANIZADOR

Manuel Simões é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; Nº orcid: 0000-0002-3355-4398

ÍNDICE REMISSIVO

A

ADN 22, 29, 30, 36, 37, 39, 40

C

Calidad y productividad 69, 105

Cellular senescence 13, 17, 18, 19, 20, 21

Células de cáncer 1, 2

Chronoarchitecture 13, 18, 19, 20

Citotoxicidad 1, 2, 4, 5

Comercio justo 69, 104, 107, 108

Comunidades Tének 69, 71, 77, 78, 79, 80, 84, 87, 88, 93, 100, 101, 102, 103, 104, 107, 109, 112, 114, 115, 116

D

Desarrollo sostenible 68, 69, 70, 71, 87, 92, 93, 108, 111, 114, 115, 116

E

Endogamia 46, 48

Evaluación sensorial 54

F

Fenol cloroformo 36, 37, 39

H

Heterochrony 13, 18

Hibridación 46, 47, 48

I

Iridovirus 22, 28, 34

L

Lacasa 1, 2, 3, 4, 9

M

Maíz pigmentado 46

N

Neurodegeneration 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Neuronal death 13, 14, 15, 16, 17, 19

P

PCR 22, 29, 30, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 42

Pez cebra 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33

Piloncillo artesanal 69, 70, 73, 86, 87, 92, 107, 108, 111

Proteína de insecto 54

Q

Quercetina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

S

Salchichas 54, 56, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65

Sphenarium purpurascens 54, 55, 57, 64, 65, 67

U

Ultrasonido 54, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65

Z

Zea mays L. 46, 52