



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA
DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *Graphostroma sp*, UN
HONGO ENDOFÍTO DE *Taxus globosa*”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

LESLIE IVETTE NÚÑEZ DE LA ROSA



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	Marco Antonio Ortiz Jiménez
VOCAL:	Profesor:	Aurora Lara Núñez
SECRETARIO:	Profesor:	Luis Bernardo Flores Cotera
1er. SUPLENTE:	Profesor:	Norma Angélica Camacho de la Rosa
2° SUPLENTE:	Profesor:	Verónica Domínguez Valdez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
(CINVESTAV).

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Zoila Rosa Flores Bustamante

SUSTENTANTE

Leslie Ivette Núñez De la Rosa

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 CÁNCER: GENERALIDADES.....	3
2.2 TRATAMIENTOS ACTUALES.....	6
2.2.1 Terapia dirigida.....	8
2.3 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTES DE COMPUESTOS MEDICINALES.....	11
2.3.1 Hongos endofitos.....	12
2.4 <i>GRAPHOSTROMA SP</i>	14
2.5 CULTIVO Y FERMENTACIÓN DE HONGOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO MICROBIANO.....	16
2.5.1 Cultivo.....	17
2.5.2 Fermentación.....	18
2.5.3 Etapas para la obtención de un producto microbiano.....	19
2.6 ANTIPROLIFERACIÓN.....	21
2.7 ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>GRAPHOSTROMA SP</i>	22
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 GENERAL.....	25
4.2 ESPECÍFICOS.....	25
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
5.1 MATERIAL MICROBIOLÓGICO.....	26
5.2 REACTIVACIÓN Y SIEMBRA.....	26
5.3 CONSERVACIÓN.....	26
5.4 PREPARACIÓN DE MEDIO CZAPECK-DOX BROTH PARA LA INOCULACIÓN DEL HONGO.....	27
5.5 PRE-INÓCULO 1.....	28
5.6 PRE-INÓCULO 2.....	28
5.7 INOCULACIÓN DEL CULTIVO MASIVO.....	28
5.8 EXTRACCIÓN.....	29
5.8.1 Sobrenadante.....	30

5.8.2 Micelio	30
5.9 ENSAYO DE ANTIPROLIFERACIÓN EN CÉLULAS HELA.....	31
5.10 PURIFICACIÓN	32
5.10.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	32
5.10.2 Cromatografía flash, Isolera™ ONE	33
5.10.3 Cromatografía en columna (CC).	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
6.1 CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS.....	37
6.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA	39
6.3 PURIFICACIÓN	43
6.4 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS	48
6.5 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS ESTUDIOS PRELIMINARES	49
7. CONCLUSIONES	51
8. PERSPECTIVAS	52
9. ANEXOS	53
9.1 ANEXO A. MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>GRAPHOSTROMA SP.</i>	53
9.2 ANEXO B. PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES A PROBAR DEL EXTRACTO CRUDO Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS.	54
9.3 ANEXO C. CÁLCULOS PARA LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.	56
9.4 ANEXO D. CÁLCULOS PARA LA OBTENCIÓN DE LA IC ₅₀ DE LOS EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS EN CADA LOTE, TANTO DEL SOBRENADANTE COMO DEL MICELIO.	57
9.5 ANEXO E. CÁLCULOS PARA LA OBTENCIÓN DE LA IC ₅₀ DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CC REALIZADA AL EXTRACTO DE LOS CALDOS DE CULTIVO.	59
10. REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<u>ABREVIATURA</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
atm	Atmósfera
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cm ²	Centímetro cuadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CZA	Agar Czapek
Fig.	Figura
g	Gramos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
h	Hora
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro cuadrado
p/v	Peso/volumen

pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Agar papa-dextrosa
RI	Índice de retención
rpm	Revoluciones por minutos
s	Segundo
v/v	Volumen/Volumen
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
IC ₅₀	50% Inhibitory Concentration
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
Extracto S	Extracto orgánico obtenido del sobrenadante
Extracto M	Extracto obtenido del micelio
vvm	Volumen de aire por Volumen de medio por Minuto

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. EJEMPLOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA AISLADOS DE HONGOS ENDOFÍTOS. ⁽³¹⁾	13
TABLA 2. COMPOSICIÓN DEL MEDIO CZAPECK-DOX BROTH	27
TABLA 3. PARÁMETROS SELECCIONADOS PARA LLEVAR A CABO LA CORRIDA DE CROMATOGRAFÍA FLASH EN ISOLERA ONE.	34
TABLA 4. PESOS DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS MEDIANTE LA PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL SOBRENADANTE Y LICUADO CON SOLVENTE DEL MICELIO.	40
TABLA 5. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DEL SOBRENADANTE Y DEL MICELIO DE LOS CUATRO LOTES DE <i>GRAPHOSTROMA SP.</i>	41
TABLA 6. IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS CRUDOS OBTENIDOS DEL SOBRENADANTE Y DEL MICELIO. 43	
TABLA 7. PESO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS Y RENDIMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE MUESTRA SOMETIDA A LA PURIFICACIÓN PRIMARIA.	47
TABLA 8. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE IC₅₀ DE LAS 14 FRACCIONES OBTENIDAS EN LA CC. 48	
TABLA 9. VARIACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL FRACCIONAMIENTO PRIMARIO, EN LA METODOLOGÍA PRELIMINAR Y LA ACTUAL.	50
TABLA 10. MEDICIONES DEL DIÁMETRO DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA SG22 EN PLACAS DE AGAR PDA A LOS DÍAS 2, 3, 7, 8 Y 9. FUERON REALIZADAS LAS MEDICIONES DE CUATRO PLACAS PARA CADA DÍA, CUATRO VECES CADA UNA.	53
TABLA 11. CÁLCULOS REALIZADOS A PARTIR DE DATOS TEÓRICOS TOMADOS DE LA TESIS DE PACHECO, D. DE LAS CONCENTRACIONES A PROBAR. A PARTIR DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO OBTENIDO, SE CALCULÓ LA CANTIDAD POR MATRAZ	54
TABLA 12. CÁLCULOS REALIZADOS PARA CONOCER LA CANTIDAD A PESAR DE CADA EXTRACTO O FRACCIÓN, LA CANTIDAD REAL PESADA Y, AL SER AFORADO A 5 ML, EL VOLUMEN A TOMAR PARA TENER LAS CONCENTRACIONES SELECCIONADAS.	55
TABLA 13. % DE SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS TRATADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO CRUDO OBTENIDO DEL SOBRENADANTE DEL LOTE 1.	57
TABLA 14. % DE SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS TRATADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN 5 OBTENIDA DEL EXTRÁCTO ORGÁNICO CRUDO DEL SOBRENADANTE DE <i>GRAPHOSTROMA SP.</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PAPEL DE LOS GENES Y EL MEDIOAMBIENTE EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER. A) PORCENTAJE DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES GENÉTICOS Y MEDIOAMBIENTALES, QUE ES 5-10% Y 90-95% RESPECTIVAMENTE. B) RELACIONES ENTRE EL RIESGO DE CÁNCER Y LA PREVALENCIA FAMILIAR. C) PORCENTAJE DE LA CONTRIBUCIÓN DE CADA FACTOR AMBIENTAL. ⁽¹⁵⁾	5
FIGURA 2. FRECUENCIA DE USO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON CÁNCER EN EL 2001 Y EN EL 2005. ⁽¹⁹⁾	8
FIGURA 3. CUATRO CATEGORÍAS DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DURANTE LOS PASADOS 50 AÑOS. LOS PRODUCTOS NATURALES CITOTÓXICOS JUGARON UN ROL PRINCIPAL EN LA QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL HASTA FINALES DE LOS AÑOS 90'S, CON EL SURGIMIENTO DE LA TERAPIA MOLECULAR DIRIGIDA. ⁽²⁴⁾	10
FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL TAXOL®. ES UNA ESTRUCTURA COMPLEJA EN LA QUE DESTACA UN ESQUELETO HIDROCARBONADO FORMADO POR TRES CICLOS DE 6 Y 8 Y 6 CARBONOS POLISUSTITUIDOS CON CUATRO METILOS Y OCHO FUNCIONES OXIGENADAS. LA MOLÉCULA POSEE UN TOTAL DE 11 ESTEREOCENTROS. ⁽³⁵⁾	14
FIGURA 5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>GRAPHOSTROMA SP.</i> (NCBI: TAXONOMY, 2014)	16
FIGURA 6. ESQUEMA DE LAS PARTES DEL SISTEMA PARA EL CULTIVO EN MATRAZ Y CULTIVO EN FERMENTADOR.	19
FIGURA 7. INTERVENCIÓN DE ALGUNOS COMPUESTOS NATURALES EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL CICLO CELULAR. EN MORADO SE IDENTIFICAN LAS SUSTANCIAS BIOACTIVAS QUE ACTÚAN SOBRE DISTINTAS MOLÉCULAS DEL CICLO CELULAR, MARCADAS EN VERDE. LAS FASES DEL CICLO CELULAR SE ILUSTRAN EN COLOR ROSA. ⁽⁴⁸⁾	21
FIGURA 8. REPRERESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CONDICIONES REALIZADAS POR PACHECO, D.	23
FIGURA 9. INOCULACIÓN Y CULTIVO DE GARRAFONES.	29
FIGURA 10. SISTEMA ISOLERA™ ONE PARA CROMATOGRAFÍA FLASH. EL SISTEMA CUENTA CON UNA BOMBA QUE SUMINISTRA LOS SOLVENTES DE ACUERDO A LA PROPORCIÓN INDICADA, CARTUCHOS CON SÍLICA EN LOS QUE SE COLOCA LA MUESTRA, Y UN SOFTWARE QUE ARROJA LOS RESULTADOS EN UN CROMATOGRAMA.	33
FIGURA 11. GRADIENTE DE MEZCLA DE SOLVENTES. SE OBSERVA COMO SE PARTE DE UN 100% DE HEXANO Y SE VA CAMBIANDO GRADUALMENTE HASTA LLEGAR A UNA PROPORCIÓN DEL 100% DE ACETATO DE ETILO. CADA VOLUMEN DE COLUMNA CORRESPONDE A 75 ML DE SOLVENTE O MEZCLA DE SOLVENTES.	36
FIGURA 12. ENDOFÍTO <i>GRAPHOSTROMA SP.</i> A) CRECIMIENTO DE 9 DÍAS EN MEDIO PDA. B) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA EN 40X.	38
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS DEL HONGO ENDOFÍTO <i>GRAPHOSTROMA SP.</i> 1) EXTRACTO OBTENIDO POR PARTICIONES SUCESIVAS LÍQUIDO – LÍQUIDO CON ACETATO DE ETILO DEL SOBRENADANTE. 2) EXTRACTO OBTENIDO MEDIANTE LICUADO CON ACETATO DE ETILO DEL MICELIO. CROMATOPLACA ELUÍDA CON ACOEt : HEXANO; 50:50.	42
FIGURA 14. CROMATOGRAMA OBTENIDO EN UN EQUIPO ISOLERA™ ONE EN EL CUAL SE OBSERVA LA VARIACIÓN DE COLORES, LO QUE INDICA LA PRESENCIA DE COMPUESTOS QUE ABSORBEN A DISTINTOS VALORES DEL ESPECTRO UV, Y ELUYEN CON PORCENTAJES DIFERENTES DE LA MEZCLA ACETATO DE ETILO – HEXANO, ASÍ COMO CON PORCENTAJES DIFERENTES DE LA MEZCLA METANOL – ACETATO DE ETILO. EN EL EJE Y, A LA DERECHA, SE REPRESENTA EL % DE ACETATO DE ETILO O EL % DE METANOL, MIENTRAS QUE EN EL EJE X SE REPRESENTAN LOS VOLÚMENES DE COLUMNA. LA LÍNEA AZUL INDICA EL	

GRADIENTE DE LA MEZCLA ACETATO DE ETILO – HEXANO Y LA LÍNEA AMARILLA REPRESENTA EL GRADIENTE DE LA MEZCLA METANOL – ACETATO DE ETILO. SE APRECIAN 6 PICOS DE ABSORCIÓN. ...	44
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO –CCF- DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR EL EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA FLASH. CROMATOPLACAS ELUÍDAS CON ACOET : HEXANO; 50:50..	45
FIGURA 16. REPRESENTACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO –CCF- DEL EXTRACTO DE SOBRENADANTE Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA PURIFICACIÓN PRIMARIA –CC-. EC) EXTRACTO DEL SOBRENADANTE OBTENIDO POR PARTICIONES SUCESIVAS LÍQUIDO – LÍQUIDO CON ACOET. 1-10) FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE EL GRADIENTE DE ELUCIÓN REALIZADO EN CC. CROMATOPLACAS ELUÍDAS CON ACOET: HEXANO; 50:50. 11-14) FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE LA ELUCIÓN CON METANOL. (11, ACOET: METANOL, 50:50; 12 Y 13, ACOET: METANOL, 10:90; 14, METANOL, 100%) CROMATOPLACAS ELUÍDAS CON ACOET: MEOH; 10:90.	46

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas actuales en la salud pública mundial es el cáncer, cuya manifestación repercute en el enfermo, la familia y la sociedad. La incidencia de ésta enfermedad se ha incrementado en países donde la esperanza de vida es mayor y así, en Estados Unidos de América la tercera parte de la población total está enferma de algún tipo de cáncer y la cuarta parte de estos enfermos muere. ⁽¹⁾ En México, el cáncer ocupa una de las primeras causas de muerte. ⁽²⁾ La aplicación de tratamientos adecuados que combinan cirugía, radioterapia y quimioterapia ha permitido mejorar en gran medida la expectativa de vida de los pacientes con cáncer y disminuir la mortalidad. ⁽³⁾ Los fármacos antitumorales actúan sobre la división celular, inhibiéndola u obstaculizándola, y los compuestos derivados de plantas han sido una fuente importante de muchos agentes clínicos útiles para el tratamiento del cáncer. ⁽⁴⁾ Estos compuestos incluyen a la vinblastina, vincristina, derivados de la camptotecina, topotecán e irinotecán, etopósido y el paclitaxel (Taxol[®]), el cual fue aislado de la corteza interna del árbol *Taxus brevifolia*. ⁽⁵⁾

Una de las fuentes naturales más importantes en la producción de sustancias con actividad terapéutica son los organismos vivos, entre los cuales destacan los hongos. Los hongos filamentosos, donde se incluyen los endofitos, son un grupo que biosintetiza una gran cantidad de metabolitos secundarios, llegando en casos especiales a una producción 73% mayor que otras clases de organismos, como las bacterias. Los hongos endofitos habitan en el interior de las plantas y representan una valiosa fuente de productos bioactivos. ⁽⁶⁾ La cepa SG22 del hongo del género *Graphostroma sp*, asociado a la especie de árbol *Taxus globosa*, se mantiene prácticamente sin ningún estudio químico ni biológico, por lo tanto, podría representar una fuente potencial de sustancias de interés farmacológico.

De acuerdo a la bioprospección de algunos de los hongos endofitos aislados de *T. globosa* realizada previamente por Pacheco, D., en el laboratorio de Metabolismo Secundario de microorganismos del CINVESTAV, la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* fue seleccionada para el estudio de las fracciones obtenidas a partir del extracto del sobrenadante, debido a su actividad antiproliferativa, lo que indica la producción de metabolitos con potencial actividad biológica. ⁽⁷⁾

El presente trabajo consistió en realizar una metodología experimental para cultivar la cepa SG22 del hongo endofito *Graphostroma sp* aislado de *T. globosa*, purificar el extracto obtenido del sobrenadante y evaluar la actividad antiproliferativa de las fracciones purificadas. Para ello se emplearon las técnicas de cultivo en matraces, cultivo masivo en garrafones, extracción líquido-líquido, diversas cromatografías, y el ensayo de MTT. Se obtuvieron fracciones primarias las cuales fueron evaluadas y cuyos resultados demostraron actividad antiproliferativa, lo que sugiere la presencia de sustancias bioactivas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CÁNCER: GENERALIDADES

La palabra cáncer se utiliza para denominar a un conjunto de neoplasias malignas de origen epitelial, mesenquimal (sarcomas) y hematológico. El cáncer involucra diferentes mutaciones genéticas y cambios epigenéticos en protooncogenes (genes que normalmente controlan qué tan a menudo se dividen las células y el grado en el cuál se diferencian) convirtiéndolos en oncogenes, genes supresores de tumores (genes normales que controlan la división celular, la reparación del DNA, y la apoptosis), genes de reparación celular y micro RNA's; con el fin de conferirle un fenotipo maligno a un clon celular, es decir, adquiere la capacidad de ser autodependiente, invadir y evadir la respuesta inmune, y de ésta manera formar tumores. ⁽⁸⁾

En una célula normal, cuando el DNA es dañado, la célula misma repara el daño o provoca la muerte celular mediante un proceso denominado "apoptosis".

En cambio, en las células cancerosas, el daño en el DNA no es reparado y la célula no muere como debería, por lo que sigue dividiéndose y produciendo nuevas células que el cuerpo no necesita. Una sola célula cancerígena rodeada por tejido saludable se replicará a una velocidad más alta que las otras células, provocando una alteración en el suministro de nutrientes. Una vez que una masa tumoral pequeña se ha formado, el tejido sano no será capaz de competir con las células cancerosas por los nutrientes provenientes de la circulación sanguínea y las células tumorales desplazarán a las células sanas. ⁽⁹⁾

Las células cancerígenas se caracterizan por múltiples rasgos estructurales, moleculares y de comportamiento, y de acuerdo a una reciente descripción, "seis alteraciones esenciales en la fisiología de las células dirigen colectivamente el crecimiento maligno: autosuficiencia en la señalización de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, evasión de la muerte

celular programada (apoptosis), gran capacidad proliferativa, angiogénesis sostenida y la invasión de los tejidos (metástasis).⁽¹⁰⁾

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada de manera ordenada por una serie de cascadas de señalización que activan mecanismos los cuales se llevan a cabo bajo ciertas situaciones. Entre esos mecanismos se encuentra el sistema de la cascada de señalización de caspasas.⁽¹¹⁾ La apoptosis dependiente de las caspasas se caracteriza por la activación de una familia de proteasas: las caspasas; resultando en una ordenada ruptura de la célula, sin fuga de los componentes celulares, y sin una inducción de inflamación.

Existen dos vías a través de las cuales la familia de caspasas puede ser activada: una es la señal de muerte inducida (vía extrínseca), una vía inducida por señales extracelulares que dan como resultado la unión de ligandos a receptores transmembranales específicos (receptores de muerte); y la otra (vía intrínseca), es la inducida por condiciones de estrés, como el daño al DNA y el estrés oxidativo, y es una vía mediada por la mitocondria.

Basándonos en el rol de mantenimiento de la homeostasis, no es sorprendente que las alteraciones en la apoptosis jueguen un papel importante en el desarrollo del cáncer.⁽¹³⁾

Alteraciones en el proceso de apoptosis pueden llevar a un crecimiento incontrolado de las células y la formación de un tumor. Además, una correcta función de la maquinaria apoptótica es crítica para la susceptibilidad del tumor al tratamiento.

Se ha observado que la mayoría de los procesos cancerígenos no tienen un origen hereditario, si no dependiente de factores relacionados con el estilo de vida (Fig. 1), como los hábitos alimenticios, fumar, el consumo de alcohol, contaminación ambiental, radiación, y las infecciones; teniendo una profunda influencia en su desarrollo. Aunque los factores hereditarios no pueden ser modificados, el estilo de vida y los factores medioambientales son potencialmente modificables, por lo que pueden contribuir a la prevención del cáncer.⁽¹⁵⁾

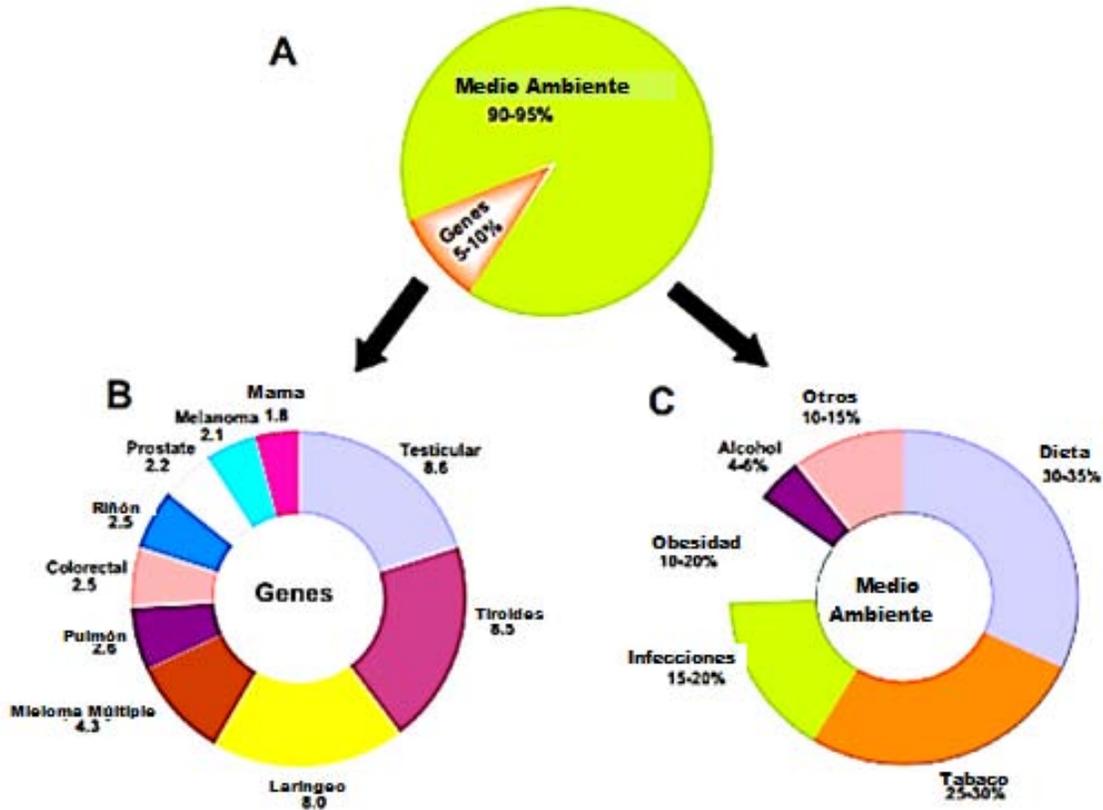


Figura 1. Papel de los genes y el medioambiente en el desarrollo del cáncer. A) Porcentaje de la contribución de los factores genéticos y medioambientales, que es 5-10% y 90-95% respectivamente. B) Relaciones entre el riesgo de cáncer y la prevalencia familiar. C) Porcentaje de la contribución de cada factor ambiental. ⁽¹⁵⁾

Según la Organización Mundial de la Salud:

- Los tipos de cáncer que más muertes causan cada año son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama.
- Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer.
- Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol.

- El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, y es la causa de más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón.
- Los cánceres causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por virus del papiloma humano (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios.
- Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo
- Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.
-

A nivel mundial, este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2012, fallecieron 8.2 millones de personas, y se estima que para 2030, aumentará a 13.1 millones. ⁽¹⁶⁾

2.2 TRATAMIENTOS ACTUALES

Los principales objetivos de un programa de diagnóstico y tratamiento del cáncer son curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes y garantizar una mejor calidad de vida a quienes sobreviven a la enfermedad.

La primera fase fundamental en el tratamiento del cáncer es establecer un diagnóstico basado en un examen patológico. Una vez establecidos, en medida de lo posible, el diagnóstico y el grado de extensión del tumor, hay que tomar una decisión sobre el tratamiento más eficaz. Para ello hay que seleccionar cuidadosamente una o varias modalidades de tratamiento - cirugía, radioterapia y tratamiento sistémico-, elección que debe basarse en pruebas científicas existentes, teniendo presentes los recursos disponibles. ⁽¹⁷⁾

Existen cuatro métodos estándar para el tratamiento del cáncer: cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida.

1. Cirugía: La cirugía puede ser usada para prevenir, tratar, y diagnosticar el grado de avance del cáncer. Como tratamiento, la cirugía se realiza para extirpar tumores o tanta parte del tejido canceroso como sea posible
2. Quimioterapia: La quimioterapia es un tipo de tratamiento que utiliza fármacos para eliminar a las células cancerígenas. A diferencia de la cirugía, la quimioterapia puede afectar a todo el cuerpo, ya que actúa en las células que se multiplican rápidamente. Desafortunadamente, además de las células cancerosas, otros tipos de células en el cuerpo también se multiplican a tasas elevadas, como las células del folículo piloso y las células que recubren el estómago. Es por eso que la quimioterapia puede causar efectos secundarios como la pérdida del cabello y malestar estomacal
3. Radioterapia: La radioterapia utiliza ciertos tipos de energía para reducir los tumores o eliminar las células cancerosas. Funciona dañando el DNA de la célula, hasta que es incapaz de multiplicarse. Las células son muy sensibles a la radiación y por lo general cuando las células cancerosas son tratadas, también las células sanas cercanas pueden dañarse.
4. Terapia Dirigida: Este tipo de terapia se centra en las características de los tumores cancerosos, bloqueando los procesos biológicos específicos que permiten que los tumores crezcan. ⁽¹⁸⁾

Existen diferentes tipos de cáncer, cada uno con un comportamiento particular y por ello se debe tomar un tratamiento específico (Fig. 2). El tratamiento puede ser curativo para muchos pacientes, mientras que en otros, puede ofrecer una cura parcial o la paliación de los síntomas. ⁽¹⁹⁾

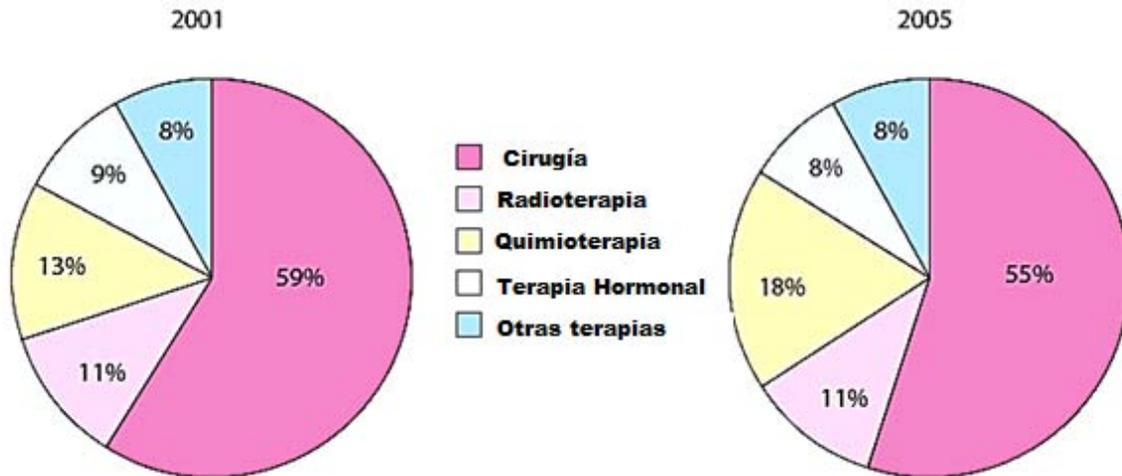


Figura 2. Frecuencia de uso de los diferentes tipos de tratamiento para pacientes con cáncer en el 2001 y en el 2005. ⁽¹⁹⁾

Durante las últimas dos décadas, el paradigma para el tratamiento del cáncer ha evolucionado desde agentes citotóxicos relativamente no específicos a la terapéutica basada en mecanismos selectivos. Recientemente, una mejor comprensión de la patogénesis del cáncer ha dado lugar a nuevas opciones de tratamiento, incluyendo agentes dirigidos e inmunoterapia. Estos tienen como objetivo inhibir las vías moleculares cruciales para el crecimiento y mantenimiento del tumor; mientras que la inmunoterapia busca estimular la respuesta inmune del huésped para promover la destrucción del tumor. ⁽²⁰⁾

2.2.1 Terapia dirigida

Hasta finales de los años noventa, la mayoría de los medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer funcionaban matando células cancerosas, pero desafortunadamente los agentes usados en las quimioterapias también causaban la muerte de algunas células normales produciendo serios efectos secundarios. ⁽²¹⁾

En todos los casos, la efectividad del tratamiento y el grado de cambio en la calidad y la esperanza de vida del paciente es directamente proporcional con la habilidad de la terapia de elegir como blanco y destruir a las células cancerosas afectando tan pocas células normales como sea posible. ⁽²¹⁾

Las terapias dirigidas se basan en fármacos, u otras sustancias, que bloquean el crecimiento y la propagación del cáncer al interferir con moléculas específicas ("blancos moleculares") que están implicados en el crecimiento, progresión y diseminación del tumor. Estas se diferencian de la quimioterapia estándar ya que las terapias dirigidas actúan sobre blancos moleculares específicos que se asocian con el cáncer, mientras que la mayoría de las quimioterapias estándar actúan en todas las células normales y cancerosas que se dividen rápidamente.

El desarrollo de terapias dirigidas requiere de la identificación de buenos blancos, es decir, blancos que juegan un papel clave en el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas. Muchas terapias dirigidas han sido aprobadas para su uso en el tratamiento del cáncer, e incluyen terapias hormonales, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la expresión de genes, inhibidores de la angiogénesis, inmunoterapias, e inductores de la apoptosis.

- a) Las terapias hormonales retrasan o detienen el crecimiento de tumores que requieren ciertas hormonas para crecer.
- b) Los inhibidores de la transducción de señales bloquean la actividad de las moléculas que participan en la transducción de señales, mecanismo por el cual una célula responde a las señales de su entorno. En algunos tipos de cáncer, las células malignas son estimuladas para dividirse continuamente por factores de crecimiento externos. Los inhibidores de la transducción de señales interfieren con esta señalización inapropiada.
- c) Los moduladores de la expresión de genes que confieren un fenotipo celular maligno.
- d) Los inhibidores de la angiogénesis bloquean el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en los tumores (proceso llamado angiogénesis tumoral). Los tratamientos que interfieren con la angiogénesis pueden detener el crecimiento del tumor.
- e) Las inmunoterapias activan el sistema inmune para destruir las células cancerosas, como por ejemplo, anticuerpos monoclonales que reconocen moléculas específicas en la superficie de las células cancerosas. La unión

del anticuerpo monoclonal a la molécula blanco resulta en la destrucción de las células que expresan esa molécula.

- f) Los inductores de la apoptosis hacen que las células cancerosas se sometan a este proceso de muerte celular. Los inductores de apoptosis pueden evitar las estrategias de las células tumorales para evadir la muerte celular. Algunos ejemplos de estas sustancias son el trastuzumab, gefitinib, imatinib, cetuximab y el paclitaxel (Taxol®).⁽²²⁾

En México el cáncer representa la tercer causa principal de defunciones, seguida de la diabetes y las enfermedades del corazón, con el 11.86%, 14.01% y 29.73% del total de decesos, respectivamente.⁽²³⁾

El control del cáncer puede beneficiarse del potencial que reside en las fuentes de origen natural. Las terapias convencionales (Fig. 3) causan efectos secundarios graves y, en algunos casos, simplemente prolongan la vida del paciente por algunos años. Por tal motivo, en los últimos años la investigación se ha centrado en los muchos productos naturales que han sido implicados en el tratamiento del cáncer.⁽²⁴⁾



Figura 3. Cuatro categorías de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer durante los pasados 50 años. Los productos naturales citotóxicos jugaron un rol principal en la quimioterapia convencional hasta finales de los años 90's, con el surgimiento de la terapia molecular dirigida.⁽²⁴⁾

2.3 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTES DE COMPUESTOS MEDICINALES

Como consecuencia de ser el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, los productos naturales poseen actividades biológicas muy altas, por lo que se han utilizado en la terapéutica o se han tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos. De esta forma, los productos naturales o sus derivados constituyen una buena parte del arsenal terapéutico disponible, además de resultar esenciales, en algunos casos, para identificar la diana de un fármaco sintético o establecer su implicación en una determinada ruta bioquímica.

Los microorganismos viven en ambientes naturales donde su crecimiento es afectado tanto por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.) como por las características físicas y químicas de su entorno. Como consecuencia de esas interacciones se producen metabolitos secundarios (compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo) con actividades biológicas variadas, que juegan un papel importante en su sobrevivencia. En contraste a los metabolitos secundarios producidos por las plantas, cuyo uso contra enfermedades tiene sus raíces en la medicina tradicional, los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo.⁽²⁵⁾

De los 1010 nuevos fármacos aprobados por la FDA desde enero de 1981 hasta junio de 2006, 43 eran productos naturales inalterados y 232 (un 23%) eran derivados de productos naturales. Dentro de éstos encontramos al docetaxel (Taxotere®), un análogo del paclitaxel (Taxol®) más potente y más soluble, y a los antibióticos claritromicina (Biaxin®) y azitromicina (Zitromax®), ambos derivados de la eritromicina.⁽²⁶⁾

Hoy en día, la búsqueda de principios activos naturales efectivos frente al cáncer es selectiva y orientada a las terapias dirigidas. El talón de Aquiles de esta búsqueda de fármacos ha sido siempre la baja disponibilidad de estos productos, debido a que usualmente se aíslan en cantidades muy pequeñas. Un importante problema en la utilización de productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos es la extinción de las plantas y organismos que los producen, con la consiguiente pérdida de biodiversidad. Es por eso que los microorganismos son la fuente más atractiva para la producción de metabolitos secundarios útiles para la producción de fármacos, ya que muchos microorganismos pueden ser cultivados a gran escala, facilitando un suministro ilimitado e ininterrumpido de la materia prima necesitada para el desarrollo de fármacos.

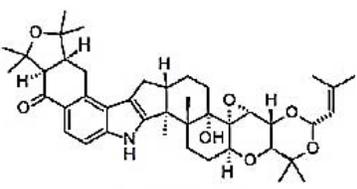
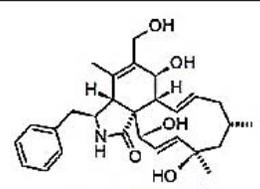
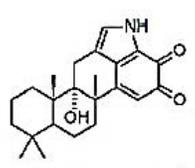
2.3.1 Hongos endofitos

Los hongos endofitos habitan en las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad. La estrecha relación que existe entre el endofito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedero, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos. Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endofitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedero contra el ataque de patógenos y herbívoros. Así, los endofitos constituyen una alternativa para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina.

La palabra “endofito” etimológicamente significa “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta). Actualmente, este término se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos, en donde los hongos son los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endofitos. Los hongos endofitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. El “endofitismo” se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria, definida por localización (no por función), y que se

establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera. Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. De todos los ecosistemas del Planeta Tierra, los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y éstas parecen albergar también una cantidad significativa de hongos endófitos. En la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado enormemente debido a que son productores de novedosos metabolitos secundarios con diversa actividad biológica (Tabla 1).^{(27) (28) (29)} Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sinnúmero de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos.^{(30) (31)}

Tabla 1. Ejemplos de metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de hongos endófitos.⁽³¹⁾

Hongo endófito / planta hospedera	Metabolito secundario / Núcleo base	Actividad biológica
<i>Neotyphodium lolii</i> (Clavicipitaceae). Endófito de <i>Lolium perenne</i> (Poaceae).	 Lolitrem B ⁵⁷ Alcaloide indolterpénico.	Neurotóxico. Inhibidor de los canales de calcio activados por potasio.
<i>Endothia gyrosa</i> IFB-E023 (Cryphonectriaceae). Endófito de <i>Vatica mangachapo</i> (Dipterocarpaceae).	 Citocalasina Z10 ⁵⁸ Alcaloide policétido isoindólico.	Citotóxico. En líneas celulares de leucemia K562.
<i>Mycioleptodiscus</i> sp. (Magnaporthaceae). Endófito de <i>Desmodium incomparabilis</i> (Rutaceae).	 Micoleptodiscina B ⁵⁹ Alcaloide indolterpénico.	Citotóxico. En líneas celulares de fibroblastos humanos IMR-90.

2.4 GRAPHOSTROMA SP

Cada planta individual, de las cerca de 270,000 especies de plantas que existen en la tierra, hospeda a uno o más endofitos. Se ha demostrado previamente que las comunidades endofíticas varían en muchos tipos de plantas y se ha encontrado que algunos hongos endofitos producen compuestos químicamente similares a aquellos producidos por el huésped. ⁽³²⁾

El árbol de la especie *T. globosa* o Tejo mexicano es representativa en México, y es considerada una especie rara ya que sólo se encuentra en un reducido número de locaciones en México y Centro América (desde el norte de México: Tamaulipas y Nuevo León; hasta Honduras en Centroamérica). Las especies que se encuentran en lugares remotos representan un gran potencial de fuentes de microorganismos nuevos, los cuales pueden tener la habilidad de producir metabolitos secundarios de interés médico e industrial. Actualmente existen muy pocos reportes de hongos endofitos asociados a *Taxus globosa*. ⁽³³⁾

Taxus spp. sintetiza un grupo de metabolitos secundarios conocidos como taxoides que se encuentran en el follaje y corteza de éste. El principal taxoide de interés farmacológico es el Taxol® (Fig. 4), un alcaloide diterpénico polioxigenado, utilizado en el tratamiento del cáncer de seno, ovario, pulmón y sarcoma de Kaposi relacionado con el VIH. ⁽³⁴⁾ El Taxol®, debido a su actividad biológica, se clasifica dentro del grupo de los fármacos antimetabólicos, ya que induce apoptosis. ⁽³⁵⁾

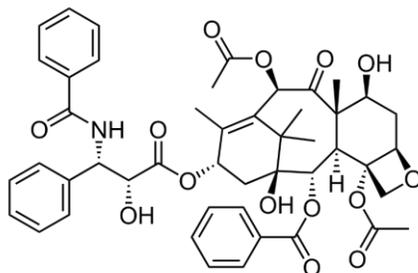


Figura 4. Estructura química del Taxol®. Es una estructura compleja en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6 y 8 y 6 carbonos polisustituídos con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas. La molécula posee un total de 11 estereocentros. ⁽³⁵⁾

La cantidad estimada necesaria del fármaco Taxol® purificado para tratar sólo a 500 pacientes con cáncer es de 1 Kg, equivalente al rendimiento de cerca de 10 toneladas de corteza o a la tala de 700 árboles. ⁽³⁶⁾ *Taxus globosa* es considerada una especie amenazada y, por consiguiente, es una especie protegida por las leyes ambientales mexicanas. Por lo tanto, durante los últimos 20 años se han explorado activamente las fuentes alternativas de paclitaxel, incluyendo la búsqueda de microorganismos productores de este. ⁽³⁷⁾

En un estudio realizado para aislar e identificar hongos endofitos de *T. globosa* se identificaron veinte grupos diferentes, entre los cuales se encuentran los Xylariales. ⁽³²⁾ El orden de los Xylariales consiste de siete familias: Amphisphaeriaceae, Apiosporaceae, Clypeosphaeriaceae, Diatrypaceae, Graphostomataceae, Hyponectriaceae & Xylariaceae. ⁽³⁸⁾

Graphostomataceae es una familia de hongos en el orden de los Xylariales. Es una familia monotípica, que contiene sólo un género: *Graphostroma*, que a su vez contiene la única especie *Graphostroma platystoma* (Fig. 5).

La cepa SG22 de *Graphostroma sp.* fue aislada de muestras de follaje, tallo y raíces de ejemplares sanos de *Taxus globosa*, recopiladas en tres localidades de la Reserva de la Biósfera en la Sierra Gorda, en el estado de Querétaro, México: 'Cañada de las Avispas' (LA), "San Gaspar" (SG) y "La Mina" (LM)". Para el aislamiento, las muestras fueron desinfectadas por uno de dos tratamientos diferentes, la inmersión en etanol al 70% o en 3% de hipoclorito de sodio (1 min cada uno), enjuagadas en agua destilada estéril y secadas bajo una campana de flujo laminar. La superficie desinfectada se retiró usando un bisturí estéril y se desechó. El tejido restante se cortó en tres fragmentos y fueron colocados en cajas de Petri con agar Czapek (CZA, Difco, EE.UU.) o PDA (Difco, EE.UU.) y se incubó a 25°C por 10 días. Posteriormente, los hongos se agruparon de acuerdo a sus características fenotípicas, es decir, morfología de las colonias, color de la colonia y tasa de crecimiento. Después se procedió a extraer el DNA genómico de cada cepa aislada y se le realizó PCR a cada una y un análisis filogenético para estimar la ubicación

taxonómica de los endofitos recuperados. Como resultado se obtuvieron 245 endofitos, entre los cuales se encontró a *Graphostroma* sp. ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾

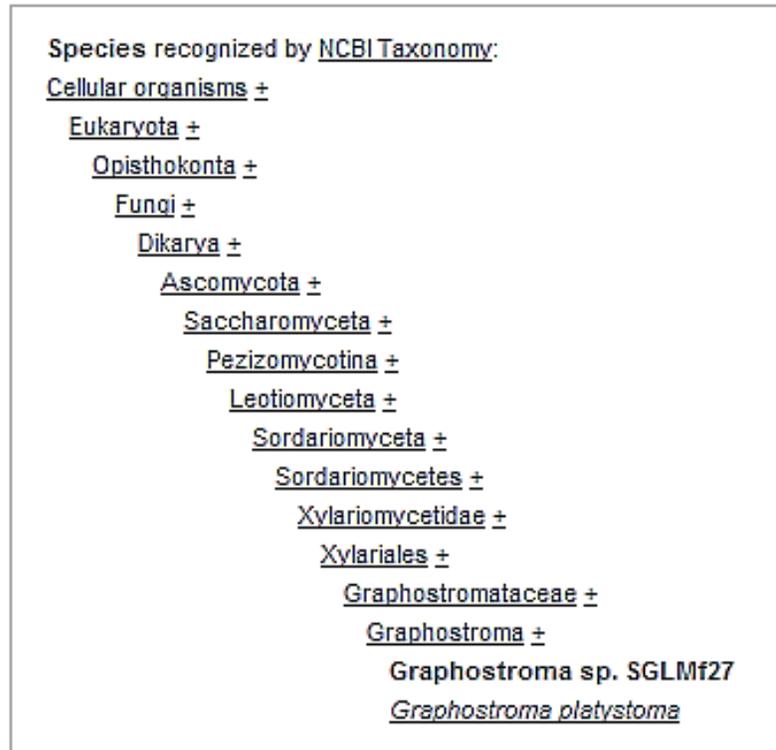


Figura 5. Clasificación taxonómica de *Graphostroma* sp. (NCBI: Taxonomy, 2014)

2.5 CULTIVO Y FERMENTACIÓN DE HONGOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO MICROBIANO.

Para el descubrimiento de metabolitos secundarios de microorganismos endofitos se ha aplicado en repetidas ocasiones la estrategia metodológica que se indica a continuación: en primer lugar, se realiza la selección de las plantas hospedadas, de acuerdo con los criterios mencionados y se lleva a cabo el aislamiento y caracterización, mediante técnicas moleculares, de los hongos endofitos. ⁽⁴⁰⁾ A continuación se realiza la preselección de los microorganismos, mediante un

criterio ecológico, principalmente con base en las interacciones planta-microorganismo y microorganismo-microorganismo. En múltiples ocasiones, la observación de este tipo de interacciones ha constituido un punto de partida para la preselección de especies fúngicas como una fuente valiosa de principios bioactivos. ⁽⁴¹⁾

En segundo lugar, es necesario realizar cultivos en pequeña escala con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos fúngicos objeto de estudio. Posteriormente, se preparan los extractos del medio de cultivo y del micelio. A continuación, se realizan pruebas biológicas preliminares las cuales consisten en la determinación del efecto biológico de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio, mediante la utilización de bioensayos sencillos y de fácil implementación. ⁽⁴²⁾ Para encontrar metabolitos secundarios con aplicación terapéutica, existen ensayos sobre diferentes líneas celulares tumorales, para comprobar la acción anticancerígena. ⁽⁴³⁾ Estas evaluaciones preliminares permiten detectar extractos naturales apropiados para la obtención de agentes terapéuticos. En general, los extractos que demuestran respuestas positivas en los ensayos preliminares, se consideran candidatos adecuados para la realización de otras pruebas biológicas, así como para su purificación.

Una vez seleccionados los extractos activos se aíslan los principios bioactivos mediante estudios químicos biodirigidos. Este proceso permite la obtención de los metabolitos secundarios con actividad biológica. Los compuestos naturales activos se purifican y se identifican y, por último, éstos son sometidos a ensayos biológicos adicionales con la finalidad de explorar de manera más detallada su posible aplicación como fármacos. ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾

2.5.1 Cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc). El pH ha de ser ligeramente ácido para facilitar el

crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Los hongos crecen bien en medios artificiales y tienen requerimientos nutritivos simples: una fuente de carbono orgánico, generalmente azúcar, y de nitrógeno. Junto a ellos, un soporte sólido, el agar, permite a los hongos filamentosos el desarrollo del micelio aéreo, donde se localizan las estructuras reproductoras y el desarrollo de colonias en el caso de las levaduras. La adición al medio de antibióticos (como el cloranfenicol o la gentamicina) que inhiben el crecimiento de las bacterias contaminantes o antifúngicos especiales (como la actidiona o cicloheximida) que inhiben el crecimiento de muchos hongos no patógenos, transforman al medio en uno más selectivo. Los medios de cultivo después de sembrados, se incuban en aerobiosis y la temperatura óptima suele ser 25-30°C. ⁽⁴⁶⁾

2.5.2 Fermentación

Un proceso de fermentación se lleva a cabo en un fermentador, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. La biomasa va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos: crecimiento y formación de producto pueden tener lugar simultáneamente durante el desarrollo del proceso. Para que éste proceso se lleve a cabo existen determinados requerimientos fisiológicos de crecimiento microbiano, como son: un medio acuoso, temperatura de crecimiento adecuada, correctos niveles de acidez, y presión parcial de oxígeno. La fermentación aerobia es hasta hoy la más utilizada ya que el crecimiento es mucho más rápido en aerobiosis que en anaerobiosis. Por otra parte es necesario mencionar dos limitantes que se presentan en las fermentaciones aerobias:

- Muy baja solubilidad del oxígeno en el agua, lo que hace necesario airear y agitar fuertemente el medio de cultivo.
- Producción elevada de calor que debe ser constantemente removida a fin de mantener estable la temperatura. ⁽⁴⁷⁾

2.5.3 Etapas para la obtención de un producto microbiano.

La secuencia de etapas involucradas en la obtención de un producto o de células enteras, por fermentación, son las siguientes:

- Preparación del medio de cultivo (pre-tratamiento de la materia prima y adición de nutrientes).
- Esterilización del medio de cultivo. Para evitar la contaminación del medio por microorganismos indeseables, es necesario esterilizarlo y mantener condiciones asépticas durante la fermentación (aireación estéril, adición de nutrientes estériles, etc.). Esto se debe a que la mayoría de los productos biológicos obtenidos hasta hoy son producidos en cultivo puro, es decir, por un solo microorganismo. La contaminación de este cultivo por otros microorganismos puede resultar en la inhibición o en la destrucción del producto.
- Síntesis del producto. En función del producto se determina la modalidad de funcionamiento del fermentador. ⁽⁴⁷⁾

En éste trabajo, se utilizó un fermentador discontinuo. En los procesos discontinuos o tipo batch, el aporte de nutrientes es único, el tiempo de fermentación es limitado y el producto es recuperado íntegramente al final de la fermentación por vaciado del fermentador. Este método es actualmente el más utilizado para los productos que necesitan condiciones de esterilidad muy estrictas (Fig. 6).

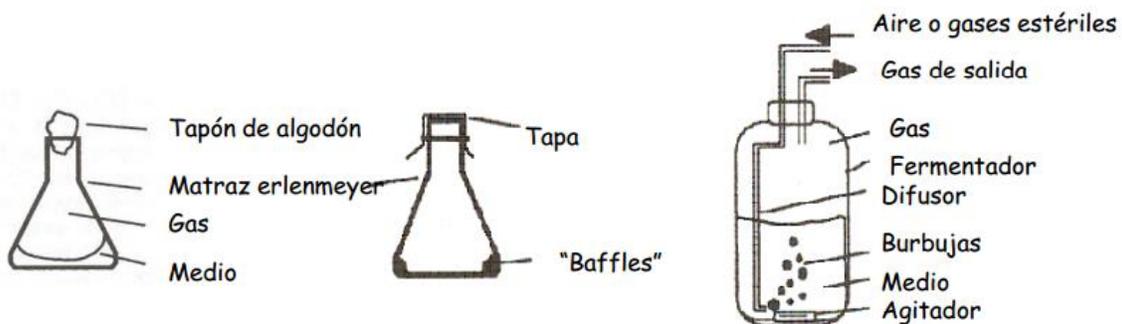


Figura 6. Esquema de las partes del sistema para el cultivo en matraz y cultivo en fermentador.

La máxima velocidad de crecimiento de un microorganismo es el resultado de las características inherentes de éste, así como de la disponibilidad de nutrientes. En las mejores condiciones, el crecimiento es exponencial. Una disminución en la velocidad de crecimiento puede lograrse limitando la disponibilidad de cualquier nutriente esencial. En esta situación el crecimiento se encuentra desequilibrado y los nutrientes divergen hacia otras rutas metabólicas que no son aparentemente indispensables para el crecimiento.

Según el tipo de metabolito requerido, la estrategia de fermentación a seguir deberá en primer lugar tomar en cuenta en qué momento del crecimiento éste produce. Así, por ejemplo, en el caso de un metabolito secundario, muchas veces convendrá utilizar un sistema doble de fermentación. En el primer recipiente, que pueden ser matraces, se hará crecer el microorganismo en condiciones óptimas a fin de obtener el máximo de biomasa microbiana. Luego, esta biomasa se trasladará al segundo recipiente (fermentador) donde se comenzará la síntesis del metabolito. Este sistema permite también el óptimo aprovechamiento de la materia prima utilizada, la cual sería de otra manera en gran parte desperdiciada.

- d) Separación del medio. El producto puede encontrarse dentro de la célula (producto intracelular), como en el caso de la vitamina B12 o la enzima glucosa isomerasa; o bien puede ser liberado al medio de cultivo (extracelular), como es el caso de la penicilina, amilasa, aminoácidos, entre otros.
- e) Purificación del producto. Si el producto es extracelular, es decir, es excretado al medio por el microorganismo, se encontrará diluido en un gran volumen de agua. Si es intracelular (no excretado al medio) estará mezclado con todos los constituyentes celulares y habrá que separarlo de ellos. ⁽⁴⁷⁾

En cada caso, hay que adaptar las diversas alternativas de purificación y extracción.

El estudio preliminar realizado por Pacheco D., demostró que los compuestos bioactivos producidos por la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* se encuentran en el

sobrenadante resultante de la fermentación. Para separarlos se utilizaron diversos métodos, tales como extracción líquido – líquido y/o técnicas cromatográficas.

2.6 ANTIPROLIFERACIÓN

Los productos naturales frecuentemente poseen actividades biológicas altamente selectivas y específicas, las cuales pueden actuar en muchos de los procesos moleculares operativos en la progresión del ciclo celular (Fig. 7), el cual se compone de cuatro fases principales: 1) En la fase G1 la célula se prepara para la replicación del DNA; 2) la síntesis y replicación del DNA se da en la etapa conocida como fase S; 3) en la fase G2 la célula se prepara para el proceso de división; y 4) en la fase M (Mitosis) la célula se divide en dos células hijas idénticas. Sin embargo, se pueden presentar otros estados celulares. Cuando se les priva de los nutrientes y factores de crecimiento, las células pueden entrar en un estado de reposo conocida como G0, donde el metabolismo celular se vuelve más lento. (48)

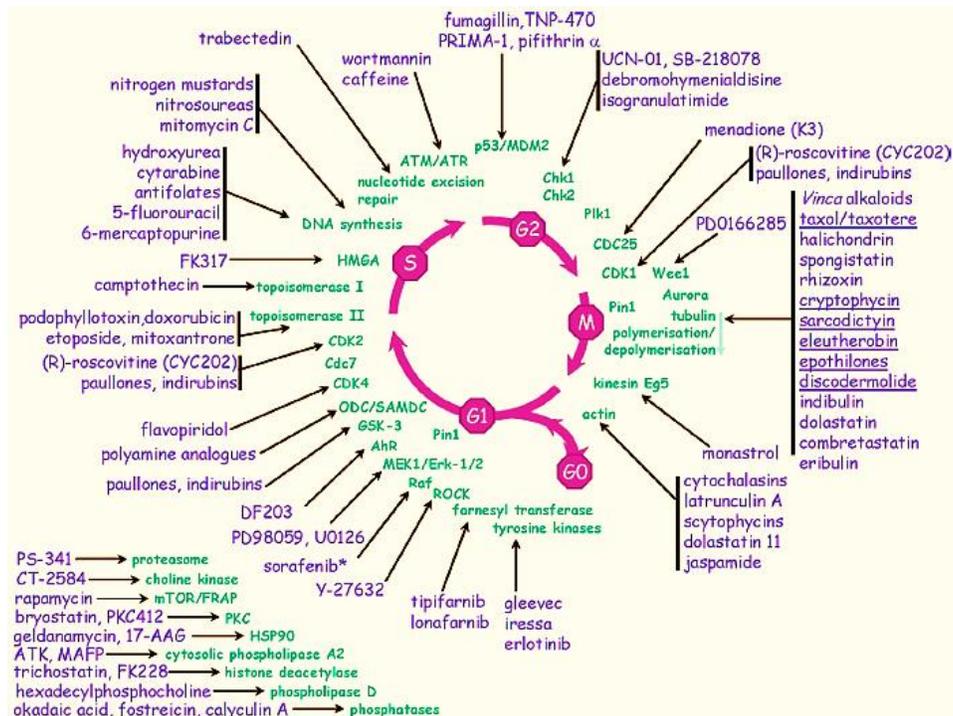


Figura 7. Intervención de algunos compuestos naturales en las distintas etapas del ciclo celular. En morado se identifican las sustancias bioactivas que actúan sobre distintas moléculas del ciclo celular, marcadas en verde. Las fases del ciclo celular se ilustran en color rosa. (48)

Los ensayos celulares usados en la investigación sobre el cáncer y los fármacos que afectan el ciclo celular emplean principalmente líneas celulares tumorales, ya que su naturaleza “inmortal” y su comportamiento de crecimiento las hacen sistemas de prueba convenientes. Sin embargo, es de vital importancia la elección del método adecuado, el cual depende del número de células usadas y de la sensibilidad deseada. El primer método utilizado para los ensayos de inhibición del crecimiento fue desarrollado por Mosmann y el equipo del National Cancer Institute, y fue denominado ensayo de MTT, el cuál es una técnica colorimétrica que emplea el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, que es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazán púrpura. Éste ensayo ha sido utilizado ampliamente para la cuantificación de linfocinas, citotoxicidad, proliferación y activación celular. ⁽⁴⁹⁾

2.7 ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE *GRAPHOSTROMA SP.*

En el trabajo titulado: “Actividad anti-proliferativa en células HeLa, de extractos de los hongos *Fusarium sp*, *Graphostroma sp.*, *Hypoxyton falciforme* y *Biscognauxia mediterranea* aislados de *Taxus globosa*”, realizado por Daniela Itzel Pacheco Cerón, se seleccionó al hongo *Graphostroma sp* para su cultivo masivo y purificación por su buena actividad antiproliferativa y por tener grandes probabilidades de encontrar nuevos compuestos. En ese trabajo se describen las siguientes condiciones:

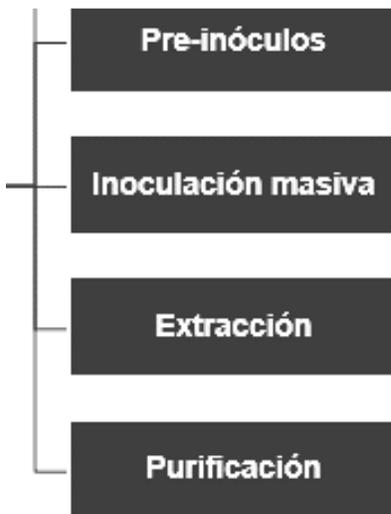
REACTIVACIÓN y SIEMBRA: De la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* conservada en placa:

Con ayuda de un extremo de una pipeta Pasteur se cortaron círculos de 6 mm de diámetro de las placas y fueron colocados en cajas con agar PDA con la punta de una pipeta Pasteur estéril. Las placas se cultivaron a 22 °C en condiciones estáticas hasta obtener crecimiento en $\frac{3}{4}$ partes de la caja.



CONSERVACIÓN: De las placas de reactivación:

A partir de las placas de la reactivación, se cortaron círculos con el extremo de una pipeta Pasteur y se colocaron dentro de crioviales con 1mL de agua destilada estéril (5 círculos por criovial), los cuales se conservaron en refrigeración (3-5 °C).



PRE-INÓCULOS 1 Y 2: se realizaron en matraces de 125 mL y 250 mL con 20 y 40 mL con medio Czapeck-Dox Broth estéril respectivamente, fueron inoculados con micelio obtenido del cultivo en placa, y cultivados a 22 °C y 120 rpm, durante 3 días.

INOCULACIÓN MASIVA: La biomasa del hongo obtenida de los preinóculos 1 y 2 fue transferida a un garrafón Pyrex® de 5 galones con 15 L de medio Czapeck-Dox Broth, y se cultivó a 22 °C en condiciones estáticas con una aireación de 0.3-0.66 vvm durante 7 días.

PURIFICACIÓN: La purificación se llevó a cabo mediante dos técnicas: 1) Cromatografía en capa fina: placas de sílice y una mezcla de solventes; 2) Cromatografía en columna: Columna cargada con sílice. La mezcla de solventes usada fue: Cloroformo/metanol/hexano (proporción 9:1:0.5, 10:1:1 y 9:1:1), y al final, acetona y metanol.

EXTRACCIÓN: Se realizaron dos métodos de extracción diferentes: 1) Mediante una columna de extracción L-L con capacidad de cuatro litros. Fase ligera: acetato de etilo; Fase pesada: medio de cultivo filtrado con tela. 2) Mediante extracción por mezclado con acetato de etilo a razón de 2:1 de sobrenadante y/o micelio: solvente, en licuadora OSTER®. La mezcla se dejó reposar por aproximadamente 24 horas para que las fases se

Figura 8. Representación esquemática de las condiciones realizadas por Pacheco, D.

3. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que los hongos endofitos producen una gran variedad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, como agentes antifúngicos, bactericidas, nematocidas y fitotóxicos, entre otras.

Debido a que el extracto obtenido del sobrenadante de *Graphostroma sp.* presentó actividad antiproliferativa en estudios preliminares, al menos una de las fracciones obtenidas de dicho extracto presentará actividad antiproliferativa.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Identificar a la fracción con mayor actividad antiproliferativa del extracto obtenido del sobrenadante del cultivo de la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* aislada de *Taxus globosa*, con la finalidad de evidenciar la presencia de metabolitos secundarios con actividad antiproliferativa.

4.2 ESPECÍFICOS

- I. Obtención del extracto del sobrenadante y del micelio.
- II. Purificación del extracto del sobrenadante en sus fracciones primarias.
- III. Evaluación de la actividad antiproliferativa y cuantificación de la IC₅₀.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL MICROBIOLÓGICO

Se utilizó la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* aislada de *Taxus globosa*, cultivada en el laboratorio y conservada en refrigeración a 5°C.

5.2 REACTIVACIÓN Y SIEMBRA

A partir de un cultivo de conservación en placa de Agar Papa Dextrosa (PDA) (BD Difco, Sparks MD, USA), que contenía al hongo puro, se realizó la reactivación de la siguiente manera:

Con el extremo de mayor diámetro de una pipeta Pasteur, se cortaron círculos de 6 mm de diámetro del hongo conservado en placa, con la punta se tomaron cada uno de ellos y se colocaron en el centro de placas de medio de cultivo PDA, de manera que la zona con crecimiento quedara en contacto con el medio. Se sembraron 26 placas de la cepa y se cultivaron a 22 °C en condiciones estáticas y aerobias hasta obtener crecimiento en $\frac{3}{4}$ partes del diámetro de las cajas. Esto se realizó con la finalidad de “reactivar” al hongo (ya que se encontraba en un estado de conservación) para tener un mayor crecimiento y producirlo en la cantidad necesaria.

5.3 CONSERVACIÓN

Se prepararon crioviales con 1 mL de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121°C durante 15 minutos.

De dos de las 26 placas de la reactivación, se tomaron círculos con la técnica mencionada y se colocaron 5 círculos dentro de cada criovial, y se conservaron en refrigeración a una temperatura de 3-5 °C.

5.4 PREPARACIÓN DE MEDIO CZAPECK-DOX BROTH PARA LA INOCULACIÓN DEL HONGO

El medio Czapeck-Dox Broth es un medio semisintético usado para el cultivo general de hongos.

Tabla 2. Composición del medio Czapeck-Dox Broth

Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dibásico de potasio	1
Sulfato de magnesio	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato Ferroso	0.01

Se pesaron 110.4 g de sacarosa (J.T. Baker), 11.04 g de nitrato de Sodio (J.T. Baker), 1.84 g de sulfato de magnesio (J.T. Baker), 1.84 g de cloruro de potasio (Macron) y se agregaron a 3680 mL de agua destilada, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera:

- 24 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 15 mL de medio cada uno.
- Un matraz Erlenmeyer de 250mL con 120mL de medio.
- 80 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 35 mL de medio cada uno.
- Un matraz Erlenmeyer de 1000 mL con 400 mL de medio.

Se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min.

*Tanto el fosfato dibásico de potasio como el sulfato ferroso se deben añadir al final, en forma de disoluciones debido a que podrían precipitarse. Dichas disoluciones se prepararon pesando 3.68 g de fosfato dibásico de potasio (J.T. Baker) y 0.03680g de sulfato ferroso (Macron), disolviendo cada compuesto en 100mL de agua destilada y esterilizando en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15

min. Uno y dos mL de cada disolución estéril se agregaron a cada matraz de 125 mL y 250 mL, respectivamente.

5.5 PRE-INÓCULO 1

A partir de 24 cajas de reactivación, se tomó el micelio raspando con un bisturí estéril y se colocó en una licuadora que contenía 120 mL de medio Czapeck-Dox Broth y se licuó durante 20 segundos con la finalidad de homogeneizar.

Se agregó 1 mL de fosfato dibásico de potasio y 1 mL de sulfato ferroso a cada matraz y se inocularon 5 mL del homogeneizado a cada uno de los 24 matraces Erlenmeyer de 125 mL previamente preparados con 15 mL de medio Czapeck-Dox Broth y se cultivaron a 22 °C y 120 rpm, durante 3 días.

5.6 PRE-INÓCULO 2

Se prepararon 80 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 35 mL de medio Czapeck-Dox Broth cada uno. Se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min.

El contenido de los 24 matraces Erlenmeyer de 125 mL, (pre-inoculo 1), se vació en un vaso de licuadora estéril con 400 mL de medio Czapeck-Dox Broth y se licuó durante 10 segundos, dando un volumen final de 600 mL.

A cada matraz de 250mL, conteniendo 35 mL de medio Czapeck-Dox Broth, se le añadieron 2 mL de fosfato dibásico de potasio y 2 mL de sulfato ferroso y se agregaron 7 mL de inóculo, cultivando a 22 °C y 120 rpm durante 3 días.

5.7 INOCULACIÓN DEL CULTIVO MASIVO

El cultivo masivo se realizó en un garrafón Pyrex® de 20 L. El medio de cultivo se preparó con la cantidad de componentes (sin incluir el fosfato dibásico de potasio y el sulfato ferroso) para 15 L de medio Czapeck-Dox Broth y se aforó a 11 L en el

5. Desarrollo experimental

garrafón Pyrex®; se le colocaron dos entradas, una de inoculación/venteo y otra de aireación, la cual tenía un filtro de 0.22 μm (HEPA-VENT™ L#9141 Whatman Inlet), y se esterilizó en autoclave a 15 psi y 121°C durante 25 min. Aparte se prepararon y esterilizaron las disoluciones de 750mL de fosfato dibásico de potasio y de sulfato ferroso para agregarlas posteriormente.

Teniendo el garrafón estéril, se procedió a realizar la inoculación. Primero se agregaron las sales, por medio del sistema de venteo, con ayuda de una bomba peristáltica (Masterflex®). Después se adicionó el contenido de 40 matraces Erlenmeyer de 250 mL (pre-inóculo 2; 1.6 L) por el sistema de venteo para inocular un garrafón. Posteriormente, se añadió 0.9 L de agua destilada estéril para dar un total de 15 litros de volumen de operación. El garrafón se cultivó a 22 °C en condiciones estáticas con una aireación de 5 vvm durante 7 días (Fig. 9).



Figura 9. Inoculación y cultivo de garrafones.

5.8 EXTRACCIÓN

Este método fue usado tanto para obtener los extractos del micelio (metabolitos intracelulares), como del sobrenadante (metabolitos extracelulares).

5.8.1 Sobrenadante. La extracción se realizó mediante particiones sucesivas líquido - líquido con acetato de etilo (J.T. Baker SOLUSORB®). El procedimiento consistió en filtrar con gasa los 15 L de cultivo masivo y separar el sobrenadante del micelio. Posteriormente, el sobrenadante se agregó a un extractor para después hacer las extracciones, siendo un total de 3, utilizando un volumen de acetato de etilo de 3 L, 2.5L, 2 L respectivamente; obteniéndose así una fase acuosa y una orgánica.

A la fase orgánica se le eliminó el remanente de agua con 500g de sulfato de sodio, y para eliminar el solvente se utilizó un evaporador rotatorio (Rotavapor® BUCHI R-210/R-215 a 260 mBar con un baño a 37°C). El extracto obtenido se transvasó a un vial ambar previamente pesado, se secó con nitrógeno gaseoso y se conservó en refrigeración.

5.8.2 Micelio. La extracción del micelio se realizó por un licuado con solvente. Se añadió un total de 1.5 L de acetato de etilo al micelio que se obtuvo de cada lote. Esa mezcla se molió en la licuadora OSTER® durante 3 minutos y se filtró para separar el micelio extraído (debris celular) del filtrado con la fase orgánica conteniendo el acetato de etilo con el agua extraída del micelio. A la a fase orgánica se le eliminó el remanente de agua con la cantidad necesaria de sulfato de sodio, y para eliminar el solvente se utilizó un evaporador rotatorio (Rotavapor® BUCHI R-210/R-215 a 260 mBar con un baño a 37°C). El extracto seco obtenido se transvasó a un vial ámbar previamente pesado, se secó con nitrógeno gaseoso y se conservó en refrigeración

Se prepararon alícuotas con diferentes concentraciones de los extractos crudos, tanto del sobrenadate como del micelio, para realizar ensayos de antiproliferación en células HeLa (Anexo B).

5.9 ENSAYO DE ANTIPROLIFERACIÓN EN CÉLULAS HELA

Las células HeLa, derivadas del carcinoma epitelial de cérvix humano, fueron proporcionadas por el Departamento de Genética del CINVESTAV, las cuales fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, Gibco), 1000 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, incubadas 24 horas a 37°C, 5% CO₂.

Los efectos en la proliferación celular fueron evaluados por medio del ensayo de MTT (methyl thiazol tetrazolium). Para ello se utilizaron placas de cultivo celular (Costar) con 24 pozos cada una, cada pozo contenía 2.5×10^3 células en 500 µL de DMEM.

- En condiciones de esterilidad:

Se adicionaron 500 µL de DMEM estéril a cada uno de los pozos de las placas.

Las alícuotas previamente preparadas (ver anexo B) de cada concentración del extracto se disolvieron con 15 µL de di-metil-sulfóxido (DMSO) y 35 µL de medio DMEM. De esa mezcla se agregaron 10 µL a cada pozo destinado a dicha concentración.

El control de DMSO se colocó en tres pozos de la placa utilizando concentraciones no mayores a 0.3 % v/v, ya que se ha probado que en esa concentración el DMSO tiene un efecto mínimo sobre el crecimiento celular.

Se incubaron las placas durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Transcurridas las 48 horas, el medio DMEM fue retirado de la placa con ayuda de una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío, con la finalidad de dejar las células vivas en el fondo de la placa y retirar a las células muertas.

Se preparó la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma) con una concentración de 0.5mg MTT/mL DMEM y la solución de Isopropanol ácido (3.3 µL de HCL concentrado/mL de isopropanol) en tubos Falcon. Estas soluciones fueron preparadas el mismo día del ensayo.

Se colocó, en cada pozo, 500 μ L de solución de MTT diluido en medio DMEM (5 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂. Concluido el tiempo se retiró la solución de MTT con ayuda de una pipeta pasteur acoplada a una bomba de vacío y se colocaron 500 μ L de solución de isopropanol ácido en cada pozo, agitando de manera orbital.

El contenido de cada pozo se transfirió a tubos Eppendorff de 1.5 mL y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm.

Se colocaron 100 μ L del sobrenadante de cada tubo en un pozo de una placa de 96 pozos, se midió la absorbancia (A) a 595 nm en lector de placas BIO-RAD Model 680.

5.10 PURIFICACIÓN

La purificación se llevó a cabo por medio de dos tipos de cromatografías: cromatografía en capa fina y cromatografía en columna, los cuales son métodos de fraccionamiento y separación de los componentes de las mezclas, basado en la migración diferencial de los componentes transportados en una fase móvil que migra a través de una fase estacionaria.

5.10.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF). La cromatografía en capa fina se realizó para verificar la similitud de los extractos, tanto del sobrenadante como del micelio, para los 4 lotes; así como para las fracciones obtenidas después.

- ✓ Muestra: Se tomó una muestra de cada extracto y se disolvió cada una en 1 mL de acetona.
- ✓ Fase estacionaria: Se cortaron placas de sílice de aproximadamente 2 cm de largo y 5 cm de alto, marcando en los extremos una línea a 0.5 cm del borde.
- ✓ Fase móvil: Se preparó una mezcla de solventes de Acetato de etilo–Hexano en una proporción 5:5.

Con un capilar se tomó muestra del extracto y se colocó en la línea inferior de la placa de sílice, para evitar que la muestra estuviera diluida este paso se realizó 3 veces. Una vez que la muestra estuvo seca, la placa se colocó en una cámara saturada con el eluyente a probar y se corrió hasta que el eluyente llegó a la marca superior de la placa de sílice. Posteriormente se dejó secar y se reveló en una cámara con vapores de yodo por 5 segundos, después, las placas se observaron bajo luz UV de onda corta.

5.10.2 Cromatografía flash, Isolera™ ONE. Para establecer el modelo de elución que se utilizaría en la cromatografía en columna, se contó con el equipo de cromatografía flash “Isolera™ ONE”, el cual, por medio de dos gradientes de distintos solventes (hexano – acetato de etilo, y acetato de etilo - metanol), separó en fracciones una muestra del extracto crudo del sobrenadante, según su absorción en el espectro UV. Este sistema ofrece características de software que crean automáticamente gradientes específicos, recomiendan tamaños de cartuchos adecuados e indican la ubicación de las fracciones del compuesto de interés (Fig. 10).



Figura 10. Sistema Isolera™ ONE para cromatografía flash. El sistema cuenta con una bomba que suministra los solventes de acuerdo a la proporción indicada, cartuchos con sílice en los que se coloca la muestra, y un software que arroja los resultados en un cromatograma.

- ✓ Se eligieron los siguientes parámetros para llevar a cabo la corrida:

Tabla 3. Parámetros seleccionados para llevar a cabo la corrida de cromatografía flash en Isolera ONE.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
<i>Cartucho</i>	SNAP 25 g
<i>Caudal</i>	75 mL/min
<i>Solvente A</i>	n-hexano
<i>Solvente B</i>	Acetato de etilo
<i>Solvente C</i>	Metanol
<i>Tipo de bastidor</i>	16x100 mm
<i>Volumen máximo de la fracción</i>	10 mL
<i>Modo de detección</i>	Λ-all
<i>Corrección de base</i>	Encendido
<i>UV1 (Seguimiento)</i>	254 nm
<i>UV2 (Seguimiento)</i>	280 nm
<i>Umbral de inicio</i>	100 mAU
<i>Volumen de la columna</i>	33 mL
<i>Tamaño de muestra</i>	29 mg

- ✓ Una vez terminada la corrida, se recolectaron las fracciones purificadas por el aparato de cromatografía flash y se realizó CCF para cada una de ellas.

5.10.3 Cromatografía en columna (CC). Se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna abierta en una columna de vidrio de 1.884 cm de diámetro por 45 cm de altura, empacada con 16.1044 g de sílice MN Kieselgel 60 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, tamaño de partícula: 25-40 / >40 μm, malla

200/300 ATSM; con la finalidad de fraccionar el extracto crudo del sobrenadante del cultivo.

- ✓ Muestra: Los extractos secos se disolvieron en acetona y se mezclaron con 4 g de sílice, se adicionó acetona hasta que la mezcla estuviera suspendida en el solvente. Después, se procedió a evaporar el solvente en el rotavapor, de tal manera que la muestra quedara impregnada en la sílice.
- ✓ Fase estacionaria: Se utilizó gel de sílice el cual se empacó con hexano hasta ocupar tres cuartas partes de la columna. El gel de sílice requerido para la masa total del extracto se calculó con una relación de 20 g de gel de sílice por cada gramo de extracto (Anexo C).
- ✓ Fase móvil: La columna fue eluída con diferentes proporciones de la mezcla de solventes hexano-acetato de etilo, con la finalidad de crear un gradiente (Fig. 11) que abarcaba desde un 0% de acetato de etilo inicial a un 100%, basando dicho gradiente en el perfil cromatográfico obtenido por el equipo de cromatografía flash Isolera™ ONE. Al terminar el gradiente, se procedió a agregar el volumen de metanol necesario para separar las fracciones más polares que permanecían en la columna.

A la columna ya cargada se le adicionó el gel de sílice con la muestra de manera que la superficie quedó uniforme. Una vez cargada la columna con la muestra, se empezaron a adicionar los solventes, según el gradiente de mezcla de solventes previamente elegido.

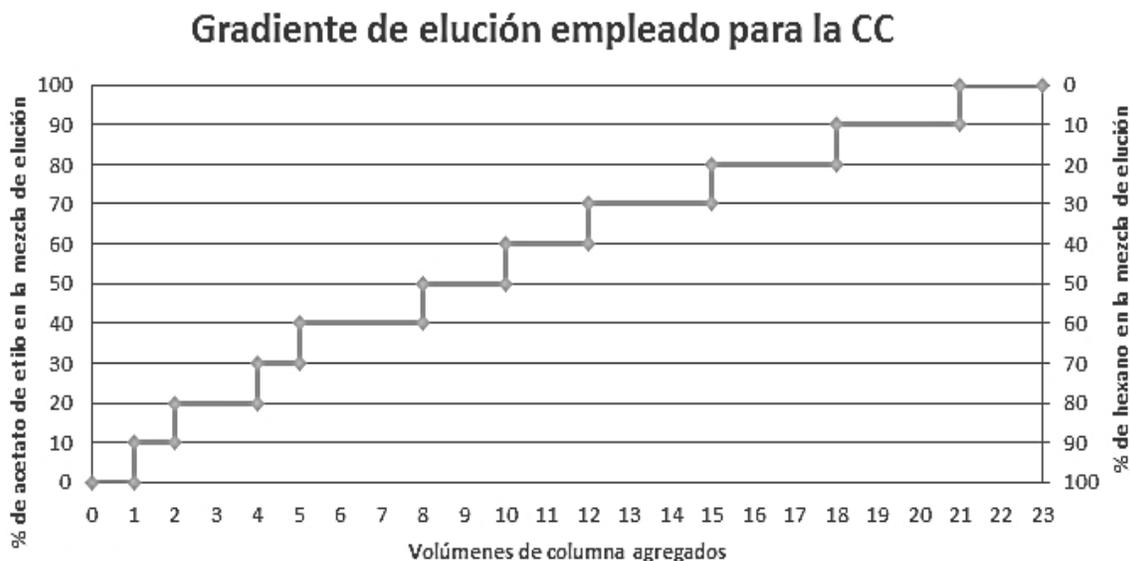


Figura 11. Gradiente de mezcla de solventes. Se observa como se parte de un 100% de hexano y se va cambiando gradualmente hasta llegar a una proporción del 100% de acetato de etilo. Cada volumen de columna corresponde a 75 mL de solvente o mezcla de solventes.

Se fueron obteniendo las fracciones de acuerdo a la elución de la muestra y a las polaridades empleadas.

Finalmente se agregaron 3 volúmenes de columna de la mezcla acetato de etilo-metanol a una razón de 50:50, seguido de 1 volumen de columna de metanol 100%.

De las fracciones obtenidas se hizo CCF de cada una, y de acuerdo a la similitud de los cromatogramas se juntaron las fracciones y se secaron en el rotavapor. Finalmente, se realizó el ensayo de antiproliferación a las fracciones obtenidas con la metodología previamente descrita.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con el propósito de estudiar el potencial antiproliferativo de los extractos del sobrenadante y del micelio obtenidos de la cepa SG22 del hongo endofito *Graphostroma sp.* aislado de *T. globosa*, así como de las fracciones primarias. Con este trabajo se pretende poner en evidencia que al ser un hongo que no cuenta con estudios previos, podría significar una fuente potencial de nuevos compuestos con actividad biológica.

Los resultados obtenidos se dividen en cinco partes. La primera comprende la caracterización macroscópica y microscópica, así como a la velocidad de crecimiento radial del hongo. La segunda corresponde a la obtención de los extractos del sobrenadante y del micelio, la evaluación de su actividad antiproliferativa y la determinación de su IC₅₀. La tercera pertenece al fraccionamiento primario del extracto orgánico del sobrenadante. La cuarta etapa abarca la evaluación cuantitativa de la actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas, incluyendo la determinación de la IC₅₀ de cada una. Finalmente, la quinta parte pertenece a la comparación de los resultados obtenidos con los reportados en el estudio preliminar realizado por Pacheco, D.

6.1 CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS

El proyecto se inició con la reactivación y conservación de la cepa SG22 de *Graphostroma sp.*, la cual fue aislada de *T. globosa* y había sido conservada en el laboratorio. Cabe destacar, que para dicho hongo no existen reportes en la literatura.

Las características macroscópicas se determinaron por observación de los cultivos en PDA, estableciéndose: color, textura, superficie, consistencia y tipo de

crecimiento del micelio. Las características microscópicas se establecieron a partir de la observación de los micelios frescos, por medio de un microscopio óptico, registrándose el tipo de micelio (septado o cenocítico, hialino o dematiáceo). A continuación se describen las características más importantes.

En la figura 12 se muestra A) un cultivo de 9 días en agar PDA de la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* Se observa la formación de micelio aéreo aterciopelado y de consistencia algodonosa; presenta elevación umbonada, que inicialmente es blanco y con el tiempo se torna color verde. Su crecimiento es radial con bordes ondulados. La figura 12 B) muestra las estructuras del hongo en una preparación en fresco. Se aprecian hifas septadas hialinas.

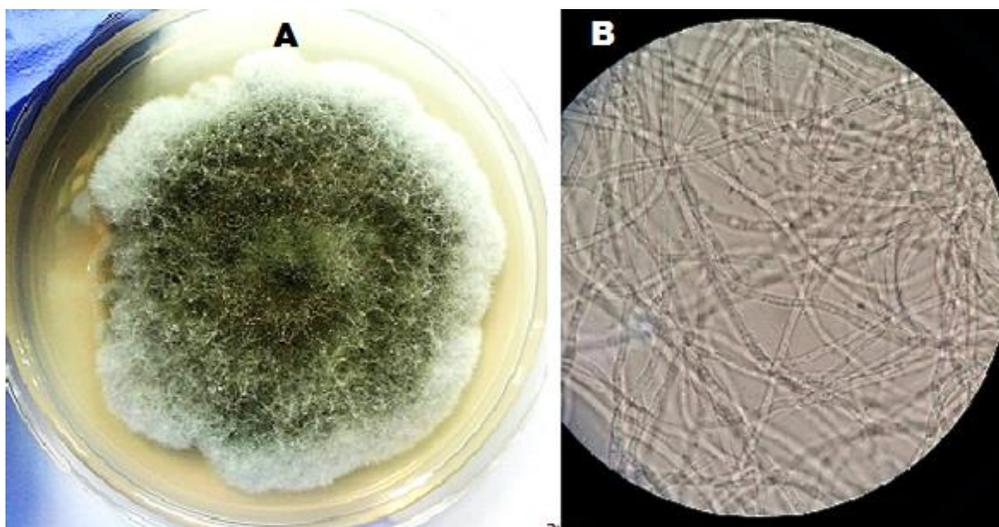
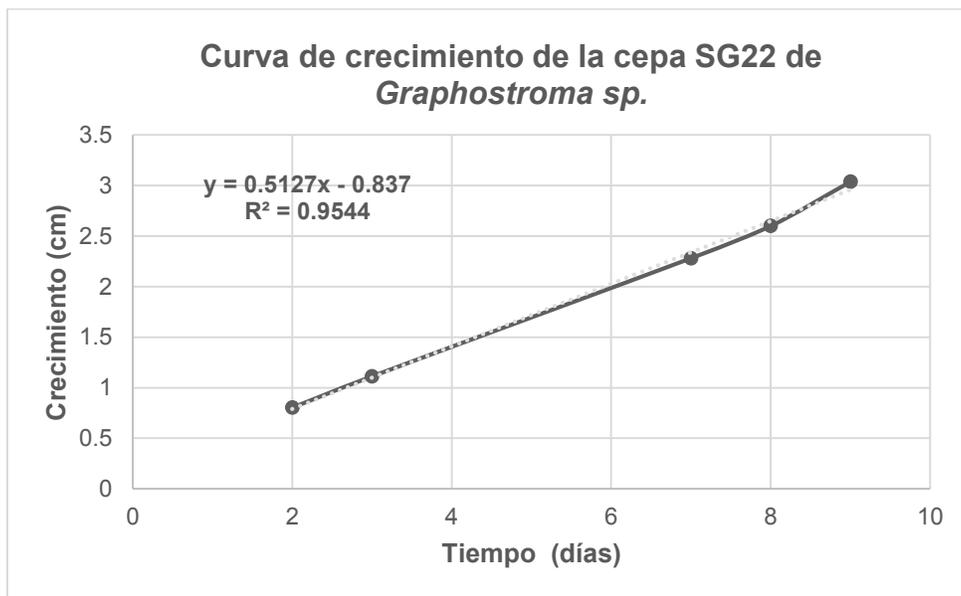


Figura 12. Endofito *Graphostroma sp.* A) Crecimiento de 9 días en medio PDA. B) Observación microscópica en 40X.

La velocidad de crecimiento radial (V_{CR}) se evaluó en la cepa SG22 del hongo *Graphostroma sp.* aislado de *T. globosa*. Esta cepa se cultivó en placas de Agar PDA, empleando como inóculo fragmentos (6 mm diámetro) de micelio reactivado a partir de la cepa conservada en un criovial mantenida a una temperatura de 3-5 °C. Se midió el avance micelial radial los días 2, 3, 7, 8 y 9 (Anexo A). La V_{CR} se evaluó empleando la ecuación lineal en la curva de crecimiento del hongo, donde

la pendiente representa la velocidad de crecimiento radial (V_{CR}) determinado en la fase del crecimiento lineal del hongo (Anexo A). Los resultados fueron los siguientes:



En dónde la Velocidad de crecimiento radial (V_{CR}) es: 0.5127 cm / día

Estas características son importantes ya que el hongo puro crece esa tasa de crecimiento, siempre y cuando se siembre exactamente bajo las mismas condiciones

6.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

Con el propósito de obtener los metabolitos secundarios producidos por el endofito y comprobar que poseen actividad antiproliferativa, el hongo fue cultivado en matraces de 125 mL y posteriormente en matraces de 250 mL como se describe en el desarrollo experimental, siendo 4 lotes en total.

Cada lote consistió en un cultivo masivo de 15 L, dando un total de 60 L de sobrenadante por los 4 lotes, y 2 L de micelio. La extracción del sobrenadante de

Graphostroma sp. se realizó mediante particiones sucesivas líquido-líquido con acetato de etilo como fase orgánica; y la extracción del micelio se realizó por medio de un licuado con solvente, en el cual también se utilizó acetato de etilo. Los extractos presentaron una consistencia semisólida, color café oscuro y olor característico.

En la tabla 4 se muestran los pesos de cada extracto obtenido en los cuatro lotes:

Tabla 4. Pesos de los extractos obtenidos mediante la partición líquido-líquido del sobrenadante y licuado con solvente del micelio.

LOTE	EXTRACTO	PESO OBTENIDO (g)
1 + 2	Sobrenadante	0.92117
	Micelio	4.11
3 + 4	Sobrenadante	0.45558
	Micelio	1.88351

Un total de: 1.37675 g de extracto para el sobrenadante y 5.99351 g para el micelio de los 4 lotes. Como se puede apreciar, en todos los casos se obtuvo una cantidad mucho mayor para el extracto del micelio que para el derivado del sobrenadante.

A partir de esos datos, se calculó el rendimiento de la extracción para los cuatro lotes, el cual se muestra en la Tabla 5, y fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Cantidad de extracto obtenido (g)} \times \frac{100\text{mL}}{\text{Volumen de } \frac{\text{sobrenadante}}{\text{micelio}} \text{ (mL)}}$$

Tabla 5. Rendimiento de la extracción del sobrenadante y del micelio de los cuatro lotes de *Graphostroma sp.*

EXTRACTO	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	RENDIMIENTO (%) g/mL
Caldo de cultivo	Partición líquido-líquido con acetato de etilo.	0.0022
Micelio	Licuada con solvente (acetato de etilo).	0.29

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la extracción demuestra tener menor rendimiento en el caso del sobrenadante, con un 0.0022% g/mL en comparación con el 0.29% g/mL del micelio, tomando en cuenta el total de caldo de cultivo y el total del micelio; si se toma en cuenta el volumen total de cultivo (60 L) el rendimiento de la extracción del micelio es de 0.0099% g/mL. Una vez reunidos por separado los extractos del sobrenadante y del micelio, se realizó CCF, con el fin de compararlos. La CCF permitió observar diferencia en la composición de los extractos, por lo que se evaluaron por separado. En la figura 13 se muestra, a manera de ejemplo, la CCF realizada a los extractos del sobrenadante y del micelio, observándose las diferencias en los compuestos presentes.

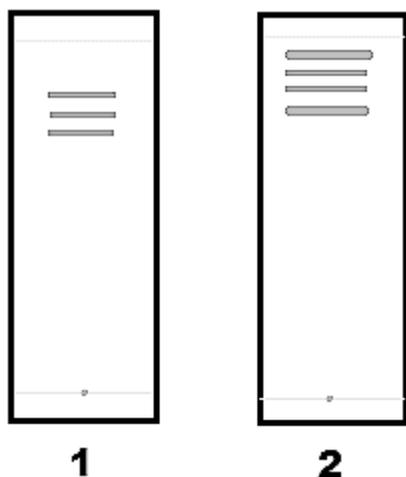


Figura 13. Representación del perfil cromatográfico de los extractos del hongo endófito *Graphostroma sp.* 1) Extracto obtenido por particiones sucesivas líquido – líquido con acetato de etilo del sobrenadante. 2) Extracto obtenido mediante licuado con acetato de etilo del micelio. Cromatoplaça eluída con AcOEt : hexano; 50:50.

A continuación se determinó la actividad antiproliferativa de los extractos, evaluando el efecto de los mismos sobre cultivos de células HeLa por medio del ensayo de MTT.

EXTRACTOS CRUDOS

- ❖ A partir de los cálculos mostrados en el Anexo D, se calculó la IC_{50} por medio de la siguiente fórmula:

$$IC_{50} = \frac{50\% - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente}}$$

Los resultados de la prueba de antiproliferación realizada para el extracto obtenido de la extracción con acetato de etilo del sobrenadante y del micelio se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. IC₅₀ de los extractos orgánicos crudos obtenidos del sobrenadante y del micelio.

EXTRACTO	IC₅₀ (µg/mL)
SOBRENADANTE	11.84
MICELIO	NO ACTIVIDAD SIGNIFICATIVA

Se puede apreciar que el extracto obtenido a partir del sobrenadante presenta actividad antiproliferativa; por otro lado, el extracto obtenido a partir del micelio no presentó actividad significativa, por lo que se decidió que se continuaría únicamente con la purificación del extracto del sobrenadante.

Finalmente, cabe resaltar que se deben establecer más estudios para determinar con exactitud la IC₅₀ del extracto crudo, ya que no existe bibliografía ni datos suficientes para comparar. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten poner en evidencia la actividad antiproliferativa de los metabolitos secundarios producidos por el endofito estudiado, haciéndolo un candidato idóneo para obtener los compuestos responsables de la actividad biológica.

6.3 PURIFICACIÓN

Sabemos que la cromatografía de adsorción sobre sílice es un ejemplo de cromatografía de fase normal, que se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar y que un disolvente más polar tiene fuerza eluyente mayor. Las moléculas se encuentran alternando entre estar pegadas al adsorbente o despegadas en el flujo, esto da como consecuencia que pese a que

el flujo es constante, solo una fracción de las moléculas se está moviendo. Las sustancias se mueven más lentamente debido a que están siendo unidas más fuertemente a la fase estacionaria, mientras que aquellas que se mueven más rápidamente son menos afines a la fase estacionaria. La habilidad de los componentes de la mezcla de tener una migración diferencial es el resultado de la selectividad del sistema cromatográfico.

Basándonos en ésta premisa, se decidió utilizar un equipo de cromatografía flash que, por medio de detectores UV, nos permitiera crear un perfil de elución de acuerdo a la absorción en el espectro de las sustancias eluidas.

La cromatografía flash realizada en el sistema Isolera™ ONE, arrojó los siguientes resultados:

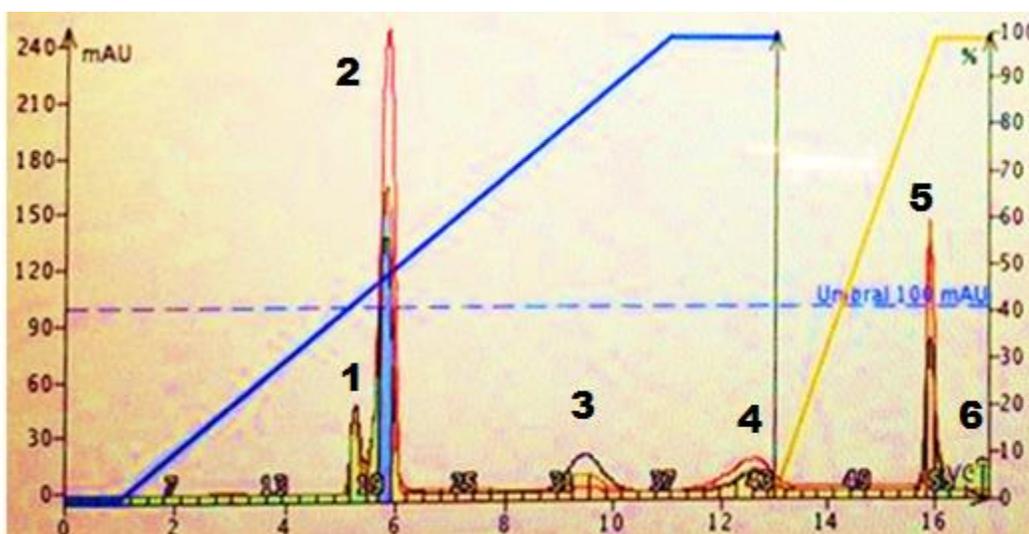


Figura 14. Cromatograma obtenido en un equipo Isolera™ ONE en el cual se observa la variación de colores, lo que indica la presencia de compuestos que absorben a distintos valores del espectro UV, y eluyen con porcentajes diferentes de la mezcla acetato de etilo – hexano, así como con porcentajes diferentes de la mezcla metanol – acetato de etilo. En el eje Y, a la derecha, se representa el % de acetato de etilo o el % de metanol, mientras que en el eje X se representan los volúmenes de columna. La línea azul indica el gradiente de la mezcla acetato de etilo – hexano y la línea amarilla representa el gradiente de la mezcla metanol – acetato de etilo. Se aprecian 6 picos de absorción.

En la figura 14, se observa un cromatograma proporcionado por el equipo de cromatografía flash, en el cual se marcan 6 picos, que indica la presencia de al menos 6 compuestos que absorben a determinada longitud de onda, y que eluyen a las siguientes proporciones: pico 1 = 40% AcOEt, pico 2 = 45% AcOEt, pico 3 = 80% AcOEt, pico 4 = 100% AcOEt, pico 5 = 10% AcOEt : 90% MetO, y pico 6 = 100% MetOH. El área bajo la curva de cada uno de los picos, podría indicar que hay compuestos que absorben más a la longitud de onda medida, y probablemente indicaría que esos compuestos pudieran estar en mayor proporción que los presentes en otros picos más pequeños, por lo que los compuestos de mayor proporción en el, que absorben a dicha longitud de onda, serían los presentes en el pico 2 y el pico 5.

La figura 15 representa los resultados de CCF obtenidos para cada una de las fracciones obtenidas por el equipo de cromatografía flash.

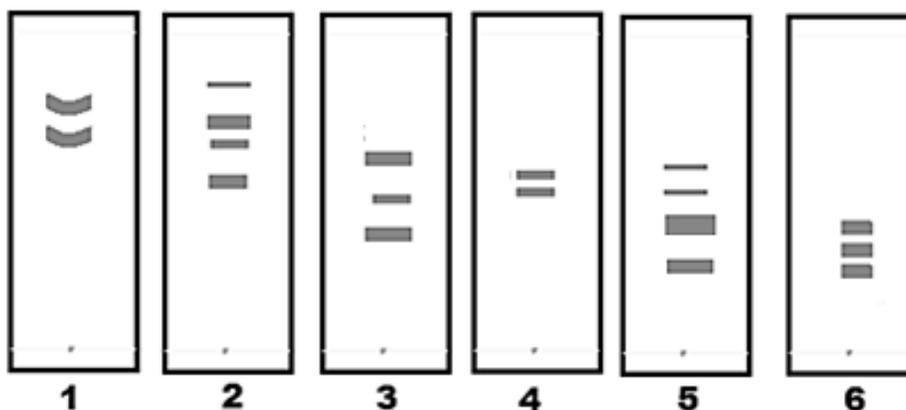


Figura 15. Representación del perfil cromatográfico –CCF- de las fracciones obtenidas por el equipo de cromatografía flash. Cromatoplasmas eluidas con AcOEt : hexano; 50:50.

A partir de esos resultados, se procedió a realizar la cromatografía en columna para la obtención de fracciones primarias del extracto crudo obtenido del caldo de cultivo de *Graphostroma sp.* La purificación consistió en un fraccionamiento realizado mediante CC. La cantidad de muestra inicial fue de: 805.22 mg. Dicha columna fue eluida con una mezcla de acetato de etilo - hexano, variando gradualmente el porcentaje de los solventes en la mezcla, y finalmente con

metanol para recuperar los compuestos más polares. Como resultado de este proceso, se obtuvieron 47 fracciones de distintos volúmenes, las cuales se concentraron en un rotaevaporador. Posteriormente, y de acuerdo a la similitud de su perfil cromatográfico en capa fina, estas fracciones se reunieron en 14 fracciones finales. En la figura 16 se muestran una representación de varios perfiles cromatográficos (CCF), donde se puede observar que el fraccionamiento realizado fue satisfactorio ya que se logra identificar la separación del extracto orgánico crudo en fracciones que contienen compuestos de distinta complejidad, de acuerdo a las bandas presentes, en comparación con la CCF del extracto crudo.

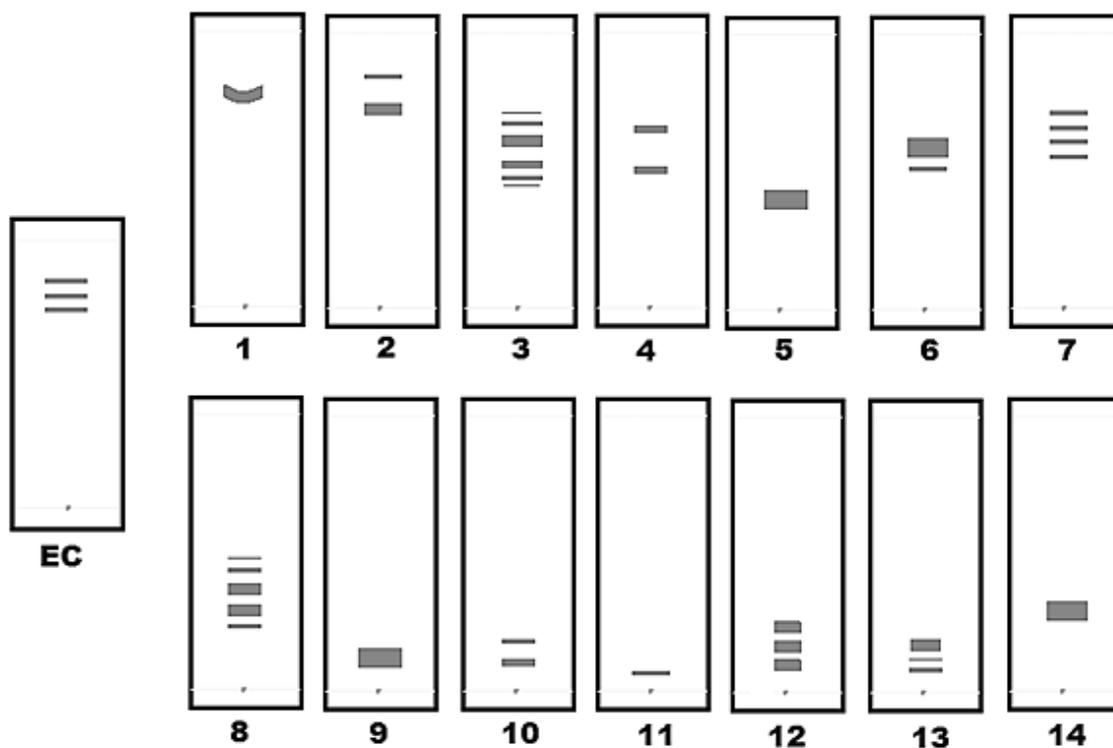


Figura 16. Representación del perfil cromatográfico –CCF- del extracto de sobrenadante y de las fracciones obtenidas en la purificación primaria –CC-. EC) Extracto del sobrenadante obtenido por particiones sucesivas líquido – líquido con AcOEt. 1-10) Fracciones obtenidas mediante el gradiente de elución realizado en CC. Cromatoplasas eluidas con AcOEt: hexano; 50:50. 11-14) Fracciones obtenidas mediante la elución con metanol. (11, AcOEt: metanol, 50:50; 12 y 13, AcOEt: metanol, 10:90; 14, metanol, 100%) Cromatoplasas eluidas con AcOEt: MeOH; 10:90.

Después de reunir las fracciones, se calculó el rendimiento de cada una de ellas, a partir del peso total de muestra que se sometió a purificación y al peso de cada fracción primaria purificada. La tabla 7 muestra las fracciones, la polaridad a la que eluyeron, el peso obtenido y el rendimiento de cada una de ellas.

Tabla 7. Peso de las fracciones obtenidas y rendimiento con respecto a la cantidad de muestra sometida a la purificación primaria.

FRACCIÓN	PROPORCIÓN (HEXANO : ACOET)	PESO (mg)	RENDIMIENTO (%)
1	100% : 0%	41	5.09
2	90% : 10%	3	0.37
3	80% : 20%	73	9.06
4	70% : 30%	4	0.49
5	60% : 40%	101	12.54
6	50% : 50%	9	1.11
7	40% : 60%	74	9.19
8	30% : 70%	83	10.30
9	20% : 80%	22	2.73
10	10% : 90%	6	0.74
11	0% : 100 %	19	2.35
12	50% AcOEt : 50% MetOH	129	16.02
13	10% AcOEt : 90% MetOH	70	8.69
14	100% MetOH	16	1.98

Se observa que los mayores rendimientos corresponden a las fracciones 5 y 12, lo cual, si se compara con los resultados obtenidos por el equipo Isolera™ ONE, demuestra que los picos de absorción 2 y 5 presentados en la figura 27 coinciden con los resultados de la purificación por CC, ya que muestran concordancia en la polaridad y en la cantidad de muestra obtenida, si se toma como parámetro el área bajo la curva.

6.4 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS

De la misma manera que para los extractos crudos, la evaluación de la actividad antiproliferativa se realizó por medio del ensayo de MTT con células HeLa, con el propósito de poder comparar la intensidad o porcentaje de inhibición de la proliferación de dichas fracciones.

FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

- ❖ Los resultados de la prueba de antiproliferación (Anexo E) realizada para las fracciones obtenidas de la CC se muestran en la tabla 8.

$$IC_{50} = \frac{50\% - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente}}$$

Tabla 8. Resultados de la evaluación de IC_{50} de las 14 fracciones obtenidas en la CC.

FRACCIÓN	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	38.68
2	88.82
3	10.03
4	7.85
5	0.56

6	8.56
7	11.58
8	11.81
9	13.63
10	10.17
11	10.44
12	10.37
13	494.36
14	211.06

De acuerdo a los resultados anteriores, se aprecia que la fracción de mayor actividad fue la fracción 5, con una IC₅₀ de 0.56 µg/mL.

Si realizamos un análisis en conjunto, podemos decir que el compuesto con la actividad biológica deseada se encuentra en la fracción 5, la cual eluye en una proporción de mezcla de elución 60% hexano – 40% AcOEt y se encuentra en mayor cantidad en el extracto obtenido del sobrenadante del cultivo de la cepa SG22 *Graphostroma sp.*

6.5 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS ESTUDIOS PRELIMINARES

Los resultados obtenidos en los estudios preliminares realizados por Pacheco, D. mostraron ciertas discordancias con los resultados presentados en este proyecto de investigación. La tabla 9 muestra las diferencias significativas entre las dos metodologías así como los resultados de cada una de ellas.

Tabla 9. Variación de los resultados obtenidos en el fraccionamiento primario, en la metodología preliminar y la actual.

Etapa	Metodología preliminar	Metodología realizada	Resultados obtenidos
Purificación primaria del extracto del caldo de cultivo	Elución isocrática utilizando una mezcla de: Cloroformo-MetOH-Hexano	Gradiente de elución utilizando AcOEt-hexano	<ul style="list-style-type: none"> • Elución isocrática: IC₅₀ más alta de una fracción = 4.95 µg/mL • Gradiente de elución = 0.56 µg/mL

De acuerdo a los resultados anteriores, podemos decir que la variación en la actividad biológica de las fracciones obtenida entre los dos estudios, podría indicar que el proceso de elución es crítico, y es más eficiente en el caso de un gradiente de elución, ya que al ser modificado, se produce una fracción con mayor actividad antiproliferativa.

Debido a que no existe literatura que reporte acerca del hongo *Graphostroma sp.*, ni de la actividad biológica de sus metabolitos secundarios, estos resultados podrían contribuir a la investigación de compuestos novedosos con actividad antiproliferativa.

7. CONCLUSIONES

- ✓ El estudio de las características macro y microscópicas del hongo endofito permitió determinar la tasa de crecimiento de la cepa SG22 aislada de *T. globosa* en medio PDA, la cual fue de 0.51 cm/día.
- ✓ La inhibición significativa del extracto orgánico crudo ($IC_{50} = 11.83 \mu\text{g}/\text{ML}$), obtenido del sobrenadante, sobre el crecimiento de células HeLa, sugiere que este endofito produce compuestos con posibilidad de detener la proliferación de células cancerígenas.
- ✓ La fracción 5, obtenida por CC es la que presenta el mayor efecto inhibitorio sobre el cultivo de células HeLa ($IC_{50} = 0.56 \mu\text{g}/\text{mL}$), constituyendo un candidato idóneo para realizar estudios químicos biodirigidos conducentes al aislamiento e identificación de los compuestos responsables de la actividad biológica demostrada a nivel de extractos.

De acuerdo a la prevalencia del cáncer en la población humana y la aparición de nuevas enfermedades, lo que se pretende realizar con este estudio de investigación del potencial bioactivo de la cepa SG22 de *Graphostroma sp.* aislada de *Taxus globosa*, es explorar a éste microorganismo como fuente de compuestos terapéuticamente útiles, eficaces y fidedignos. Asimismo, se demuestra que el estudio químico y biológico de los hongos endofitos es de suma importancia para la búsqueda y desarrollo de compuestos novedosos que presenten actividad biológica y que puedan ser útiles como fármacos que eviten la proliferación de las células cancerígenas.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio biodirigido de las fracciones con mayor actividad biológica, obtenidas del extracto del sobrenadante, monitoreando la actividad antiproliferativa.
- Aislar y purificar el mayor número de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica, así como la determinación cuantitativa de su actividad antiproliferativa.
- Elucidación de la estructura molecular de los compuestos bioactivos puros aislados.
- Determinar los posibles efectos tóxicos de los extractos y compuestos puros.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO A. MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE *GRAPHOSTROMA SP.*

Tabla 10. Mediciones del diámetro del crecimiento de la cepa SG22 en placas de agar PDA a los días 2, 3, 7, 8 y 9. Fueron realizadas las mediciones de cuatro placas para cada día, cuatro veces cada una.

Día	Caja	Diámetro 1 (cm)	Diámetro 2 (cm)	Diámetro 3 (cm)	Diámetro 4 (cm)	Media (cm)	Promedio (cm)
2	1	1.8	1.6	1.4	1.6	1.6	1.60625
	2	1.9	1.4	1.6	1.5	1.6	
	3	1.7	1.5	1.3	1.7	1.55	
	4	1.9	1.5	1.6	1.7	1.675	
3	1	2.3	2.2	2.1	2.1	2.175	2.225
	2	2.1	2.2	2.5	2.1	2.225	
	3	2.3	2.3	2.4	2.2	2.3	
	4	2.3	2.1	2.2	2.2	2.2	
7	1	4.6	4.7	4.5	4.6	4.6	4.5625
	2	4.6	4.6	4.4	4.5	4.525	
	3	4.3	4.8	4.9	4.5	4.625	
	4	4.4	4.3	4.9	4.4	4.5	
8	1	5.3	5.2	5.2	5.1	5.2	5.2
	2	5.1	5.3	5.4	5.4	5.3	
	3	5.2	5.1	5.2	5.1	5.15	
	4	5.3	5.1	5.1	5.1	5.15	
9	1	6.2	5.9	6.1	6.1	6.075	6.075
	2	6.2	5.9	6.1	6.1	6.075	
	3	6.2	5.9	6.1	6.1	6.075	
	4	6.2	5.9	6.1	6.1	6.075	

9.2 ANEXO B. PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES A PROBAR DEL EXTRACTO CRUDO Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS.

A partir de las concentraciones y probadas por Pacheco, D., se realizaron los cálculos para conocer las concentraciones a probar las cuales fueron: 0.5% p|v, 7% p|v y 14% p|v.

Tabla 11. Cálculos realizados a partir de datos teóricos tomados de la tesis de Pacheco, D. de las concentraciones a probar. A partir de la cantidad de extracto obtenido, se calculó la cantidad por matraz

CÁLCULOS PARA CONOCER LAS CONCENTRACIONES A PROBAR									
LOTES	Extracto	Peso Total (g)	mg Totales	g por matraz	µg por matraz	IC50 (%v v) Reportado por Dentista	IC50 (% p v) Calculado	Promedio (% p v)	
1	Caldo	0.30192	301.92	0.00040256	402.56	0.3	0.908030075	0.741557895	
						0.26	0.786959398		
						0.175	0.529684211		
1	Micelo	2.63203	2632.03	0.003509373	3509.373333	0.3	7.915879699	6.46463088	
						0.26	6.860429073		
						0.175	4.617596491		
1	Metamólico	0.56702	567.02	0.000756027	756.0266667	0.3	1.705323308	1.392680702	
						0.26	1.477946867		
						0.175	0.99477193		
2	Caldo	0.05223	52.23	0.00006964	69.64	0.3	0.157082707	0.128284211	
						0.26	0.136138346		
						0.175	0.091631579		
2	Micelo	1.47806	1478.06	0.001970747	1970.746667	0.3	4.445292333	3.630322807	
						0.26	3.852587469		
						0.175	2.593087719		
3	Caldo	0.11715	117.15	0.0001562	156.2	0.3	0.352330827	0.287736842	
						0.26	0.305353383		
						0.175	0.205526316		
3	Micelo	0.91937	919.37	0.001225827	1225.826667	0.3	2.765022556	2.258101754	
						0.26	2.396352882		
						0.175	1.612229825		
4	Caldo	0.33843	338.43	0.00045124	451.24	0.3	1.017834586	0.831231579	
						0.26	0.882123308		
						0.175	0.593736842		
4	Micelo	0.96414	964.14	0.00128552	1285.52	0.3	2.899669173	2.368063158	
						0.26	2.513046617		
						0.175	1.691473684		

Tabla 12. Cálculos realizados para conocer la cantidad a pesar de cada extracto o fracción, la cantidad real pesada y, al ser aforado a 5 mL, el volumen a tomar para tener las concentraciones seleccionadas.

CÁLCULOS PARA ALICUOTACIONES									
(% p/v) a probar ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)	Para 1 pozo: ($\mu\text{g}/1000\mu\text{L}$)	Para 5 pozos: ($\mu\text{g}/5000\mu\text{L}$)	Duplicado (μg)	μg teóricos a pesar	mg reales pesados	μg reales pesados	Volumen de dilución (μL)	Alicuotación teórica (μL)	Alicuotación real (μL)
0.5	5	25	50	2200	2.49	2490	5000	50.20080321	50
7	70	350	700	2200				702.811245	703
14	140	700	1400	2200				1405.62249	1406
0.5	5	25	50	2200	3.18	3180	5000	39.3081761	39
7	70	350	700	2200				550.3144654	550
14	140	700	1400	2200				1100.628931	1101
0.5	5	25	50	2200	2.16	2160	5000	57.87037037	58
7	70	350	700	2200				810.1851852	810
14	140	700	1400	2200				1620.37037	1620
0.5	5	25	50	2200	2.22	2220	5000	56.30630631	56
7	70	350	700	2200				788.2882883	788
14	140	700	1400	2200				1576.576577	1577
0.5	5	25	50	2200	2.81	2810	5000	44.48398577	44
7	70	350	700	2200				622.7758007	623
14	140	700	1400	2200				1245.551601	1246

A partir de los cálculos realizados, se determinó la cantidad de extracto a pesar (2.2 mg) y se aforaron a 5 mL con acetona. Después, en viales de 1 mL y con ayuda de una jeringa, se pusieron los μL indicados en los cálculos para llegar a las concentraciones indicadas. Los viales preparados con las concentraciones a probar se pusieron a secar con nitrógeno gaseoso para eliminar el solvente y se conservaron en refrigeración.

9.3 ANEXO C. CÁLCULOS PARA LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

✓ Masa total de extracto seco que fue sometida a cromatografía en columna:

0.80522 g.

Si para cada gramo de extracto se necesitan 20 g de gel de sílice:

$$0.80522 \text{ g} \left| \frac{20 \text{ g de gel de sílice}}{1 \text{ g de extracto}} \right| = 16.1044 \text{ g de gel de sílice}$$

Se calculó el volumen que ocupa la masa de gel de sílice sabiendo que la densidad del gel de sílice es de $0.4556 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$.

$$V_{\text{sílice}} = \frac{16.1044 \text{ g de gel de sílice}}{0.4556 \frac{\text{g}}{\text{mL}}} = 35.34767 \text{ mL}$$

Para saber si el volumen de gel de sílice no sobrepasaba el volumen de la columna se calcula el volumen de la columna.

$$D_{\text{externo}} = 2.1 \text{ cm}$$

$$\text{Espesor: } 0.216 \text{ cm}$$

$$D_{\text{interno}} = 2.1 \text{ cm} - (0.216 \text{ cm}) = 1.884 \text{ cm}$$

$$r_{\text{interno}} = \frac{1.884 \text{ cm}}{2} = 0.942 \text{ cm}$$

$$h_{\text{columna}} = 45 \text{ cm}$$

$$V_{\text{columna}} = \pi(0.942 \text{ cm})^2(45 \text{ cm}) = 125.$$

9.4 ANEXO D. CÁLCULOS PARA LA OBTENCIÓN DE LA IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS EN CADA LOTE, TANTO DEL SOBRENADANTE COMO DEL MICELIO.

El % de sobrevivencia de las células HeLa ante el efecto del extracto fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%sobrevivencia = \frac{A \text{ de células tratadas}}{A \text{ de células con DMSO}} * 100$$

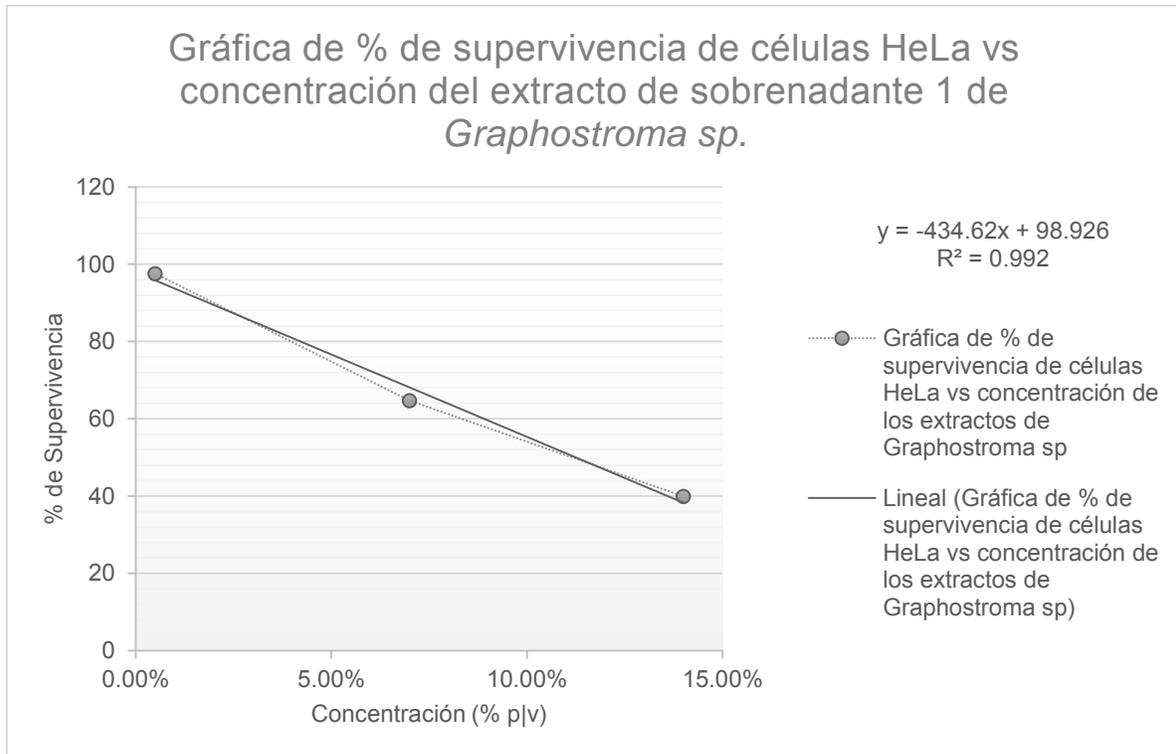
- Con los datos del % de sobrevivencia de las células, se realizaron las gráficas correspondientes para determinar la IC₅₀ de cada extracto. Un ejemplo de cálculo se muestra a continuación:

SOBRENADANTE

- **LOTE 1**

Tabla 13. % de supervivencia de las células tratadas con distintas concentraciones del extracto crudo obtenido del sobrenadante del Lote 1.

Sobrenadante-Lote 1	
Concentración del extracto (% p v)	% de Sobrevivencia
0.50%	97.60
7%	64.72
14%	39.94



9.5 ANEXO E. CÁLCULOS PARA LA OBTENCIÓN DE LA IC₅₀ DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CC REALIZADA AL EXTRACTO DE LOS CALDOS DE CULTIVO.

Del análisis de antiproliferación de las 14 fracciones obtenidas se obtuvieron absorbancias las cuales se interpretaron en % de sobrevivencia de las células HeLa ante el efecto del extracto de acuerdo a la siguiente fórmula:

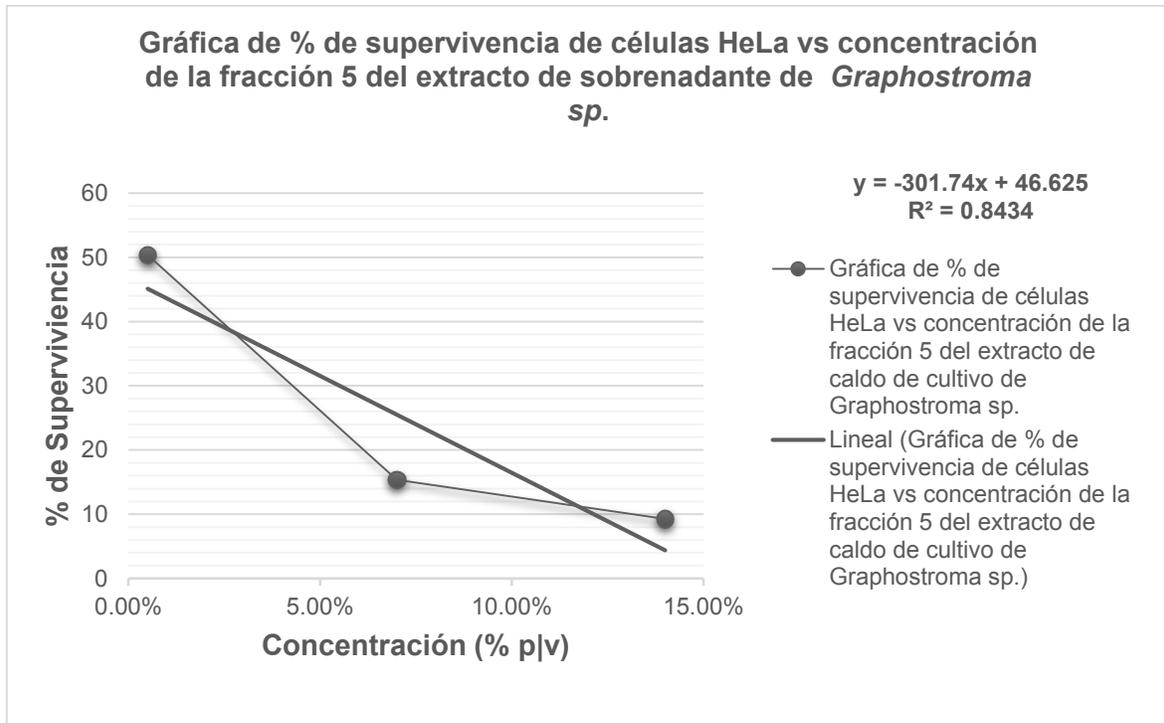
$$\%sobrevivencia = \frac{A \text{ de células tratadas}}{A \text{ de células con DMSO}} * 100$$

Con los datos del % de sobrevivencia de las células, se realizaron las gráficas correspondientes para determinar la IC₅₀ de cada extracto. A continuación se representan los cálculos de la fracción 5:

- **FRACCIÓN 5**

Tabla 14. % de supervivencia de las células tratadas con distintas concentraciones de la fracción 5 obtenida del extracto orgánico crudo del sobrenadante de *Graphostroma sp.*

Fracción 5	
Concentración de la fracción (% p v)	% de Supervivencia
0.50%	50.37
7%	15.37
14%	9.26



10. REFERENCIAS

- ¹ Dinse, G.E., Umbach, D.M., Sasco, A.J., Hoel, D.B., Davis, D.L. (1999) Unexplained increases in cancer incidence in the United States from 1975 to 1994: possible sentinel health indicators? *Annu Rev Public Health*. 20:173–209.
- ² Barrales, C.H.J., De la Rosa, M.C.R., Villegas, O.S. (2012) Hacia una genética celular del cáncer. *Revista la Ciencia y el Hombre*. 25 (2):1-6.
- ³ Soto, J., Sainz, C., Cos, S., González-Lamuño, D. (2005) Estudio in vitro de terapia combinada con bajas dosis de radiación (Rn-222) y quimioterapia (taxol). *Radiobiol*. 5:100-103.
- ⁴ Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 93 (9): 2325-7.
- ⁵ Cragg, G.M., Newman, D. J. (2005) Plant as a Source of Anti-Cancer Agents. *Ethnopharmacology*. 1 (100): 72-79.
- ⁶ Cafêu, M., Silva, G., Teles, H., Bolzani, V., Araújo, A. (2005) SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS DE *Xylaria sp.*, UM FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Palicourea marcgravii*. *Quim. Nova*. 28 (6): 991-995.
- ⁷ Pacheco Cerón, I. D. (2013) Actividad anti-proliferativa en células HeLa, de extractos de los hongos *Fusarium sp*, *Graphostroma sp*, *Hypoxylon falciforme* y *Biscongnauxia mediterránea* aislados de *Taxus globosa*. Realizado en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional y presentado en la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología, para obtener el grado de: Ingeniero Farmacéutico.
- ⁸ American Cancer Society (2014) Consultado el 02 de julio de 2014 en: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/>
- ⁹ Jemal, A, Bray F, Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2 (61): 69-9

- 10 Organización Mundial de la Salud (2014) Consultado el 23 de septiembre de 2014 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 11 Vineis, P., Schatzkin A., Potter, J. (2010) Models of carcinogénesis: an overview. *Carcinogenesis*. 31 (10):1703-1709.
- 12 Fan, T., Han, L., Cong, R., Liang, J. (2005) Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 37 (11): 719-727.
- 13 Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2006) Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*. 27 (10):1939-1945.
- 14 World Health Organization (2014) Consultado el 07 de julio de 2014 en: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/regions/en/>
- 15 Anand, P., Kunnumaka. (2008) Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*. 25 (9): 2097-2116.
- 16 Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2006) Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*. 27 (10):1939-1945.
- 17 Favalaro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2012) Role of Apoptosis in disease. *AGING*. 4 (5).
- 18 Organización Mundial de la Salud (2014) consultado el 23 de septiembre de 2014 en: <http://www.who.int/cancer/treatment/es/>
- 19 About Health: Cancer (2014) Consultado el 02 de julio de 2014 en: <http://cancer.about.com/od/treatmentoptions/a/options.htm>
- 20 Better Cancer Care (2005) Consultado el 23 de septiembre de 2014 en: <http://www.scotland.gov.uk/Resource/Doc/242498/0067458.pdf>
- 21 Vanneman, M., Dranoff, G. (2012) Combining immunotherapy and targeted therapies in cáncer treatment. *Nature Reviews: Cancer*. 12: 237-251.
- 22 Brannon-Peppas, L., Blanchette, J. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cáncer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64: 206-212.
- 23 National Cancer Institute (2014) Conculgado el 24 de septiembre de 2014 en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>
- 24 Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2008) consultado el 11 de julio de 2014 en:

- <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>
- ²⁵ Bailly, C. (2009) Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*. 77: 1447-1457.
- ²⁶ Harvey, A. L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13: 894-901.
- ²⁷ Ganesan, A. (2008) The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12: 306-317
- ²⁸ Wilson, D. (1995) Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos*. 73: 274-276.
- ²⁹ Schulz, B., Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109: 661-686.
- ³⁰ Kusari, S., Hertweck, C., Spiteller, M. (2012) Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*. 19: 792-798.
- ³¹ Shearer, C. (1995) Fungal competition. *Can. J. of Bot.* 73: 1259-1264.
- ³² Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67: 257-268.
- ³³ Rivera, F., Suárez, R., Flores, Z., Flores, L. (2011) Diversity of endophytic fungus of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity*. 47: 65-74.
- ³⁴ Zabala, C., Rodríguez, M. (2001) El romerillo (*Taxus globosa*): Biología, dificultades y perspectivas de uso. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 7(1): 77-94.
- ³⁵ Wickremesinhe, E., Arteca, R. (1994) *Taxus* cell suspension cultures: Optimizing growth and taxol production. *Journal of Plant Physiology*. 144: 183-188.
- ³⁶ Centelles, J., Imperial, S. (2010) Paclitaxel, descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Fitoterapia*. 29: 69-75.
- ³⁷ Liao, Z., Chen, M., Sun, X., Tang, K. (2006) Micropropagation of endangered plant species. *Methods Molecular Biology*. 318: 179-185.

- ³⁸ Soca-Chafre, G., Rivera-Orduña, F., Hidalgo, M., Hernández, C., Marsch, R., Flores-Cotera, L. (2010) Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fungal Biology*. 115: 143-156.
- ³⁹ Maiden, M. (2006) Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 561–588.
- ⁴⁰ Strobel, G., Daisy, B. (2003) Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(4): 491-502.
- ⁴¹ Macías-Rubalcava, M.L. *et al.* (2008) Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochem.* 69: 1185-1196.
- ⁴² Neilan, B.A., Pomatia, F., Nettinga, A.G., Calamarib, D. (2004) Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* 67(4): 387-396.
- ⁴³ Zhu, J.W. *et al.* (2000) Elucidation of Strict Structural Requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiations and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* 8: 455-463.
- ⁴⁴ Yu, H. *et al.* (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microb. Res.* 165: 437-449.
- ⁴⁵ Guimaraes, D.O. *et al.* (2008) Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *Immunol. Med. Microbiol.* 52: 134-144.
- ⁴⁶ Carrillo, A., Brió, S., Quindós, G. (2001) Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Iberoam Micol.* 18: 2-5.
- ⁴⁷ Mönckeberg F, 1988. "La Revolución de la Bioingeniería", Editorial Mediterráneo.
- ⁴⁸ Meijer, L. (2003) Le Cycle de division cellulaire et sa regulation. *Oncologie.* 5: 311.
- ⁴⁹ Gerlier, D., Thomasset, N. (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 94: 57-63.