



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CINVESTAV UNIDAD ZACATENCO



Actividad antiproliferativa y
proapoptótica de un extracto semipurificado de
Trichophaea sp. cepa SGLAfo1, un hongo endofítico de *Taxus globosa*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ADAN MUÑOZ PABLO

DIRECTOR: Dr. Patricio Gariglio Vidal

ASESOR: Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

CDMX, 05 de Noviembre de 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno MUÑOZ PABLO ADAN,
con número de cuenta 3091281661 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 05 del mes de Noviembre de 2018 a las 11:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	M. en C. ARACELI GARCÍA DEL VALLE
VOCAL*	DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL
SECRETARIO	DR. RODRÍGO ANIBAL MATEOS NAVA
SUPLENTE	MTRO. VÍCTOR ALBERTO CORVERA PILLADO
SUPLENTE	M. en C. JESÚS AGUILAR CASTRO

El título de la tesis que se presenta es: **Actividad antiproliferativa y proapoptótica de un extracto semipurificado de *Trichophaea sp. cepa* SGLAf01, un hongo endofítico de *Taxus Globosa*.**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 15 de Octubre de 2018.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

PACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM; *mi alma mater...*

Zaragoza; *siempre serás mi casa...*

Dedicatoria:

*A mi madre, a mi
familia con todo el amor
y gracias por su inmenso
amor...*

Índice

Índice de figuras	IX
Lista de Abreviaciones	XI
Índice de cuadros	XIII
1. Introducción	1
1.1. Resumen	1
1.2. Abstract	2
1.3. Introducción	2
2. Antecedentes	5
2.1. Cáncer	5
2.2. Cáncer cervical	7
2.2.1. Clasificación FIGO	7
2.3. Virus de Papiloma Humano	8
2.3.1. VPH y carcinogénesis	10
2.3.2. Epidemiología del cáncer cervicouterino.	12
2.4. Ciclo celular	14
2.4.1. Apoptosis	15
2.4.2. Apoptosis en cáncer	17
2.5. Tratamientos contra el cáncer	19
2.5.1. Endófitos	21
2.5.2. Genero <i>Taxus</i>	26
2.5.3. <i>Taxus globosa</i>	27
2.5.4. <i>Trichophaea sp.</i> cepa (SGLAf01)	28
3. Planteamiento del problema	31
3.1. Planteamiento del problema	31
4. Hipótesis	33
5. Objetivo	35

6. Materiales y métodos	37
6.1. Material biológico	37
6.1.1. Preparación del extracto crudo.	39
6.2. HPLC de fase inversa (RP-HPLC).	40
6.3. Determinación de CI_{50}	40
6.3.1. Determinación de la CI_{50} (<i>Matemática</i>)	41
6.3.2. Cultivo celular	41
6.4. Análisis del ciclo celular	42
6.4.1. Ensayo apoptosis	42
6.5. Análisis estadístico	43
7. Resultados	45
7.1. Resultados	45
7.1.1. Separación en cromatograma HPLC de fase inversa del extracto crudo de <i>Trichophaea sp.</i> cepa SGLAf01.	45
7.1.2. Actividad antiproliferativa del extracto SGLAf01 semipurificado (F10).	46
7.1.3. Actividad proapoptótica del extracto crudo SGLAf01.	50
7.1.4. Discusión de Resultados	52
8. Conclusiones	55
8.1. Conclusión	55
8.1.1. Propuestas	55
8.1.2. Perspectivas	56
Appendices	
A. Apéndices del desarrollo experimental	61
A.1. Datos del árbol <i>Taxus Globosa</i> del que se obtuvo el hongo endófito.	61
A.1.1. Taxonomía <i>Trichophaea</i>	64
A.2. Líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu)	64
A.3. Condiciones de los protocolos utilizados	66
B. Bibliografía	71

Índice de figuras

2.1. Incidencia de Cáncer (GLOBOCAN)	7
2.2. VPH	9
2.3. Etapas en el desarrollo del cáncer cervical	11
2.4. Genoma viral del VPH 16	12
2.5. Incidencia de cáncer cervical	13
2.6. Cáncer cervical en México	14
2.7. Apoptosis	17
2.8. El circuito integrado emergente de la célula	18
2.9. Apoptosis en cancer	20
2.10. Tratamientos fármaco quimioterapéuticos	21
2.11. Ciclo celular en fármacos quimioterapéuticos	22
2.12. Principales acontecimientos históricos del paclitaxel (Taxol®)	25
2.13. Características del genero <i>Taxus</i>	27
2.14. <i>Trichophaea sp</i> (SGLAf01)	29
7.1. HPLC del extracto precipitada	46
7.2. Gráfica efecto antiproliferativo SLAGf01	47
7.3. Efecto apoptótico de SGLAf01 (HeLa)	48
7.4. Efecto apoptótico de SGLAf01(SiHa)	49
7.5. Efecto apoptótico de SGLAf01 en gráfica de Barras (HeLa y SiHa)	50
7.6. Efecto apoptótico de extracto crudo SGLAf01 (HeLa)	51
A.1. <i>Taxus Globosa</i> vista general	62
A.2. Filogenética de <i>Taxus</i>	62
A.3. Filogenética de <i>Taxus globosa</i>	63

Lista de Abreviaciones

µg	Micro gramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADNc	Copia de ADN
Bcl-2	Familia de proteínas antiapoptóticas (B-ceñ lymphoma 2)
DMSO	Dimetil sulfoxido
dNTP	Deoxi nucleotido trifosfato
Cacu	Cáncer Cervico uterino
CI50	Concentración inhibitoria del 50 por ciento.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Exp.3.4	Experimento
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetría
FICT	FITC-Goat aAnti-Rabbit Caspase 3 Ab4
MMLV-RT	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MTT	(Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)
p21	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A
p53	Proteina denominada "guardián del genoma" peso 50 Daltons.
PDA	Agar papa-dextrosa
RT-qPCR	Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
VPH	Virus del papiloma humano
v/v	Volumen/Volumen

Índice de cuadros

2.1. Clasificación FIGO Referencia: Classification of malignant tumours. (Sobin y Wittekind 2010)	8
6.1. Características generales de líneas celulares	37
7.1. Valores de la concentración de CI 50	47
A.1. Datos de <i>Taxus Globosa</i>	62
A.2. Condiciones del protocolo RT-qPCR	67

Neque porro quisquam est qui dolorem ipsum quia dolor sit amet, consectetur, adipisci velit...

No hay nadie que ama el dolor en sí mismo, que lo busca y lo quiere, simplemente porque es dolor ...

— Cicero's *de Finibus Bonorum et Malorum*

1

Introducción

Índice

1.1. Resumen	1
1.2. Abstract	2
1.3. Introducción	2

1.1. Resumen

El cáncer sigue siendo un problema de salud líder en todo el mundo, por lo que continuamente se investigan nuevas fuentes de compuestos antitumorales. Se evaluó la actividad citotóxica de un extracto semipurificado del hongo *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, un endófito de *Taxus globosa* (tejo mexicano), con dos líneas celulares de cáncer cervical, a saber, HeLa y SiHa. Los efectos adicionales del extracto semipurificado de la cepa SGLAf01 fueron los siguientes: i). Induce apoptosis a las 48 h, ii). Aumenta la expresión de la proteína p53, así como las de las proteínas diana proapoptóticas, iii). Disminuye el potencial de membrana mitocondrial y, iv). Activa la caspasa3. Este es el primer informe que muestra que una cepa fúngica *Trichophaea* es capaz de sintetizar metabolitos secundarios con actividad antiproliferativa y proapoptótica, lo que sugiere que la cepa SGLAf01 de *Trichophaea sp.* puede ser una fuente valiosa de nuevos compuestos anticancerígenos que vale la pena seguir investigando.

1.2. Abstract

Cancer remains a leading health problem worldwide, accordingly, new sources of antitumor compounds are continually being investigated. In this work, we evaluated the cytotoxic activity of a semipurified extract of the fungus *Trichophaea sp.* strain SGLAf01, an endophyte of *Taxus globosa* (Mexican yew), with two cervical cancer cell lines, namely HeLa and SiHa. Additional effects of the semipurified extract of the strain SGLAf01 were as follows: i). Induces apoptosis at 48 h, ii). Upregulates p53 protein expression, as well as those of proapoptotic p53 target proteins, iii). Diminishes mitochondrial membrane potential and, iv). Activates caspase3. This is the first report to show that a *Trichophaea* fungal strain is able to synthesize secondary metabolites with antiproliferative and proapoptotic activity, suggesting that *Trichophaea sp.* strain SGLAf01 may be a valuable source of new anticancer compounds worthy to be further investigated.

Key Words: chromatography, *Pyronemataceae*, *Pezizales*, cell cycle, apoptosis, cervical cancer, caspase 3, membrane potential

1.3. Introducción

Los endófitos son microorganismos que pasan todo o parte de su ciclo vital colonizando tejidos vegetales sanos, ya sea intra o extracelularmente. La asociación planta/microorganismo se facilita en muchos casos por los compuestos biológicamente activos sintetizados por los microorganismos endofíticos; estos compuestos a menudo benefician a la planta huésped, proporcionando protección contra la infección patógena y en otros casos siendo cruciales para la supervivencia de la planta (Strobel, 2002). Los microorganismos endofíticos son una fuente excepcionalmente rica y diversa de nuevos compuestos químicos; sin embargo, han sido mal estudiados aun cuando representan una fuente prometedora de productos naturales con potencial uso como antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antioxidantes entre otros (Harper *et al.*, 2003). Es bien sabido que el cáncer es un serio problema de salud y socioeconómico. Durante las últimas tres décadas se han hecho enormes avances

en la comprensión de la expresión génica en el cáncer. Por lo tanto, estos avances no siempre se han traducido en beneficios equivalentes para los pacientes. Los casos con supervivencia mejorada con frecuencia reflejan avances en la detección o prevención temprana, en lugar de en mejores tratamientos (Altieri, 2008). El estudio de microorganismos endofíticos puede conducir al descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos más eficaces para el tratamiento del cáncer. Además, el ámbito de los mecanismos por los que actúan los compuestos con actividades antiproliferativas y proapoptóticas es esencial en el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento de los cánceres epiteliales comunes. *Trichophaea* es un género de hongos de la familia *Pyronemataceae*, la familia más grande y menos estudiada de los *Pezizales* (Perry *et al.*, 2007). No se conoce la información disponible sobre metabolitos producidos por hongos pertenecientes a *Trichophaea*, ni ninguna referencia sobre el estudio o aislamiento de compuestos con actividad antiproliferativa. (Qadri *et al.*, 2013) han informado recientemente de una fuerte actividad antibiótica (CI 50 = 18 µg / mL) en extractos de *Trichophaea abundans*, un endófito de *Pinus sp.* Pero no se dispone de información adicional sobre este extracto. Las plantas de entornos únicos (organismos autótrofos, es decir que producen su propio alimento), a menudo albergan microorganismos endofíticos capaces de sintetizar compuestos bioactivos únicos (Strobel y Daisy, 2003). A partir de una muestra de hojas de *T. globosa* (tejo mexicano), recogida en la Cañada de las Avispas, dentro de la reserva de la Biosfera Sierra Gorda (Soca-Chafre *et al.*, 2011), la cual es una región prominente debido a su eco-diversidad, valor biológico y su vegetación rica en especies endémicas entre las áreas protegidas de México, se obtuvo la cepa *Trichophaea sp* y se aisló el extracto SGLAf01 (genotipo C), utilizado a lo largo de este trabajo. Las pruebas preliminares mostraron que del cultivo de *Trichophaea sp.*, la fracción SGLAf01 y algunas otras fracciones obtenidas por cromatografía tienen actividad antiproliferativa en células HeLa y SiHa, lo que sugiere que esta cepa fúngica podría ser una fuente potencial de compuestos con actividad anticancerígena.

*Alles Gescheite ist schon gedacht worden.
Man muss nur versuchen, es noch einmal zu denken.*

*Todos los pensamientos inteligentes ya han sido pen-
sados; lo que es necesario es solo tratar de pensarlos
de nuevo.*

— Johann Wolfgang von Goethe

2

Antecedentes

Índice

2.1. Cáncer	5
2.2. Cáncer cervical	7
2.2.1. Clasificación FIGO	7
2.3. Virus de Papiloma Humano	8
2.3.1. VPH y carcinogénesis	10
2.3.2. Epidemiología del cáncer cervicouterino.	12
2.4. Ciclo celular	14
2.4.1. Apoptosis	15
2.4.2. Apoptosis en cáncer	17
2.5. Tratamientos contra el cáncer	19
2.5.1. Endófitos	21
2.5.2. Genero <i>Taxus</i>	26
2.5.3. <i>Taxus globosa</i>	27
2.5.4. <i>Trichophaea sp. cepa</i> (SGLAf01)	28

2.1. Cáncer

En definición la enfermedad cáncer se utiliza para denominar a un conjunto de neoplasias malignas de origen epitelial, mesenquimal (sarcomas) y hematológico, por lo tanto involucra distintas mutaciones genéticas y cambios epigenéticos en protooncogenes (genes que normalmente controlan que 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 vía 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 auto dependiente, invadir y evadir la respuesta inmune, y de ésta manera formar tumores (American Cancer Society, 2018). Las 10 características comunes que posee el cáncer son:

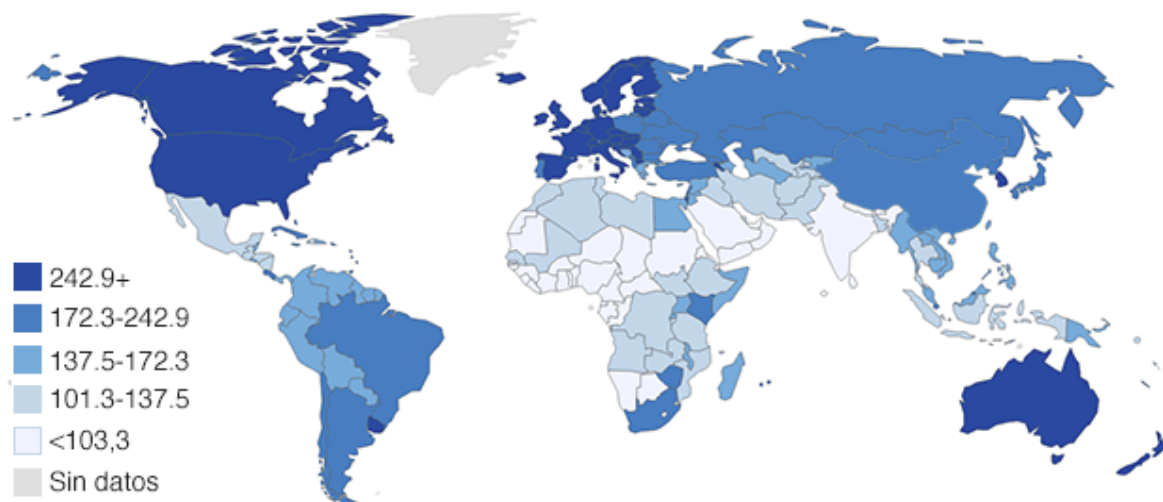
- Angiogénesis mantenida
- Auto-suficiencia en señales de crecimiento
- Capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis
- Desregulación de la energía celular
- Evasión de la apoptosis
- Evasión de la destrucción del sistema inmune
- Inestabilidad del genoma y mutaciones
- Inflamación que promueve tumores
- Insensibilidad a inhibidores del crecimiento
- Potencial replicativo ilimitado

Estas características no dependen del tipo de célula , la ubicación de la célula y la aversión genética. Y llevan a la evidencia de que los cambios del genoma son adquiridos directa o indirectamente. La inestabilidad genómica lleva a considerar, que los tumores poseen una composición compleja de tejido con distintos tipos de células que participan en interacciones por una competencia distintiva por los escasos recursos del microambiente celular (Hannahan 2011; Ahmed 2017).

La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año. En nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar. De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que en los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes (Figura 2.1)(WHO, 2010).

Incidencia de cáncer en el mundo*

Hombres y mujeres combinados



Fuente: Globocan, 2012 | * todos los tipos de cáncer menos cáncer de piel no melanoma
Tasa estandarizada por edad por cada 100.000 habitantes

Figura 2.1: Incidencia de cáncer en el mundo (GLOBOCAN 2012)

2.2. Cáncer cervical

Cáncer que se desarrolla en los tejidos del cuello del útero, es decir en la abertura de la matriz. Se presenta entre mujeres con una vida sexual activa, se considera una enfermedad multifactorial de transmisión sexual aunque no exclusiva, cuyo principal agente etiológico es el Virus del Papiloma Humano (VPH) (Zur Hausen, 1994; Lizano y Garcia, 1997), las células del cuello uterino empiezan a multiplicarse de manera anormal, sin embargo, estas modificaciones pre-cancerosas o pre-malignas pueden desaparecer naturalmente sin causar problemas (WHO, 2014).

2.2.1. Clasificación FIGO

El sistema FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) (Cuadro 2.1) se utiliza más a menudo para los cánceres de los órganos reproductores femeninos, incluyendo el cáncer de cuello uterino. Para el cáncer de cuello uterino, se usa la etapa clínica la cual se basa en los resultados del examen físico del médico, biopsias, pruebas por imágenes y algunas otras pruebas que se realizan en algunos casos, tales

Estadios	Características
Estadio I:	El estadio I es el carcinoma estrictamente limitado al cérvix.
Estadio IA	Carcinomas invasivos sólo diagnosticados por microscopio.
Estadio IA1	Invasión medida del estroma 3 mm o menos de profundidad.
Estadio IA2	Invasión medida del estroma mas de 3 mm.
Estadio IB1	Lesiones clínicas 4 cm o menos de tamaño.
Estadio IB2	Lesiones clínicas con tamaños mayores de 4 cm.
Estadio II	El carcinoma se extiende más allá del cérvix.
Estadio IIA	No hay complicación obvia del parametrio.
Estadio IIB	Complicación obvia del parametrio.
Estadio III	El carcinoma se ha extendido a la pared pélvica.
Estadio IIIA	Sin extensión a la pared pélvica.
Estadio IIIB	Extensión a la pared pélvica.
Estadio IV	El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis.
Estadio IVA	Propagación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.
Estadio IVB	Propagación a órganos distantes.

Cuadro 2.1: Clasificación FIGO Referencia: Classification of malignant tumours. (Sobin y Wittekind 2010)

como la citoscopia y la proctoscopia. No se basa en lo que se encuentra durante la cirugía. Si se hace una cirugía, se puede determinar una etapa patológica a partir de lo que se encuentra en la cirugía; sin embargo esto no cambia su etapa clínica. Su plan de tratamiento se basa en la etapa clínica utilizan tres factores para clasificar:

- La extensión (tamaño) del tumor.
- La propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos adyacentes.
- La propagación (metástasis) a sitios distantes.

2.3. Virus de Papiloma Humano

La familia *Papillomaviridae* tiene 200 tipos de virus del papiloma (VPH), y hasta 170 son los tipos que pueden afectar a los humanos (Villiers, 2013). Se dividen en cinco géneros diferentes, cuyos miembros comparten un tropismo tisular similar (Bernard *et al.*, 2010), aproximadamente 35 pueden infectar la región anogenital

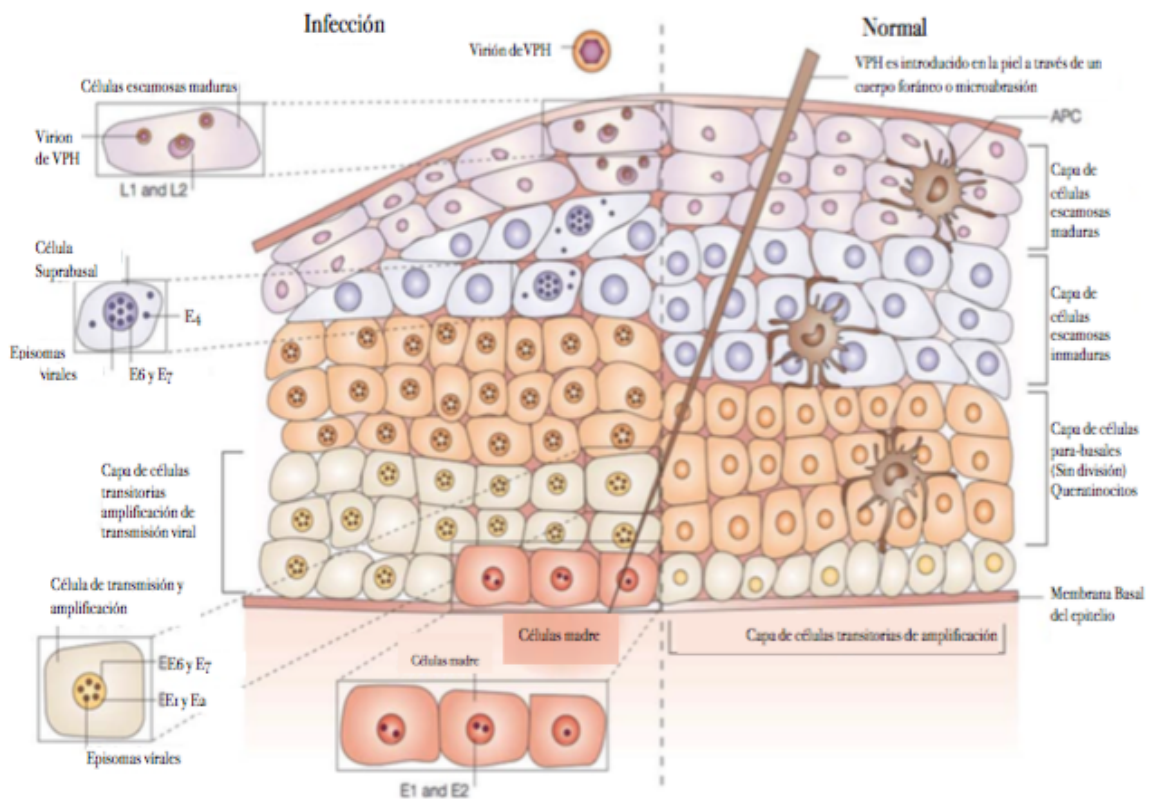


Figura 2.2: Principales eventos de ciclo viral del VPH, el virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -Integrina. Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El DNA viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular. Modificado de (zur Hausen, 2002)

humana. Los tipos de VPH de alto riesgo, sin embargo puede causar cáncer si la infección se vuelve persistente (Rositch *et al.*, 2013). Los virus que causa el cáncer de cuello uterino provienen del género virus del alfa-papiloma (Figura 2.2) (Bernard *et al.*, 2010). Trece tipos anogenitales de VPH se clasifican como hr-VPH; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 están definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de alto riesgo carcinogénico y dos tipos adicionales (68, 73) se clasifican como posiblemente cancerígeno (Doorbar *et al.*, 2012). Los tipos de VPH-16 y -18, se encuentran en aproximadamente el 70 por ciento de todos los cánceres de cuello uterino. En etapas iniciales, el tipo 16 es detectado en aproximadamente el 24 por ciento de las mujeres con infección por el VPH; mientras que el tipo 18 es detectado en aproximadamente el 9 por ciento (Crosbie *et*

al., 2013). El VPH es visto como un factor para desarrollar cáncer de cuello uterino (Muñoz, 2000), el tiempo de incubación es de 3-4 semanas hasta varios años. Un total de 70 por ciento de los cánceres vaginales y 40 por ciento de los cánceres de vulva son causados por infección con VPH (De Vuyst *et al.*, 2009). Algunos de los tipos de VPH se consideran infecciones de bajo riesgo, que generalmente pueden ser resuelto por el sistema inmune del huésped (Lacey *et al.*, 2006).

2.3.1. VPH y carcinogénesis

El VPH posee un ADN bicatenario, donde la estructura está envuelta por una cubierta de dos proteínas en la cápside, concretamente *L1* y *L2*. También contiene otras seis proteínas son *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* y *E7*, las cuales son necesarias para la replicación del virus, la amplificación del genoma, proliferación y oncogénesis (Munoz *et al.*, 2006).

Los dos principales oncogenes, *E6* y *E7*, están integrados en el genoma de las células, y se regulan y producen las proteínas virales *E6* y *E7* (Doorbar *et al.*, 2012). Apuntan a dos reguladores celulares principales, el primero es pRB (proteína de retinoblastoma), que causa una proliferación celular descontrolada cuando *E7* está ligado a ella, el segundo es p53, que está obligado a *E6*, y este complejo causa la pérdida de la reparación del ADN y evita que la célula entre en apoptosis (Moody y Laimins, 2010) (Figura 2.3).

Genoma del VPH

Se caracteriza por una molécula circular de DNA de doble cadena de 8Kb de tamaño, se divide en tres regiones: la región LCR que no tiene marco de lectura, y dos regiones codificante para proteínas *L* y *E*. Las *L* (nombradas así por la palabra en ingles “lately”) son sintetizadas tardíamente y son para la composición de la cápside 13. Las *E* (nombradas así por la palabra en ingles “early”) su síntesis inicia temprano y son las que tienen mayor efecto biológico en la célula hospedera. Se han caracterizado 8 proteínas *E*, de *E1* a *E8*, son responsables de la transformación, proliferación, evasión y edición del sistema inmune, replicación e inmortalizar células

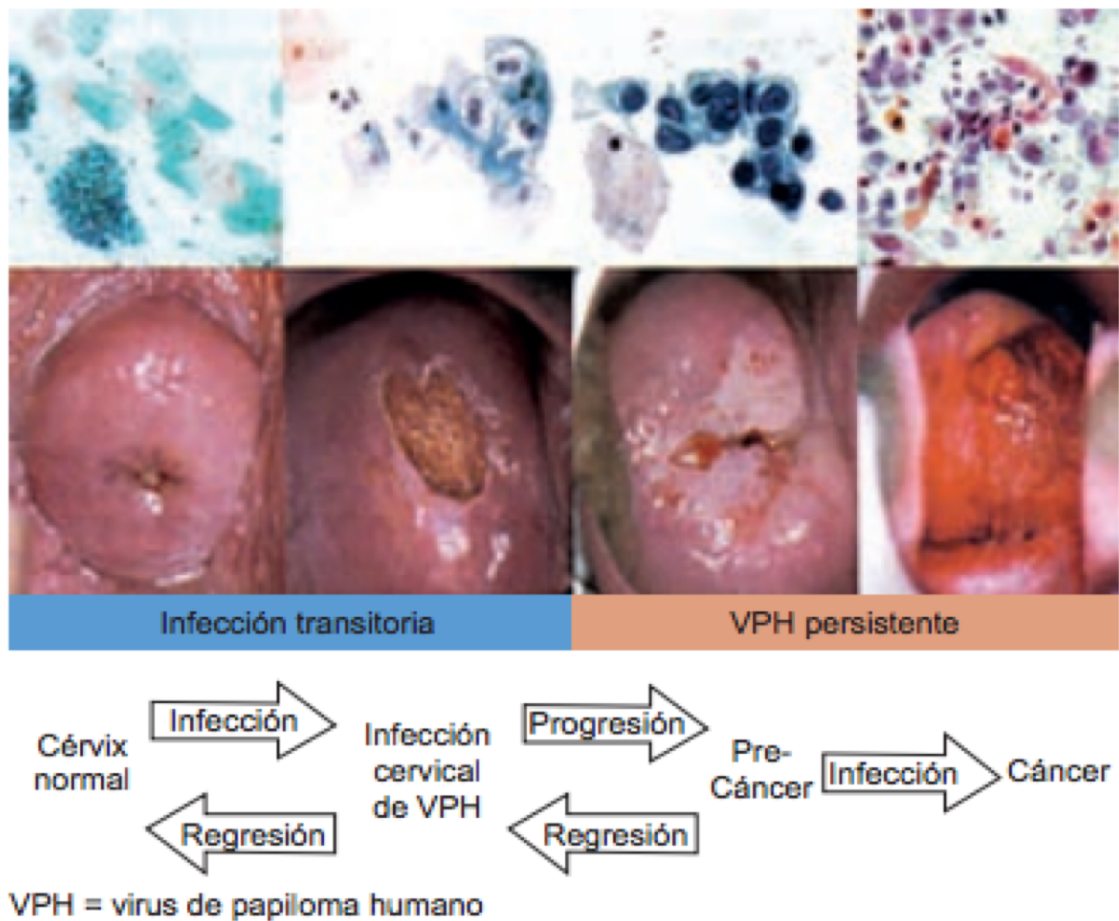


Figura 2.3: Etapas en el desarrollo del cáncer cervical, fuente: (Schiffman *et al.*, 2007)

originando cáncer cervicouterino. (Koutsky *et al.*, 2002; Andersson , Rylander *et al* 2001). Estructuralmente, los VPH son pequeños (aproximadamente 50 nm de diámetro), aunque el genoma viral puede variar ligeramente entre los diferentes tipos de VPH (Figura 2.4). La cápside del virus esta formada por dos proteínas *L1* y *L2*; la proteína *L1* es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes. La proteína *L2* es un componente menor del virón y se cree que puede estar presente en el centro de los capsómeros pentavalentes en los vértices del virón. La proteína *L2* interviene en la entrada del virus a las células, en la localización de los componentes virales en el núcleo, en la unión al ADN, en la formación de la cápside y en la estabilidad. La expresión de genes virales es mínima y en particular, la expresión

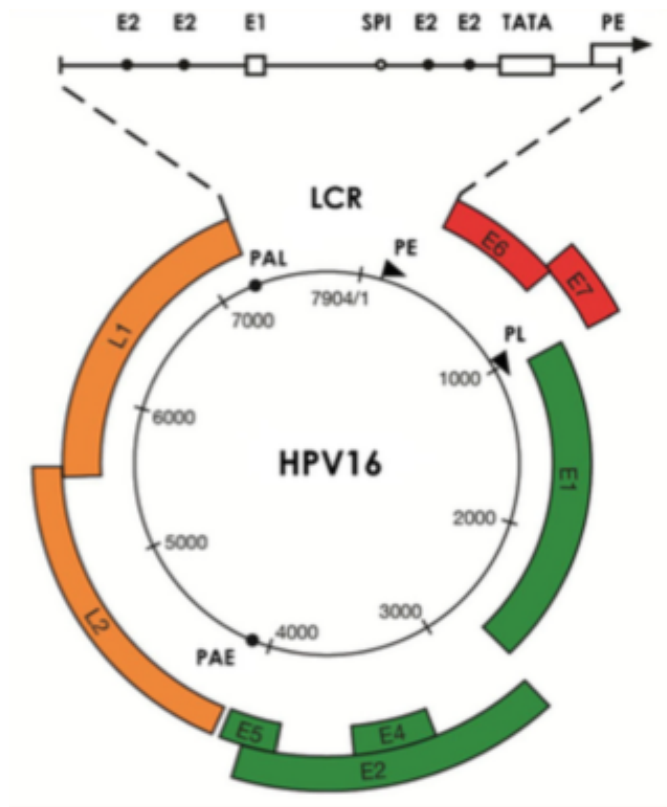


Figura 2.4: Genoma Viral del VPH 16; se muestra las regiones que codifican para proteínas tempranas y tardías, mostrando en rojo las que tienen una acción importante en la transformación celular y la generación del CaCu (Doorbar *et al.*, 2012).

de los oncogenes *E6* y *E7* están bajo un control muy estricto, y sus proteínas son discretamente detectables (Doorbar *et al.*, 2012; Zaldivar, 2012).

2.3.2. Epidemiología del cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más frecuente de distribución mundial que se presenta en la población femenina, con una estimación de 528 000 casos nuevos, de los cuales aproximadamente el 85 por ciento (450 000 casos) se presenta en los países en desarrollo (Figura 2.5). De acuerdo con estimaciones de la OMS en 2012, la tasa estandarizada a nivel mundial es de 15.2 x 100 mil mujeres, solo por debajo del cáncer de mama (38.9 x 100 mil mujeres). Las tasas con mayor incidencia por CaCu se presentan en las regiones de África, sureste de Asia y las Américas, con intervalo de 30.7, 24.4 y 15.3 x 100 mil mujeres, respectivamente, que comparativamente con otras áreas geográficas de baja frecuencia llegan a ser mayores

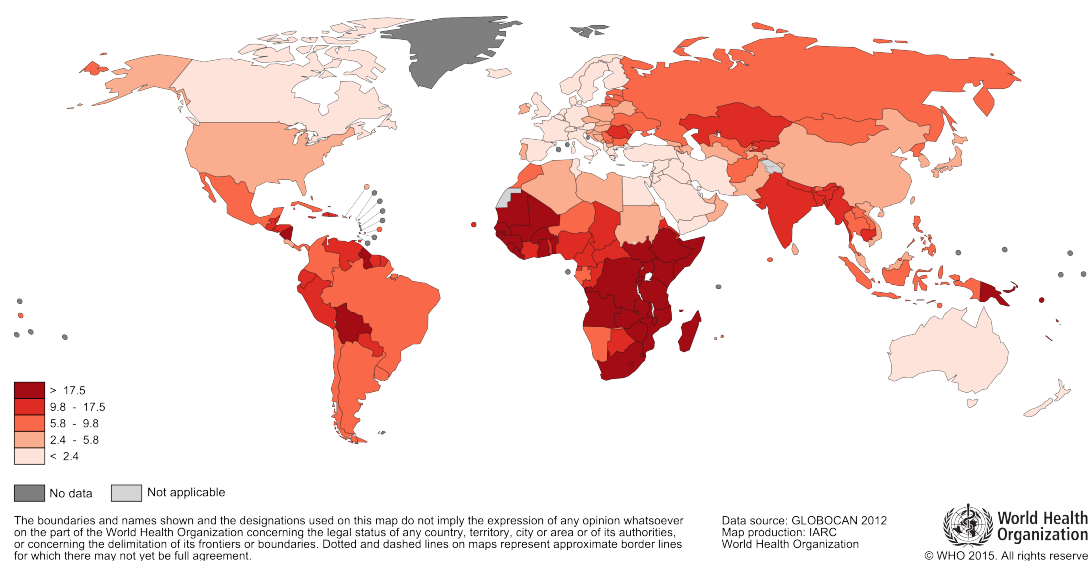


Figura 2.5: Incidencia estimada, mortalidad y prevalencia en todo el mundo en 2012 sobre cáncer cervical , fuente GLOBOCAN 2012

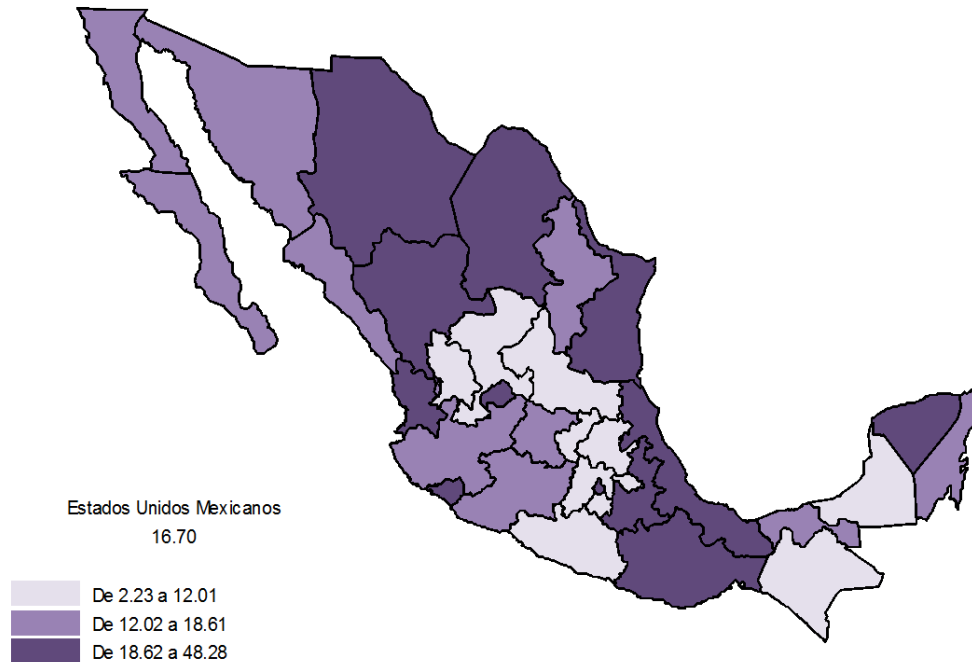
de 1.7 a 3.4 veces .En los países de América Latina el CaCU es el segundo cáncer más común en mujeres(Figura 2.2). Los países con tasas de incidencia mayores de 30 x 100 mil mujeres son Guyana (44.7), Nicaragua (39.9), Honduras (37.8), El Salvador (37.2 x 100 mil), Bolivia (36.4), Paraguay (35.0), Perú (34.5), Venezuela (31.4) y Guatemala (30.5).Solo Chile y Puerto Rico presentan tasas menores de 15 x 100 mil mujeres (14.4 y 7.5, respectivamente).

Cáncer Cervical en México

Anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres. En el año 2013, se registraron 5,405 defunciones en mujeres con una tasa de 16.3 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de mama son Coahuila (24.2), Sonora (22.6) y Nuevo León 22.4), el cáncer del cuello uterino es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, se estima una ocurrencia de 13,960 casos en mujeres, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. En el grupo específico de mujeres de 25 años y más, se registraron 3,771 defunciones en mujeres con una tasa de 11.3 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de cuello uterino son Morelos (18.6), Chiapas (17.2) y Veracruz (16.4) (Figura 2.6).

**Tasa de morbilidad hospitalaria por cáncer cervicouterino según entidad federativa
2009**

Por cada 100 mil mujeres



Nota: La morbilidad hospitalaria corresponde al número de egresos hospitalarios por causa seleccionada.

Fuente: SSA (2010). Base de egresos hospitalarios 2009, y CONAPO (2008). Proyecciones de la Población de México 2005-2050. Proceso INEGI.

Figura 2.6: Incidencia estimada, mortalidad y prevalencia en México sobre cáncer cervical, fuente: IMSS 2010

2.4. Ciclo celular

En las especies unicelulares, como las bacterias y levaduras, cada división celular genera un nuevo organismo completo y en las especies pluricelulares, para producir un organismo funcional se requieren secuencias de divisiones celulares largas y complejas e incluso en el adulto, la división celular es necesaria para reemplazar las células que mueren (Murray, 1993). De hecho cada uno de nosotros debe fabricar muchos millones de células cada segundo simplemente para sobrevivir: si todas las divisiones celulares se detuvieran por ejemplo, por la exposición a grandes dosis de rayos X, moriríamos al cabo de pocos días (Hall, 2004). La fase G1 y G2 son mucho más que meros periodos de espera que permiten crecer a la célula y proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo para así asegurarse de que las condiciones son adecuadas y de que se han completado los preparativos

antes de la fase S y de la mitosis. La fase G1 es especialmente importante a este respecto, su duración puede variar mucho de las condiciones externas y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Por ejemplo, si las condiciones son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase G1 incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado G0 (G cero), en el cual pueden permanecer durante días, semanas, incluso años antes de volver a proliferar (Belletti, 2005). Este proceso (Ciclo celular) va de la mano con otro que tiene que ver con la muerte de las células existiendo en un perfecto equilibrio para la sobrevivencia del individuo y su correcto desarrollo (Murray, 1993).

Proliferación celular

Las células necesitan señales procedentes de otras células, no solamente para proliferar, sino también para sobrevivir. Si se les priva de tales factores de supervivencia, las células activan un programa intracelular de suicidio y mueren por un proceso denominado muerte programada (apoptosis). El hecho de necesitar señales procedentes de otras células para poder sobrevivir ayuda a garantizar que las células sobrevivan sólo cuando y dónde son necesarias. Este control de la división celular es tan solo uno de los eventos que constituyen el ciclo celular (Hall, 2004).

Muerte celular

La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien por que la célula sufrió un daño irreversible y muere por la activación de una serie de mecanismos (Hughes *et al*, 2002).

2.4.1. Apoptosis

Se fundamenta por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos tales como, la fragmentación internucleosomal del ADN, condensación de la cromatina, encogimiento celular y la formación de cuerpos apoptóticos y la aparición de

fosfatidilserina en la lámina externa de la membrana celular, entre otros (Caballero, 2002) (Figura 2.7). En el contexto histórico el término apoptosis (*a-po-toe-sis*) fue utilizado por primera vez en un artículo del momento por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular, aunque ciertos componentes del concepto de apoptosis se habían descrito explícitamente en muchos años antes (Kerr *et al.*, 1972; Paweletz, 2001; Kerr, 2002). "Nuestra comprensión de los mecanismos implicados en el proceso de apoptosis en células de mamíferos surgió de la investigación de la muerte celular programada que ocurre durante el desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans*" (Horvitz, 1999). En este organismo se generan 1090 células somáticas en la formación del gusano adulto, de las cuales 131 de estas células sufren apoptosis o "muerte celular programada". Estas 131 células mueren en puntos particulares durante el proceso de desarrollo, que es esencialmente invariante entre gusanos, demostrando la notable precisión y control en este sistema. Desde entonces, la apoptosis ha sido reconocida y aceptada como un modo distintivo e importante de muerte celular "programada", que implica la eliminación genéticamente determinada de las células. Sin embargo, es importante señalar que se describen otras formas de muerte celular programada y que aún se pueden descubrir otras formas de muerte celular programada (Formigli *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2000; Debnath *et al.*, 2005). La apoptosis también se produce como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos (Norbury y Hickson, 2001). Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células necesariamente morirán en respuesta al mismo estímulo. También está la cuestión de distinguir la apoptosis de la necrosis, dos procesos que pueden ocurrir de forma independiente, secuencial y simultánea (Hirsch, 1997; Zeiss, 2003). Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados

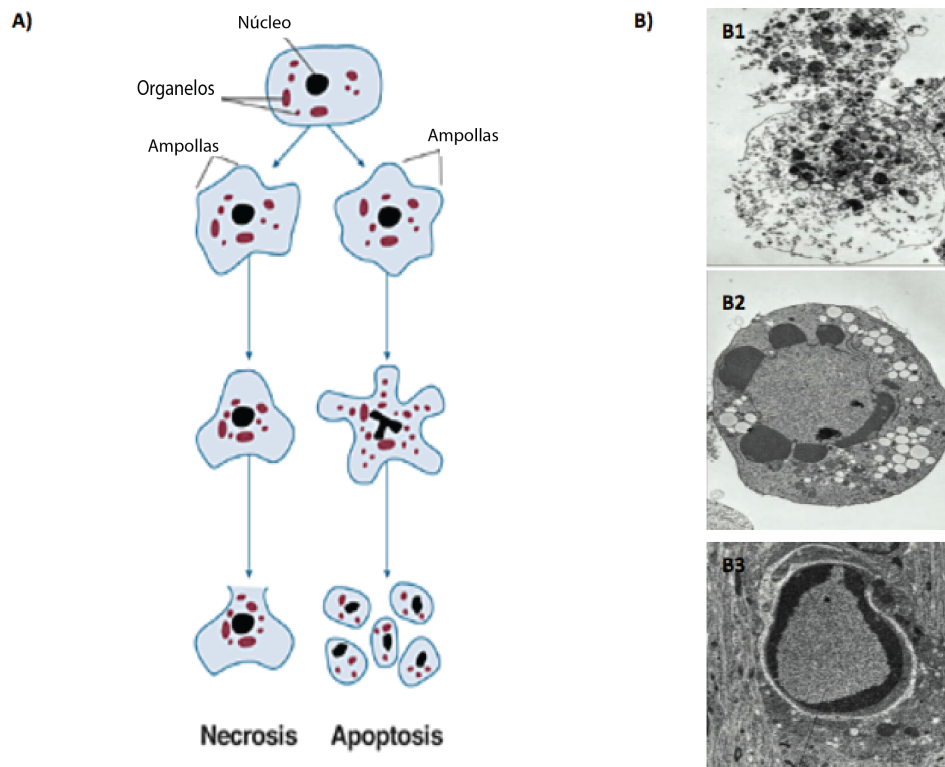


Figura 2.7: A) Los dos las vías fundamentales de muerte celular descritas por Kerr *et al.* 1972. B) Transmisión microscopía electrónica de células necróticas y apoptóticas. B1) Célula necrótica sometida a organelos hinchazón, lisis celular y liberación de contenido intracelular en el ambiente circundante. B2) Célula apoptótica con diversas vesículas encerradas en la membrana. B3) Una célula apoptótica para limpiar (se tomaron imágenes microscópicas de la tesis Dr. A-L MahulMellier)

por macrófagos o incluso por células vecinas. En el programa de suicidio celular interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio inhibiendo tanto la transcripción como la traducción (Figura 2.8). Estos hechos demuestran que la muerte celular programada o apoptosis está mediada por mecanismos celulares intrínsecos (Acehan, 2002).

2.4.2. Apoptosis en cáncer

La capacidad de las células para evadir la apoptosis surge de la desregulación de ambas, la maquinaria celular implicada en la detección de estímulos intracelulares y extracelulares, así como las vías de señalización implicadas en la ejecución real de la apoptosis. Por ejemplo, una molécula que es el tema de extensas investigaciones

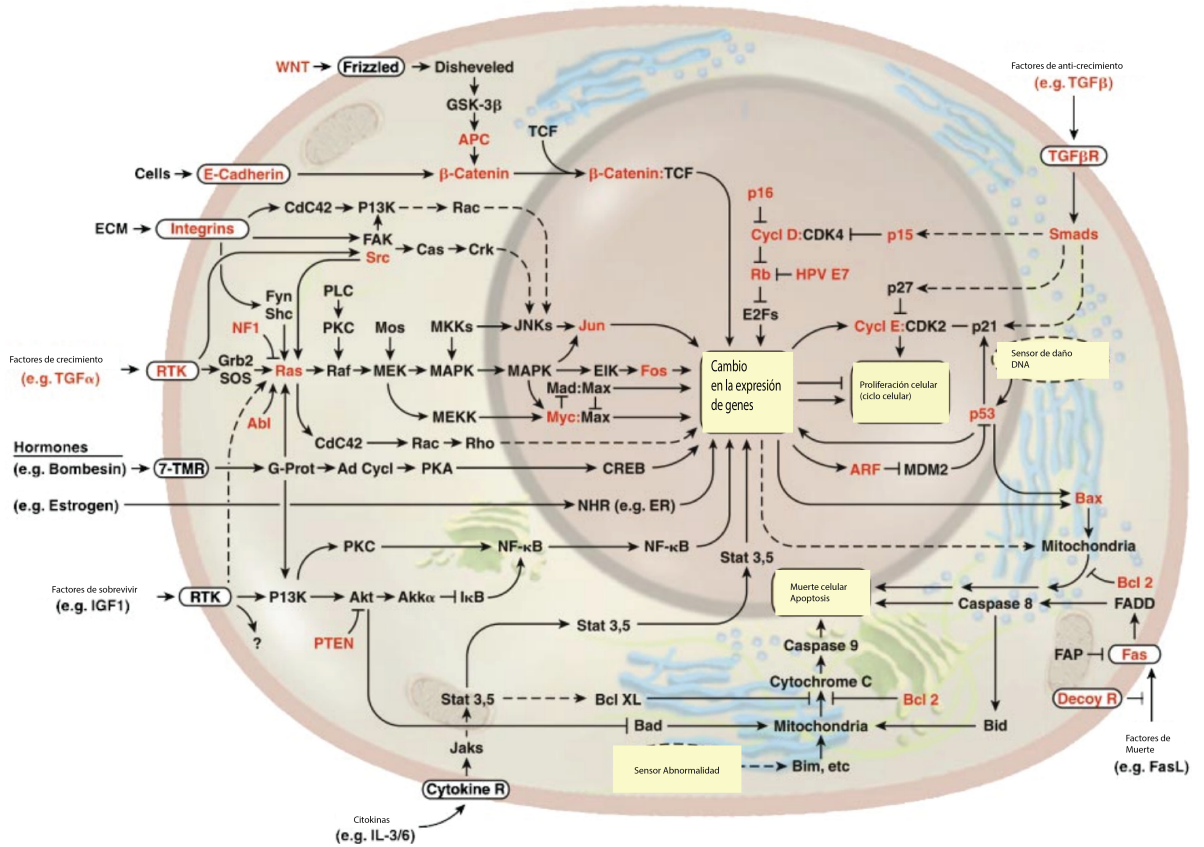


Figura 2.8: El circuito integrado emergente de la célula adaptado de (Hanahan y Weinberg 2000)

en este contexto es p53. La proteína supresora de tumores p53 ha demostrado ser crítica para la patogénesis del cáncer, la agresividad de los tumores así como su probabilidad de resistencia a la quimioterapia antiproliferativa convencional (Fisher 1994; Levine 1997). En consecuencia, las mutaciones en el gen p53 se producen en aproximadamente 55 por ciento a 70 por ciento de los cánceres humanos (Levine y Oren 2009). Fisiológicamente, p53 y su modulador MDM2 (minuto doble murino) son responsables de inducir la detención del ciclo celular en respuesta al daño del ADN y activar las funciones de reparación del ADN. Por lo tanto, las mutaciones en p53 conducen a la inestabilidad genómica y la detención ineficaz del ciclo celular en respuesta al daño del ADN. El p53 actúa como un factor de transcripción y activa la expresión de diversos genes inductores de apoptosis. Estos incluyen la expresión de genes que generan radicales libres o la regulación positiva de miembros de la

familia Bcl-2 proapoptótica (Polyak *et al.*, 1997) y, por lo tanto, dan como resultado la inducción de apoptosis a través de la ruta mitocondrial. También se han descrito mecanismos de inducción de la apoptosis independientes de la transcripción por p53, tales como la inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa formando complejos con las proteínas protectoras de la familia Bcl-2 (Erster *et al.*, 2003). Otro descubrimiento que vincula la inducción de apoptosis desregulada a la formación de cáncer es la capacidad de diversos oncogenes, tales como Bcl-2 o Myc (Harris *et al.*, 1990), para inhibir la apoptosis. En conclusión, el bloqueo inherente de los programas de muerte celular (requeridos para la oncogénesis y la progresión tumoral) por un lado, y la necesidad terapéutica de reactivar dichos programas por otro lado, presenta un desafío formidable en la oncología clínica (Thompson, 1995). Las mutaciones en los genes directa o indirectamente implicados en la reducción de la apoptosis se correlacionan con un mal pronóstico ya, que la efectividad de la mayoría de los agentes antineoplásicos depende de desencadenar apoptosis en células cancerosas. Esto también implica que durante el tratamiento contra el cáncer, las células tumorales se seleccionan potencialmente para reprimir el programa de apoptosis (Figura 2.9).

Esta selección da como resultado la resistencia a la quimioterapia adquirida, lo que representa un gran desafío en el tratamiento clínico de la enfermedad recurrente resistente a los medicamentos (Sordet *et al.*, 2004).

2.5. Tratamientos contra el cáncer

Los fármacos quimioterapéuticos se utilizan ampliamente para el tratamiento del cáncer, centrándose en las células de crecimiento rápido y promoviendo la muerte celular. Sin embargo, según sus características estructurales, actúan a través de diferentes mecanismos (Figura 2.10). Por ejemplo, el cisplatino se une al ADN y causa la inhibición de la síntesis de ADN y la división celular (Huang *et al.*, 2003).

La quimioterapia y la radioterapia, los tratamientos convencionales contra el cáncer que se usan hoy en día, son costosos y causan muchos efectos secundarios, incluidos vómitos menores, alopecia, diarrea, estreñimiento y una mayor mielo

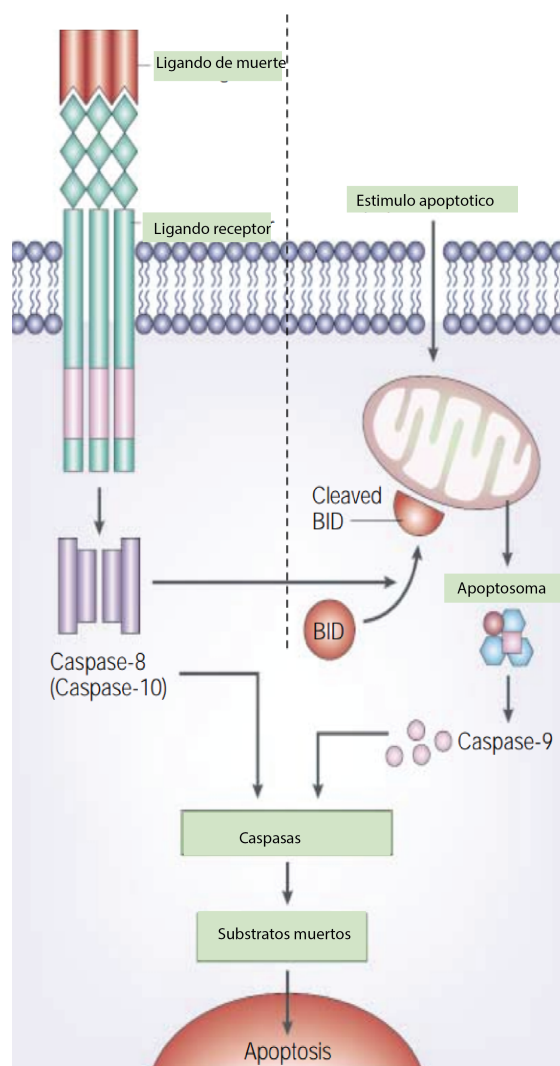


Figura 2.9: Las dos principales vías de señalización apoptótica Adaptada de (Igney y Krammer, 2002)

supresión, toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal. Todos estos efectos secundarios reducen la calidad de vida y desalientan a los pacientes a observar protocolos de medicación que luego conducen a la progresión del cáncer y las complicaciones relacionadas. Además, muchos de estos tratamientos presentan una actividad anticancerígena limitada (Mans *et al.*, 2000). Aproximadamente el 60 por ciento de los medicamentos utilizados para el tratamiento del cáncer se han aislado a partir de productos naturales (Gordaliza, 2007) y el reino vegetal ha sido la fuente más importante. Estos incluyen alcaloides *Vinca*, *Taxus diterpenes* alcaloides de *Camptotheca* y *Podophyllum lignans*. Actualmente, se están probando 16 nuevos

Tipo de Fármaco	Mecanismo de acción	Ejemplos
Agentes Alquilantes	Deterioran la función de células mediante la formación de enlaces covalentes en las proteínas ADN Y ARN	Cisplatino Carboplatino Ciclosfosfamida
Anti-Metabolitos	Análogos de los metabolitos presentes en la naturaleza implicados en la síntesis de ADN y ARN, debido a esta similitud interfieren en el metabolismo normal de la célula.	5-Fluorouracilo Metotrexato Pemetrexed Gemcitabina
Intercalantes	Se intercalan en secuencias específicas de ADN, causan la formación de radicales libres provocando ruptura de la cadena.	Bleomicina Antraciclinas
Inhibidores de la topoisomerasa	Inhibe la topoisomerasa I y II, necesarios para desenrollar el ADN durante la replicación.	Irinotecán Topotecán Etopósido
Fármacos de unión de a la tubulina	Previene la formación de microtubulos, importantes durante la mitosis, forma celular y transporte intracelular	Vincristina Vinorelbina Paclitaxel

Figura 2.10: Clasificación de Tratamientos fármaco quimioterapéuticos (Tomada y modificada de Caley A. 2012)

compuestos derivados de plantas en ensayos clínicos y de estos 13 se están probando en la fase I o II, y 3 están en fase III. Entre estos compuestos, el flavopiridol, aislado del árbol indio *Dysoxylum binectariferum*, y el mesoindigo, aislado de la planta china *Indigofera tinctoria*, han mostrado efectos anticancerígenos con menor toxicidad que los fármacos convencionales (Figura 2.11) (Saklani y Kutty, 2008).

2.5.1. Endófitos

La palabra endófito etimológicamente significa dentro de la planta (*endon*: dentro, *phyton*: planta). En 1995 Wilson restringió el termino únicamente a microorganismos, refiriéndose solo a bacterias y a hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedadora (Wilson 1995). Actualmente este termino se refiere a bacterias, hongos, algas e insectos (Tan, 2001; Rodriguez, 2009). Los hongos endófitos 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-benéfico (Kusari *et al.*, 2012). Los endofitos producen compuestos bioactivos y es interesante que ocasionalmente producen esos compuestos,

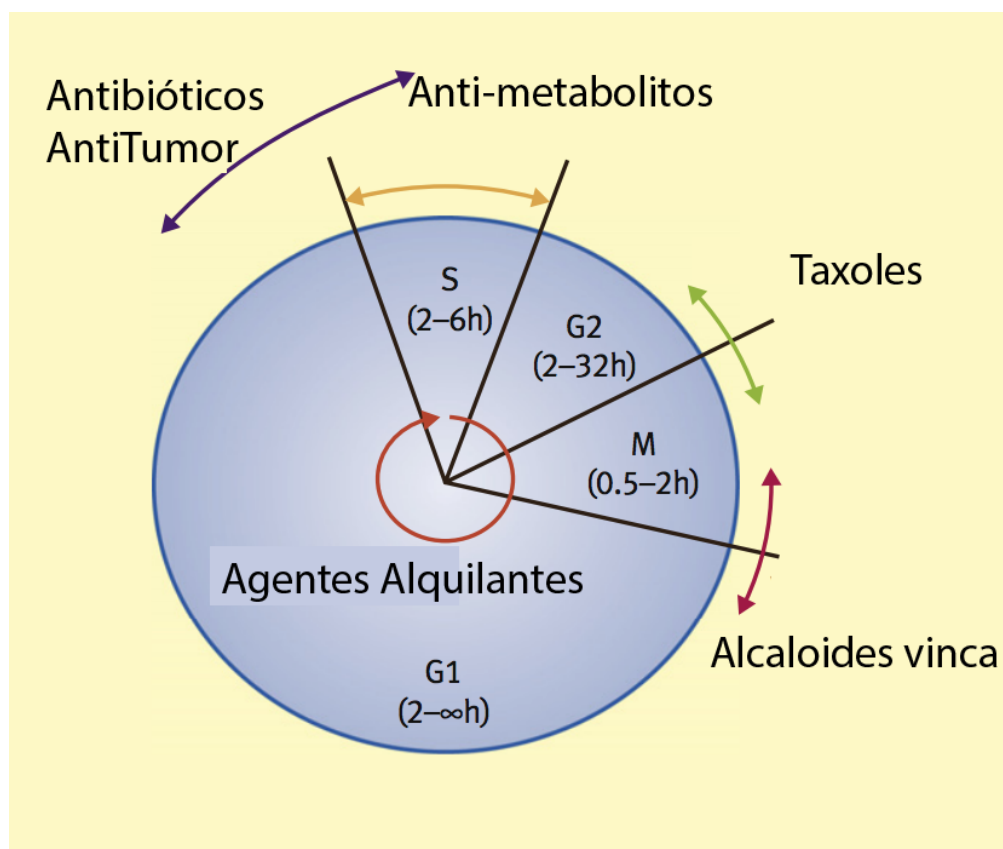


Figura 2.11: Ciclo celular en fármaco quimioterapéuticos (Tomada y modificada de Caley, 2012)

que son sabido son producidos por su hospedador. Algunos anticancerosos endófitos metabolitos secundarios son, camptotecina de *Entrophosphora infrequens*, que es un hongo endofítico de la corteza de la planta de *Nothapodytes foetida* (Puri *et al.*, 2005), vinca alcaloide vincristina aislada de *Fusarium oxysporum*, que es un endófito para plantar de *Catharanthus roseus* (Gueritte y Fahy 2005). Hay un informe que el Taxol es producido por el endófito del tejo Noroeste del Pacífico (Stierle *et al.*, 2000). Los químicos y fitoquímicos de los productos naturales siempre han quedado impresionados por el hecho de que los compuestos que se encuentran en la naturaleza muestran un rango casi increíble de diversidad en términos de sus estructuras y propiedades físicas y biológicas, la mayoría de estos compuestos son metabolitos secundarios cuyas funciones en las plantas, hongos y organismos marinos todavía no se conocen ampliamente. Actualmente, se cree que muchos de estos compuestos actúan en defensa contra los efectos nocivos de toxinas, carcinógenos o mutágenos

que se encuentran en la planta (Williams y Stone 1989) o el ataque de depredadores externos (Wall 1961). Algunos metabolitos secundarios pueden tener un excelente potencial terapéutico. Ejemplos de ello son la camptotecina (Wall; Wani, 1966) y el taxol (Wani y Taylor, 1971), que se encuentran en bajas concentraciones, respectivamente, en la corteza de *Camptotheca acuminata* y *Taxus brevifolia*.

También puede ser cierto que ha disminuido el interés en productos naturales para su uso en el desarrollo de fármacos como resultado de que la gente se cansa de lidiar con las fuentes tradicionales de compuestos bioactivos, incluidas las plantas de las zonas templadas y los microbios de una plétora de suelos muestras reunidas en diferentes partes del mundo por ejércitos de coleccionistas. En otras palabras, ¿Por qué hacer algo diferente (trabajando en las micro bandas endofíticas) cuando los robots, la química combinatoria y la biología molecular han llegado a la escena? Además, la lógica y la justificación del tiempo y el esfuerzo invertidos en el descubrimiento de fármacos utilizando un enfoque dirigido al sitio objetivo han sido abrumadores. Mientras que la síntesis combinatoria produce compuestos al azar, los metabolitos secundarios, definidos como compuestos de bajo peso molecular no requeridos para el crecimiento en cultivo puro, se producen como una adaptación para funciones específicas en la naturaleza (Demian, 1981). Schutz señala que ciertos metabolitos microbianos parecen ser característicos de ciertos biotopos, tanto a nivel ambiental como a nivel del organismo. En consecuencia, parece que la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios debería centrarse en organismos que habitan biotopos únicos. Por lo tanto, le corresponde al investigador estudiar cuidadosamente y seleccionar la fuente biológica antes de proceder, en lugar de tener un enfoque totalmente aleatorio en el material de origen biológico. Un estudio cuidadoso también indica que los organismos y sus biotopos que están sujetos a interacciones metabólicas y ambientales constantes deben producir incluso más metabolitos secundarios (Schutz, 2001). Las endofitas son microbios que habitan en dichos biotopos, es decir, plantas superiores, por lo que actualmente se consideran una fuente de nuevos metabolitos secundarios que ofrecen el potencial para la explotación médica, agrícola y / o industrial. Actualmente, los endófitos son vistos

como una fuente excepcional de productos naturales bioactivos porque hay muchos de ellos que ocupan literalmente millones de nichos biológicos únicos (plantas superiores que crecen en muchos entornos inusuales). Por lo tanto, parece que estos factores biotípicos pueden ser importantes en la selección de plantas, ya que pueden gobernar la novedad y la actividad biológica de los productos asociados con microbios endofíticos. Desde el descubrimiento de los endófitos en Darnel, Alemania, en 1904 (Tan, 2001).

Productos fúngicos endófitos como agentes anticancerígenos

El paclitaxel y algunos de sus derivados representan el primer grupo principal de agentes anticancerígenos producido por endófitos. El paclitaxel, un diterpenoide altamente funcionalizado, se encuentra en cada una de las especies de tejo del mundo (*Taxus*) (Suffness, 1995). El modo de acción de paclitaxel es evitar que las moléculas de tubulina se despolimericen durante los procesos de división celular (Schiff, y Horowitz. 1980). También se usa para tratar varias otras enfermedades humanas que proliferan en los tejidos. La presencia de paclitaxel en especies de tejo llevó al estudio de sus endófitos. En el contexto histórico se descubrió un nuevo hongo endofítico productor de paclitaxel, *T. andreanae*, en *T. brevifolia* (Strobel, y Stierle 1993). En 1994 Patel y colaboradores, reportaron la semisíntesis del paclitaxel a partir de la 10-deacetil-baccatina III, obtenida de hojas de árboles de *Taxus brevifolia*, y en ese mismo año, la compañía BMS, comercializó la producción de paclitaxel por este método (Paterl, 1998). La síntesis total del paclitaxel, la reportaron dos grupos de investigación en 1994, pero no fue factible su producción comercial, debido a sus bajos rendimientos y numerosos pasos de síntesis orgánica (Holton *et al.*, 1994; Nicolaou *et al.*, 1994). Debido a la continua del mercado en crecimiento, la producción industrial actual de taxol por semi-síntesis consume gran cantidad de árboles *Taxus* no puede cumplir con los requisitos del mercado (Ji *et al.*, 2006). Científicos de todo el mundo estudian la producción de paclitaxel en varias plataformas, incluida la síntesis química, células vegetales y cultivo de tejidos (Figura 2.12).

Año	Evento	Referencia
1856	Lucas obtuvo taxina de <i>Taxus baccata</i>	Baloglu E., 2001
1956	Graf purificó taxina A, taxina B y taxina C de taxina	Yuan H., 1998
1960	National Cancer Institute- Agricultural Department USA, iniciaron búsqueda de extractos naturales con actividad antitumoral	Cragg G. M., et al., 1993
1962	Arthur Barclay recolectó muestras de <i>Taxus brevifolia</i>	Patel R. N., 1998
1964	Wall confirmó la citotoxicidad de extracto de corteza de <i>Taxus brevifolia</i> sobre células KB del carcinoma nasofaríngeo	Wall M. E., 1998; Zubrod C. G., et al, 1966
1967	Wall y Wani aislaron el compuesto activo de <i>Taxus brevifolia</i>	Wani M. C., et al. 1971
1971	Wall y Wani publicaron la estructura del paclitaxel	Wani M. C., et al. 1971
1980	Horwitz propuso el mecanismo de acción del paclitaxel	Horwitz S. B., et al., 1982
1989	Publicación de la pruebas clínicas del paclitaxel	Mc. Guire W. P., et al., 1989
1989	Primera publicación de paclitaxel a partir de cultivo de células de <i>T.brevifolia</i>	Christen A. A., et al, 1989
1991	Christen obtuvo 1-3 mg/L de paclitaxel de cultivo de células de <i>T.brevifolia</i>	Christen A. A., et al US Patent 50 19504, 1991
1992	Bristol-Myers Squibb recibió autorización de la FDA para la comercialización de paclitaxel para uso en cáncer de ovario	Wall M. E., 1998
1993	Stierle y Strobel aislaron el hongo <i>Taxomyces andreanae</i> de <i>Taxus brevifolia</i> que producía de 24-25 ng/L de paclitaxel	Stierle A., et al., 1993
1993	Bringi V., et al., obtuvo 153 mg/L de paclitaxel en 42 días en cultivos de <i>Taxus chinensis</i>	Bringi V., et al., 1993
1994	Semisíntesis del paclitaxel a partir del 10-Deacetil-baccatina III, obtenido de hojas de árboles de <i>Taxus brevifolia</i>	Chauviere G., et al., 1981; Senih V., et al, 1984; Patel R. N., 1998
1994	Síntesis total de paclitaxel por los grupos de Holton y Nicolaou	Holton R. A., et al., 1994; Nicolaou K. C., et al., 1994
1994	ESCAgenetic y Phyton, USA, cultivaron células de <i>Taxus brevifolia</i> en reactores de 2500 y 75000 L, respectivamente.	Smith M. A. L., 1995
1996	La FDA aprobó el uso de docetaxel, análogo de paclitaxel en cancer de mama (Adventis)	Engels F. K., et al., 2005
1996	Page M., et al., reportaron la producción de 0.2 a 1 µg/L de paclitaxel en la bacteria <i>Sphingomonas taxi</i> aislada de <i>T. candiense</i>	US Pat, 5,561,055,1996
1996	Strobel, obtuvo 60 -70 µg/L de paclitaxel en el hongo <i>Pestalotiopsis microspora</i> aislada de <i>Taxus wallachiana</i>	Strobel G. A., et al., 1996(a)
1996	Yukimune, reportó una producción de 115.2 mg/L de paclitaxel en 2 semanas de cultivo de células de <i>Taxus media</i>	Yukimune Y., et al., 1996
2001	La compañía Samyang genes, Corea, comercializó la producción de paclitaxel de cultivo de células vegetales.	Zhong J. J., 2002
2005	Zhou reportó la producción de 418 µg/ de paclitaxel, en una cepa mutada del hongo <i>N. silviforme</i> proveniente de <i>Taxus cuspidata</i>	Zhou D., et al., 2005
1997-2007	Walter, Croteau, Chang, Jennewein han hecho progresos relevantes en la elucidación de la biosíntesis de paclitaxel en <i>Taxus</i>	Ketchum R. E. B., et al., 1999; Croteau R. B., 2006; Nims E., et al., 2006

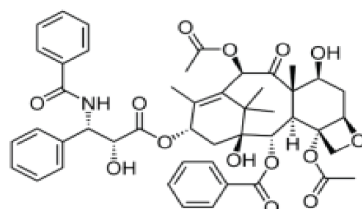


Figura 2.12: Principales acontecimientos históricos del paclitaxel. Estructura química del Taxol®. Es una estructura compleja en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6 y 8 y 6 carbonos polisustituidos con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas. La molécula posee un total de 11 estereocentros (Flores, 2009).

Se establece el escenario para un examen más completo de la capacidad de otras especies de *Taxus* y otras plantas para producir endofitos que producen paclitaxel. Algunos de los endófitos más comunes de los tejos del mundo son *Pestalotiopsis spp.* (Strobel y Yang 1996). Una de las especies endófitas más comúnmente aisladas es *P. microspora* (Strobel, 2002). Un examen de los endófitos de *Taxus wallichiana* produjo *P. microspora*, y una prueba preliminar de anticuerpos monoclonales indicó que podría producir paclitaxel (Strobel y Yang 1996). Después de la cromatografía de capa fina preparativa, se aisló un compuesto y se demostró mediante técnicas espectroscópicas que era paclitaxel. El paclitaxel marcado (14C) fue producido por este organismo a partir de varios precursores 14C que se le habían administrado (Strobel y Yang 1996). Además, se obtuvieron otros aislamientos de *P. microspora* del ciprés calvo en Carolina del Sur y también se demostró que producen paclitaxel (Li y Strobel, 1996). Esta fue la primera indicación de que los endófitos que residen en plantas distintas de *Taxus spp* estaban produciendo paclitaxel. Por lo tanto, se realizó una búsqueda específica para endofitos productores de paclitaxel en continentes no conocidos para ningún *Taxus spp* .Por lo que se están realizando esfuerzos para determinar la viabilidad de hacer que el paclitaxel microbiano sea una posibilidad comercial (Lee, y Strobel, 1996).

2.5.2. Genero *Taxus*

Los árboles del género *Taxus* son dioicos, robustos y su follaje verde oscuro se mantiene durante todo el año y puede llegar hasta los 15 ó 20 metros de altura. Su crecimiento es muy lento, necesitan aproximadamente 100 años para que su tronco alcance los 25 cm de diámetro y alcanzar 9 metros de altura, solo árboles de este tamaño y longevidad pueden ser utilizados para extraer de su corteza interna sus principios activos (Hartzell, 1991). La floración se da entre finales de invierno y principios de primavera, principalmente de marzo a abril, la simillas sin ala, ovoides u oval-ovoides de 5-7 mm de largo por 4 mm de ancho, de color café, con el ápice apiculado, cubiertas parcialmente por un tejido carnoso de color rojo y

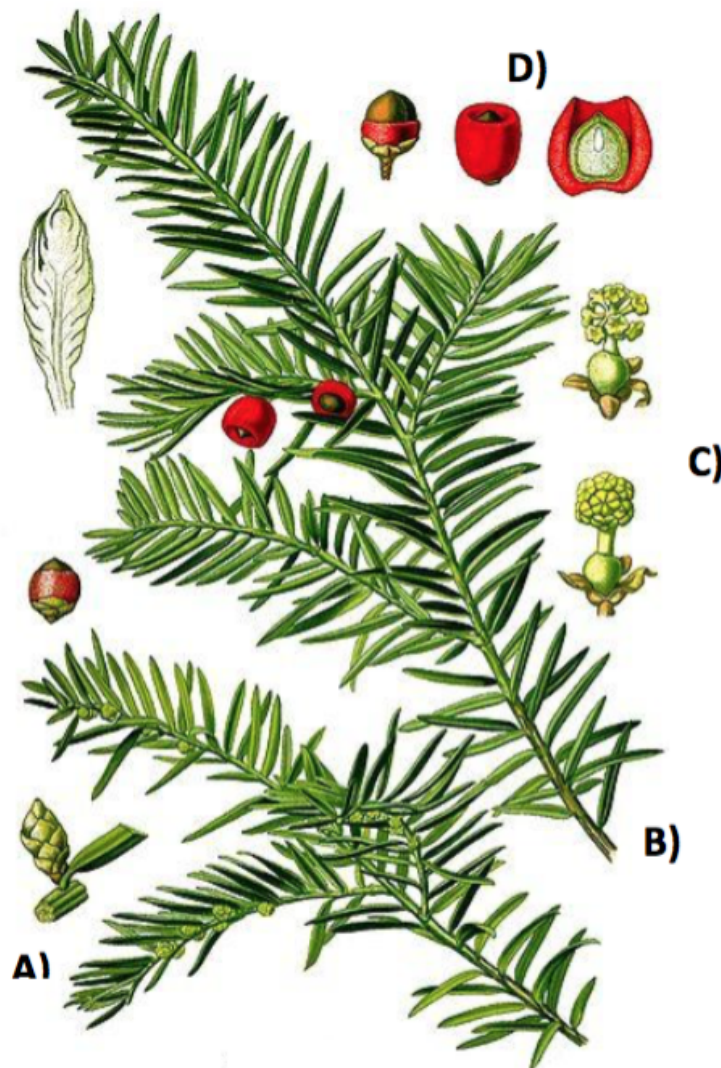


Figura 2.13: Características morfológicas de las ramas de los árboles del género *Taxus* A) Ramas con estróbilos, B) Segmento de una rama femenina con semillas, C) Estrobilos y D) Semillas cubiertas por un arilo carnoso de color rojo (Soca Chafre *et al.*, 2011).

recibe el nombre de arilo que a excepción del tallo, hoja y la corteza no es toxica (Zambudio-Ruíz, 1992; Appendino, 1994) (Figura 2.13).

2.5.3. *Taxus globosa*

Taxus globosa (*Taxaceae*, Coniferales), el tejo mexicano, se encuentra esporádicamente en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México, a través de la cuenca del Golfo de México y el Eje Transversal Neovolcánico tan al sur como Honduras (Shemluck *et al.*, 2003). La especie es parte de la flora diversa de la Reserva

de la Biosfera Sierra Gorda (SGBR), una de las áreas naturales protegidas más importantes de México (www.sierragorda.net). *Taxaceae* se considera amenazado y consecuentemente protegido por la ley ambiental mexicana. Varias especies de *Taxus* son fuentes conocidas de paclitaxel (Taxol), un diterpeno con amplia actividad antitumoral que es particularmente eficaz contra los cánceres de mama y de ovario (Arbuck y Blaylock 1995). Sin embargo, los árboles *Taxus* crecen lentamente y se necesitan grandes cantidades de corteza para obtener una pequeña cantidad de la droga (Wall y Wani 1995). Por lo tanto, las fuentes alternativas de paclitaxel se han explorado activamente durante los últimos 20 años, incluida la búsqueda de microorganismos productores de paclitaxel (Strobel *et al.*, 1996a). Los hongos endófitos son fuentes bien conocidas de diversos metabolitos secundarios biológicamente activos, con una serie de aplicaciones como productos farmacéuticos (Strobel *et al.*, 1996a, Strobel y Daisy 2003, Schulz y Boyle 2005, Liu *et al.*, 2009, Qi *et al.*, 2009). Desde el descubrimiento de *Taxomyces andreanae*, un hongo endofítico productor de paclitaxel aislado de *Taxus brevifolia* (Stierle *et al.*, 1993), se han aislado otros hongos con esta misma capacidad de diferentes especies de *Taxus*, incluyendo *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* y *Pithomyces* (Strobel *et al.*, 1996a, Zhang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009).

2.5.4. *Trichophaea sp. cepa* (SGLAf01)

Las especies del género *Trichophaea* generalmente crecen en suelos erosionados o quemados, humus y en restos de madera en descomposición (Doveri, 2011). La temperatura de crecimiento de *Trichophaea spp* aisladas de suelos quemados se encuentra en un rango de los 35 - 42 °C con un rápido crecimiento a partir de los 40 °C (Simonovicova *et al.*, 2014). En 1958 Kanouse distinguió 10 especies del género *Trichophaea* basándose en el tamaño y la unión de los pelos excipulares, así como la forma y el tamaño de las esporas (Wu y Kimbrough 1996). El farmacéutico francés Jean Louis Émile Boudier clasificó el género *Trichophaea* en 1885 (Boudier, 1885). El género *Trichophaea sp.* se caracteriza en parte por tener apotecios pequeños,

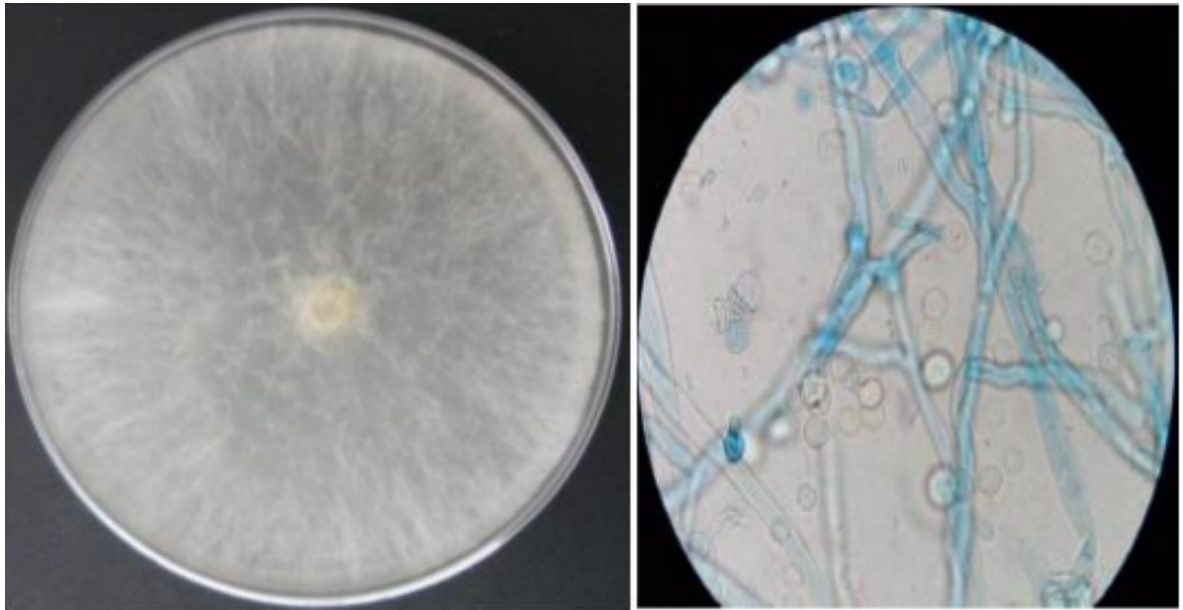


Figura 2.14: *Trichophaea sp* Izquierda-Morfología Macroscópica. Derecha- Morfología microscópica. Fuente: Lázaro-Germán, 2014

carnudos y lisos, con himenio blanco y pelos de color marrón que salen de las células excipulares (Kanouse *et al.*, 1958). La cepa *Trichophaea sp.* (SGLAf01) fue aislada de muestras de follaje, tallos y raíces de *Taxus globosa*, las cuales fueron colectadas en Reserva de la Biosfera en la Sierra Gorda ubicada en Querétaro. Los hongos se caracterizaron y agruparon fenotípicamente. Posteriormente se extrajo el DNA genómico de cada cepa, proseguido de PCR para un su identificación filogenética (Soca Chafre *et al.*, 2011). Su morfología macroscópica presenta las siguientes características: micelio de coloración blanca, textura algodonosa, con un crecimiento completo tras 3 días de cultivo en placas de Petri con medio PDA, sin embargo, a los 5 días de incubación el micelio se torna amarillento. La morfología microscópica del hongo presenta hifas no septadas hialinas ramificadas y sus esporas tienen una forma redonda (Lázaro, 2014) (Figura 2.14).

3

Planteamiento del problema

3.1. Planteamiento del problema

El cáncer de cuello uterino es un problema importante de salud pública en el mundo, principalmente en los países en desarrollo donde se encuentra asociado a una alta mortalidad. En México ocupa uno de los primeros lugares como causa de muerte por cáncer en mujeres. Aunque existen numerosos estudios del índice de replicación celular en el cáncer de cérvix, muy poco se ha estudiado en relación de la alteración del mecanismo de la apoptosis en la progresión de los cambios celulares desde la displasia leve hasta el cáncer invasor. Además, el número creciente de resultados en investigación básica que emplean compuestos de origen vegetal y que han sido propuestos en terapias alternativas están orientados hacia la quimio prevención del cáncer. Dentro de este grupo de compuestos encontramos a los endófitos, en especial a los hongos endófitos a los cuales se les ha atribuido un efecto citotóxico e inhibidor de la proliferación de células tumorales; sin embargo, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el carcinoma de cérvix, por lo cual es necesario generar información acerca de la actividad de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01 sobre células tumorales de cáncer cervicouterino.

4

Hipótesis

Se ha observado que los extractos de los hongos endófitos poseen propiedades antiproliferativas y apoptóticas sobre distintos tipos de líneas celulares tumorales, entonces si se administra el extracto semipurificado de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, un hongo endofítico de *Taxus globosa* a las líneas de cáncer cervicouterino HeLa y SiHa, éste será capaz de inducir efectos antiproliferativo y apoptóticos sobre ellas.

5

Objetivo

Determinar si el extracto semipurificado de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, un hongo endofítico de *Taxus globosa*, presenta efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis en células provenientes de cáncer cervicouterino (CaCu).

Los objetivos particulares de este estudio fueron:

- Caracterizar los compuestos responsables de las actividades antiproliferativas y proapoptóticas del extracto en crudo, mediante la técnica de HPLC.
- Purificar un extracto de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01.
- Analizar las actividades antiproliferativas y proapoptóticas del extracto semipurificado y el extracto en crudo, mediante el protocolo de citometría de flujo.

6

Materiales y métodos

Índice

6.1. Material biológico	37
6.1.1. Preparación del extracto crudo.	39
6.2. HPLC de fase inversa (RP-HPLC).	40
6.3. Determinación de CI_{50}	40
6.3.1. Determinación de la CI_{50} (<i>Matemática</i>)	41
6.3.2. Cultivo celular	41
6.4. Análisis del ciclo celular	42
6.4.1. Ensayo apoptosis	42
6.5. Análisis estadístico	43

El Desarrollo experimental de este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio del edificio A del CINVESTAV del Dr. Patricio Gariglio. TIPO DE ESTUDIO:

Es un estudio del tipo experimental, observacional.

6.1. Material biológico

El material biológico consistió en líneas celulares derivadas de carcinoma de cérvix, HeLa y SiHa (Cuadro 6.1), las cuales se obtuvieron del material criopreservado. Las fracciones del extracto de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Luis Bernardo Flores Cortera, quien se encargó de realizar

Linea Celular	Estadio	VPH
HeLa	II B	VPH 18
SiHa	IV B	VPH 16

Cuadro 6.1: Características generales de líneas celulares (Rangel, *et al.*, 2010)

la recolecta, identificación taxonómica y obtención de las fracciones del extracto de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, quien se encargó de realizar la recolecta, identificación taxonómica y obtención de las fracciones. Las líneas celulares HeLa y Siha, se cultivaron en medio de cultivo DMEM-suplementado con 10 por ciento de SFB (Suero Fetal Bovino) (GIBCO), previamente desactivado con dióxido de carbono en botellas T (CORNING) de 75 cm cúbicos tratadas para cultivo de células adherentes en monocapa. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (FORM a 37 °C, con un pH de 7.2 y con una atmósfera húmeda saturante al 5 por ciento de dióxido de carbono. Las células tumorales en fase de confluencia fueron despegadas del sustrato con 2 mL de la solución de Tripsina, se transfirieron a tubos cónicos (CORNING) de 15 mL, se centrifugaron a 1500 rpm en una centrífuga clínica (BIOHAZARD) y se reingresaron a botellas de cultivo de 75 cm cúbicos. Para comenzar el protocolo de ensayo experimental primero se determinó la densidad y viabilidades tumorales, para lo cual se realizó un conteo en cámara de Neubauer (AMERICAN OPTICAL, U.S.A.) y se evaluaron por la técnica de exclusión con azul de tripano (SIGMA), estableciendo como valor mínimo de viabilidad 95 por ciento. cinco tapones (5 cm de diámetro) del cultivo de agar, usando una pipeta de Pasteur, y se conservaron en 1 mL de agua destilada esterilizada a 5 °C. Las placas de Petri (32) que contenían PDA se inocularon cada una con un tapón, y se incubaron a 22 °C durante tres días. El crecimiento micelial se recogió, se mezcló con 80 mL de medio de caldo Czapeck-Dox (medio Czapeck) y se picó durante 10 segundos en una mezcladora. Se utilizó el micelio picado (5 mL / matraz) para inocular dieciséis matraces Erlenmeyer de 125 mL, conteniendo cada uno 15 mL de medio Czapeck. A continuación, los matraces se incubaron a 22 °C y 120 rpm durante cuatro días. Se inocularon cuatro matraces de Erlenmeyer de 1 L que contenían medio Czapeck cada uno, con el contenido de cuatro de los matraces de 125 mL, se hicieron hasta 400 mL y se incubaron durante cuatro días a 22 °C y 120 rpm. Un matraz de 20 L que contenía medio Czapeck, se inoculó con el contenido de los cuatro matraces de Erlenmeyer de 1 L, con un volumen final de 15 L, burbujeados con aire a un caudal de 5 L por minuto (0,3 vvm)

y se incubaron a 22 °C durante 7 días. El PDA se obtuvo de Difco (Sparks, MD, EE.UU). Todos estos reactivos se adquirieron de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

6.1.1. Preparación del extracto crudo.

Después de 7 días de incubación, el caldo de cultivo de 15 L se recogió y se filtró a través de una estopilla. El sobrenadante se extrajo tres veces, cada uno con 2,3 litros de acetato de etilo. Los extractos se reunieron, se concentraron a 260 mBar en un Rotavapor R-210 / R-215 de BUCHI (Flawil, St. Gallen, Suiza) y posteriormente se secaron en una atmósfera de nitrógeno para obtener el extracto crudo *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01.

Preparación del extracto semipurificado por cromatografía de extracto crudo.

El extracto bruto (2 g) se disolvió en 50 mL de acetona, se mezcló con 18 g de gel de sílice 60 de Macherey y Nagel (Düren, NRW, Alemania) y se secó en una atmósfera de nitrógeno. El extracto seco (es decir, el extracto de mezcla / sílice) se depositó sobre una columna de vidrio rellena con 40 g de sílice sobre hexano y se purificó luego mediante cromatografía usando un gradiente de acetato de etilo-hexano, donde el acetato de etilo aumentó de 0 a 100 por ciento en pasos de 5 por ciento por cada 100 mL de mezcla. Los espectros de absorción (220-1000 nm) de las fracciones recogidas (104, 5 mL cada una) se registraron usando un lector de microplacas CLARIOstar, BMG Labtech (Offenburg, BW, Alemania). Las fracciones recogidas con espectros similares se agruparon en 35 nuevas fracciones (F1-F35). Las fracciones F8-F17 mostraron signos de precipitación al enfriar (4°C durante la noche), y todas las fracciones mostraron una absorción máxima a 345 nm. La fracción F10 (100 mL) que contenía la mayor cantidad de precipitado se centrifugó a 5000 rpm, 5 minutos y 4 °C, y el sólido recuperado se disolvió en acetonitrilo (150 mL). Esta última solución se concentró hasta 75 mL en un Rotavapor R-210 / R-215, luego el sólido F10 se cristalizó por enfriamiento como anteriormente, se recuperó por centrifugación y se secó en atmósfera de nitrógeno (se obtuvieron aproximadamente 80 mg de extracto semipurificado). El sólido F10,

denominado en lo sucesivo el extracto semipurificado, se mantuvo a -10 grados centígrados hasta un análisis posterior. El acetonitrilo fue grado HPLC de Burdick y Jackson (Muskegon, MI, EE.UU.) y acetona, hexano y acetato de etilo fueron de calidad analítica de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EE.UU.).

6.2. HPLC de fase inversa (RP-HPLC).

El sólido F10 se disolvió en agua / acetonitrilo (1: 3,3 v / v) hasta 1 mg / mL. El análisis por HPLC se realizó en un sistema HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, EE.UU.) que tenía una columna Jupiter C18, 250 x 4,6 mm \varnothing ; 3 μ m de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). Las condiciones operativas fueron: volumen de inyección 30 μ L, caudal 0,65 mL / min y temperatura 23 °C. Se utilizó un gradiente de disolvente binario de acetonitrilo-agua (ácido fórmico al 0,1 por ciento) como sigue: tmin = 0-5, acetonitrilo al 50 por ciento ; tmin = 5-20, acetonitrilo al 60 por ciento ; tmin = 20-25, acetonitrilo al 70 por ciento ; tmin = 25-30, acetonitrilo al 100 por ciento; tmin = 30-32, 50 por ciento de acetonitrilo.

6.3. Determinación de CI₅₀

Para establecer la CI 50 (índice de concentración en la cual se disminuye en un 50 por ciento el número celular) se tomaron la cantidad de volumen del stock necesaria para las concentraciones de 10, 8, 6, 4, y 2 μ g/mL. Cada tipo celular fue sembrado (7,500 por pozo) en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), con un volumen por pozo de 100 L de DMEM al 5 por ciento de SFB, durante 24 horas. Se dejaron transcurrir 24 horas y se trataron con las diferentes concentraciones del compuesto Esferocfalina de la siguiente manera: se retiro el medio de cultivo y se agrego cada uno de los siguientes tratamientos; al primero se le denomino control, el cual solo contenía medio de RPMI al 5 por ciento de SFB, el segundo fue llamado vehículo, y contenía la concentración máxima de acetona (<1 por ciento) que se utilizo en el ensayo; los demás tratamientos incluyen las diferentes concentraciones 10, 8, 6, 4, y 2 μ g/mL, este procedimiento se llevo a cabo en una

serie de seis repeticiones, se aplicaron los mismos volúmenes por pozo, 100 l, y así se mantuvieron las condiciones por 24 horas mas.

6.3.1. Determinación de la CI_{50} (Matemática)

Para la determinación de CI_{50} matemática los datos obtenidos de concentración en g/mL fueron correlacionados con los respectivos valores de por ciento celular. Los datos son linealizados y se realizo una interpolación para calcular la disminución del 50 por ciento de la población celular (CI_{50}). Todo esto se realiza con la ayuda de un software para computadora (Excel 2003).

6.3.2. Cultivo celular

Se adquirieron las líneas celulares de cáncer cervical HeLa (VPH 18 positivo) y SiHa (VPH 16 positivo) de ATCC (Rockville, MD, EE.UU.). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada con dióxido de carbono al 5 por ciento a 37 °C, en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal al 10 por ciento , penicilina 100 unidades / 100 mg / mL de estreptomina de GIBCO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.).

Ensayo de proliferación y tratamiento de células

El extracto semipurificado de *Trichophaea sp.* la cepa SGLAf01 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 32 mg / mL y se usó inmediatamente para ensayos de células. Se sembraron células de cáncer HeLa y SiHa en una placa de 24 pozos (50.000 células en cada uno), y se incubaron durante 24 h bajo las condiciones anteriores. Posteriormente, las células se trataron con el extracto semipurificado de SGLAf01 a concentraciones variables (25, 50, 75 y 100 μ g / mL) y se incubaron durante 48 h. La proliferación celular se determinó por medio del ensayo de bromuro de 3- (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolio (MTT); las células tratadas con el extracto semipurificado se añadieron con MTT (0,5 mg / mL) adquirido de Sigma-Aldrich y se incubaron durante 45 min. Se eliminaron los medios de cultivo celular

y se solubilizaron los cristales de colorante de formazano con 500 μ L de isopropanol ácido y se analizaron por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm (TECAN, Männedorf, Suiza). Los análisis se realizaron al menos por triplicado.

6.4. Análisis del ciclo celular

Se cultivaron células HeLa y SiHa hasta 200.000 células / pocillo y se trataron durante 48 horas con el extracto semipurificado a 29 y 50 μ g / mL, respectivamente. Después del tratamiento, se recogieron las células y se fijaron en alcohol etílico al 70 por ciento enfriado a - 70 °C al menos durante un día. A continuación, las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad en solución de yoduro de propidio (PI) (Sigma - Aldrich) a 30 μ g / mL) que contenía RNasa (100 μ g / mL) y 0,05 por ciento de Triton X -100. El contenido de ADN celular se evaluó mediante citometría de flujo en un equipo BD FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), evaluando 10.000 eventos por muestra, se analizaron los datos de salida usando el software ModFit LT.

6.4.1. Ensayo apoptosis

Se analizaron las células HeLa y SiHa 200.000 células por pozo y se trataron durante 48 h con el extracto semipurificado a 29 y 50 μ g / mL, respectivamente. A continuación, se realizaron análisis de la apoptosis utilizando el Alexa Fluor 488 annexinV / DeadCell Apoptosis Kit V13245 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US UN). Brevemente, las células se recogieron, se lavaron con PBS frío y se volvieron a suspender en 100 mL de tampón de unión a anexina (ABB). Las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en ABB suplementado con Alexa Fluor 488 anexina V y yoduro de propidio a 1 μ g / mL y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 400 μ L de ABB y se analizaron las células mediante citometría de flujo a 530 nm y 575 nm en un instrumento FACSCalibur. El análisis de los datos se realizó en 10.000 eventos con el software para computadora Summit V4.3.

6.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de al menos tres experimentos independientes, para conocer si hay alguna diferencia entre los tratamientos y el grupo control se realizó el análisis t de Student considerando un valor de $p < 0.01$ como significativo. El análisis T-Student se utilizó para análisis estadísticos; el valor de P 0,01 se considera significativo.

7

Resultados

Índice

7.1. Resultados	45
7.1.1. Separación en cromatograma HPLC de fase inversa del extracto crudo de <i>Trichophaea sp.</i> cepa SGLAf01.	45
7.1.2. Actividad antiproliferativa del extracto SGLAf01 semipurificado (F10).	46
7.1.3. Actividad proapoptótica del extracto crudo SGLAf01.	50
7.1.4. Discusión de Resultados	52

7.1. Resultados

7.1.1. Separación en cromatograma HPLC de fase inversa del extracto crudo de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01.

Se recuperaron cuatro fracciones por separación en cromatografía de 2 g de extracto seco SGLAf01. Estas fracciones se agruparon según sus espectros de absorción (UV-vis 220-1000 nm) en treinta y cinco fracciones (F1-F35). Como se indica en Materiales y métodos, las fracciones F8-F17 mostraron signos de precipitación al enfriarse a cuatro grados centígrados. Se obtuvieron 80 mg de un precipitado blanco amarillento de F10, la fracción con la mayor cantidad de sólidos precipitados. El sólido F10, en lo sucesivo denominado extracto semipurificado, se usó para todo el trabajo posterior. El cromatograma HPLC de fase inversa del extracto SGLAf01 semipurificado se muestra en la Figura 7.1. Se pueden observar tres picos de fracciones principales, llamados T20, T23 y T24, con tiempos de

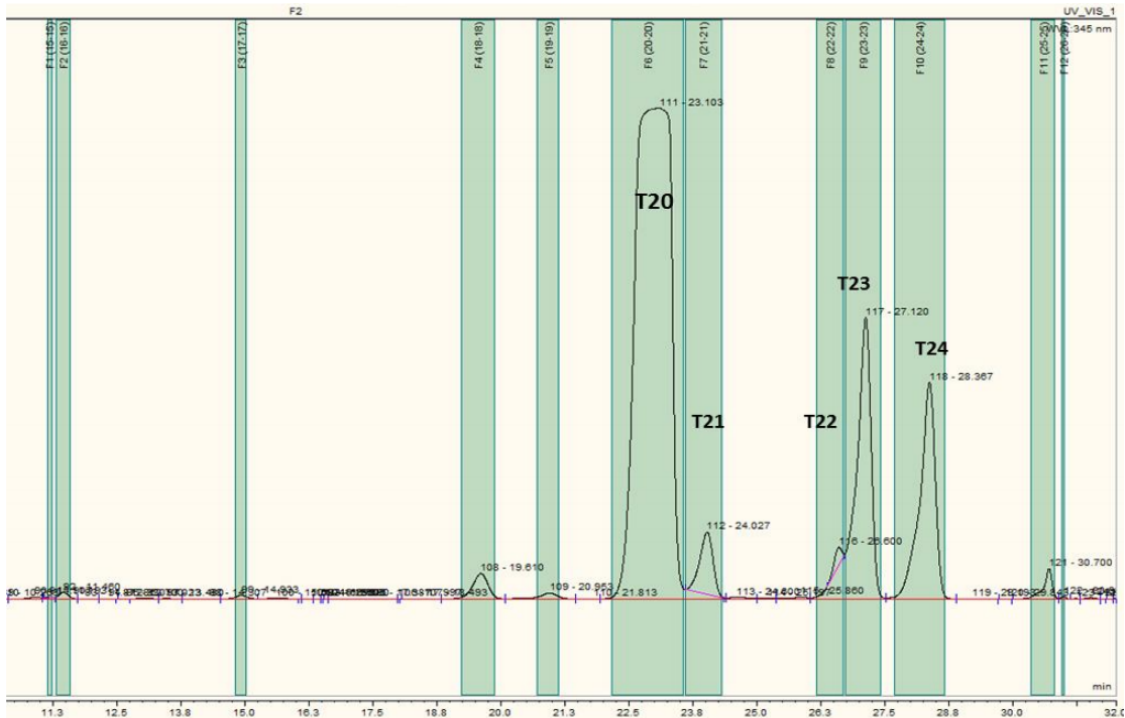


Figura 7.1: Separación de la fracción precipitada mediante HPLC

retención de 19.2, 23.8 y 24.8 minutos aproximadamente.

7.1.2. Actividad antiproliferativa del extracto SGLAf01 semipurificado (F10).

La actividad antiproliferativa del extracto crudo SGLAf01 y del extracto SGLAf01 semipurificado (F10) se evaluó en dos líneas de cáncer de cuello uterino. El extracto bruto de SGLAf01 inhibió la proliferación de células HeLa y células SiHa (tratamiento de 48 h) con CI 50 65 y 99 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. Además, las células HeLa y SiHa se trataron (48 h) con diversas concentraciones del extracto semipurificado (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 10.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y luego se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. El extracto semipurificado inhibió la proliferación de las dos líneas celulares de una manera dependiente de la dosis (Figura 7.1), pero cada tipo de célula exhibió sensibilidad diferente (CI 50, HeLa 3.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y SiHa 14.7 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Para evaluar si el efecto inhibitorio se debía a la detención de la proliferación celular (efecto citostático) o la muerte celular

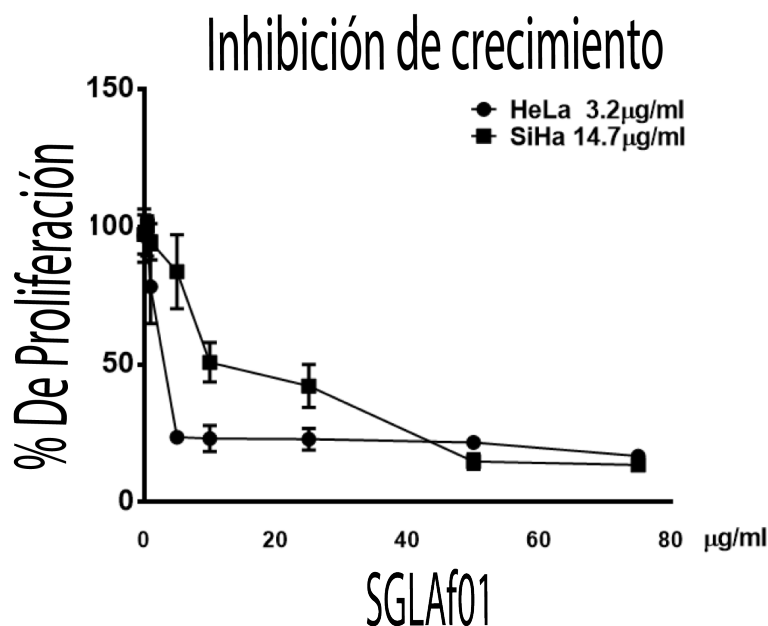


Figura 7.2: Efecto antiproliferativo del extracto semipurificado (F10) en las líneas celulares HeLa y SiHa. En cada condición se emplearon seis repeticiones. La ecuación de la curva obtenida fue utilizada para calcular la CI 50.

Línea celular	CI 50 SGLAf01 (F10) (µg / mL)	CI 50 (µM)
HeLa	3.2 ± 0.5	25
SiHa	14.7 ± 1.3	50

Cuadro 7.1: Valores de la concentración de CI 50 del SGLAf01, requerida para inhibir un 50 por ciento la población celular de HeLa Y SiHa expresada en µg / mL y en µM, se realizó con el fin de facilitar la comparación encontrada en la literatura de las otras cepas.

(citotoxicidad), evaluamos la progresión del ciclo celular de las células a partir de cultivos que se dividen exponencialmente.

Como se puede apreciar en la Figura 7.2, el extracto semipurificado de *Trichophaea sp.* Cepa SGLAf01 afectó el potencial proliferativo de las células tumorales de una manera dependiente de la dosis, es decir conforme se incrementa la concentración, el número celular disminuye. Los valores CI 50 obtenidos (Cuadro 7.1) indican que las células HeLa fueron las más sensibles al efecto antiproliferativo del compuesto, mientras que las células SiHa mostraron la mayor sensibilidad (Figura 7.3 y 7.4).

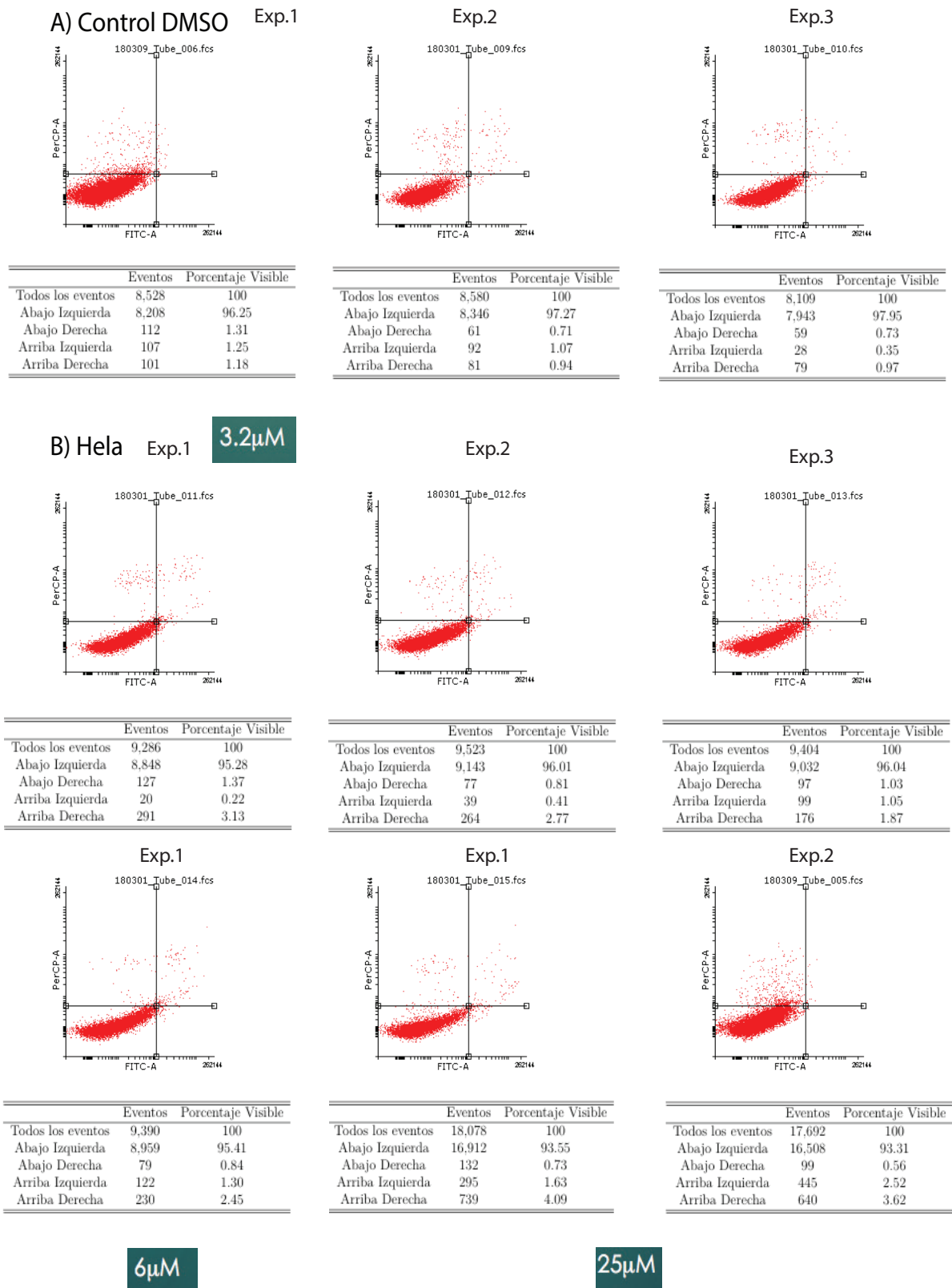
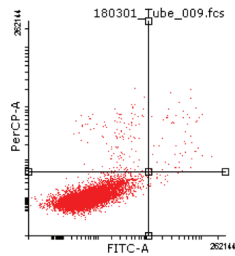


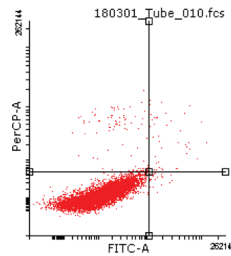
Figura 7.3: Efecto apoptótico de SLAGf01 sobre células de líneas de CaCu (HeLa) con citometría de flujo. Las evaluaciones indican el porcentaje de FITC incorporado por las células HeLa, tratadas con el extracto semipurificado SGLAf01 (F10) a las concentraciones de 3.2 µM, 6 µM y 25 µM (CI 50). *U.N.A.M. 2018*

A) Control DMSO Exp.1



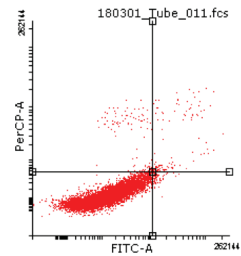
	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,727	100
Abajo Izquierda	9,450	97.15
Abajo Derecha	86	0.88
Arriba Izquierda	109	1.12
Arriba Derecha	82	0.84

Exp.2



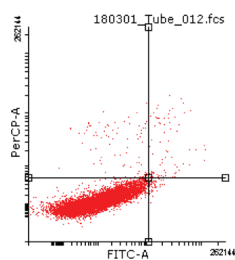
	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,758	100
Abajo Izquierda	9,483	97.18
Abajo Derecha	109	1.12
Arriba Izquierda	83	0.85
Arriba Derecha	83	0.85

Exp.3



	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,700	100
Abajo Izquierda	9,424	97.15
Abajo Derecha	71	0.73
Arriba Izquierda	100	1.03
Arriba Derecha	105	1.08

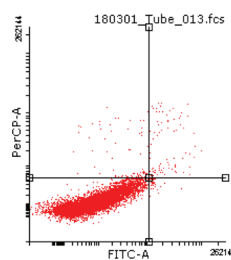
B) SiHa 14.7µM Exp.1



	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,834	100
Abajo Izquierda	9,609	97.71
Abajo Derecha	59	0.60
Arriba Izquierda	84	0.85
Arriba Derecha	82	0.83

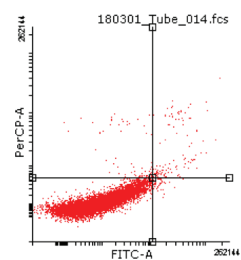
Exp.1

Exp.2



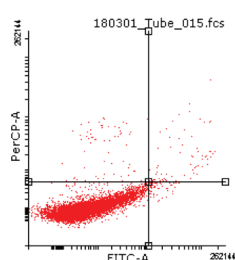
	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,873	100
Abajo Izquierda	9,663	97.87
Abajo Derecha	38	0.38
Arriba Izquierda	85	0.86
Arriba Derecha	87	0.88

Exp.3



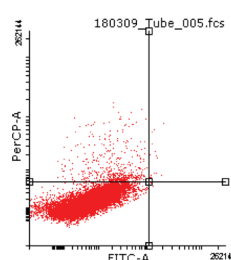
	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,826	100
Abajo Izquierda	9,578	97.48
Abajo Derecha	55	0.56
Arriba Izquierda	73	0.74
Arriba Derecha	120	1.22

Exp.1



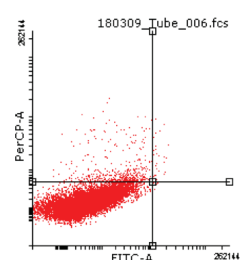
	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	9,846	100
Abajo Izquierda	9,649	98
Abajo Derecha	59	0.60
Arriba Izquierda	68	0.69
Arriba Derecha	70	0.71

Exp.1



	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	19,102	100
Abajo Izquierda	18,578	97.26
Abajo Derecha	2	0.01
Arriba Izquierda	508	2.66
Arriba Derecha	14	0.07

Exp.2



	Eventos	Porcentaje Visible
Todos los eventos	19,256	100
Abajo Izquierda	18,780	97.53
Abajo Derecha	4	0.02
Arriba Izquierda	444	2.31
Arriba Derecha	28	0.15

29.4µM

50µM

Figura 7.4: Efecto apoptótico de SLAGf01 sobre células de líneas de SiHa CaCu con citometría de flujo. Las evaluaciones indican el porcentaje de FITC incorporado por las células HeLa, tratadas con el extracto semipurificado SGLAf01 (F10) a las concentraciones de 14.7 µM, 29.4 µM y 50 µM (CI 50).

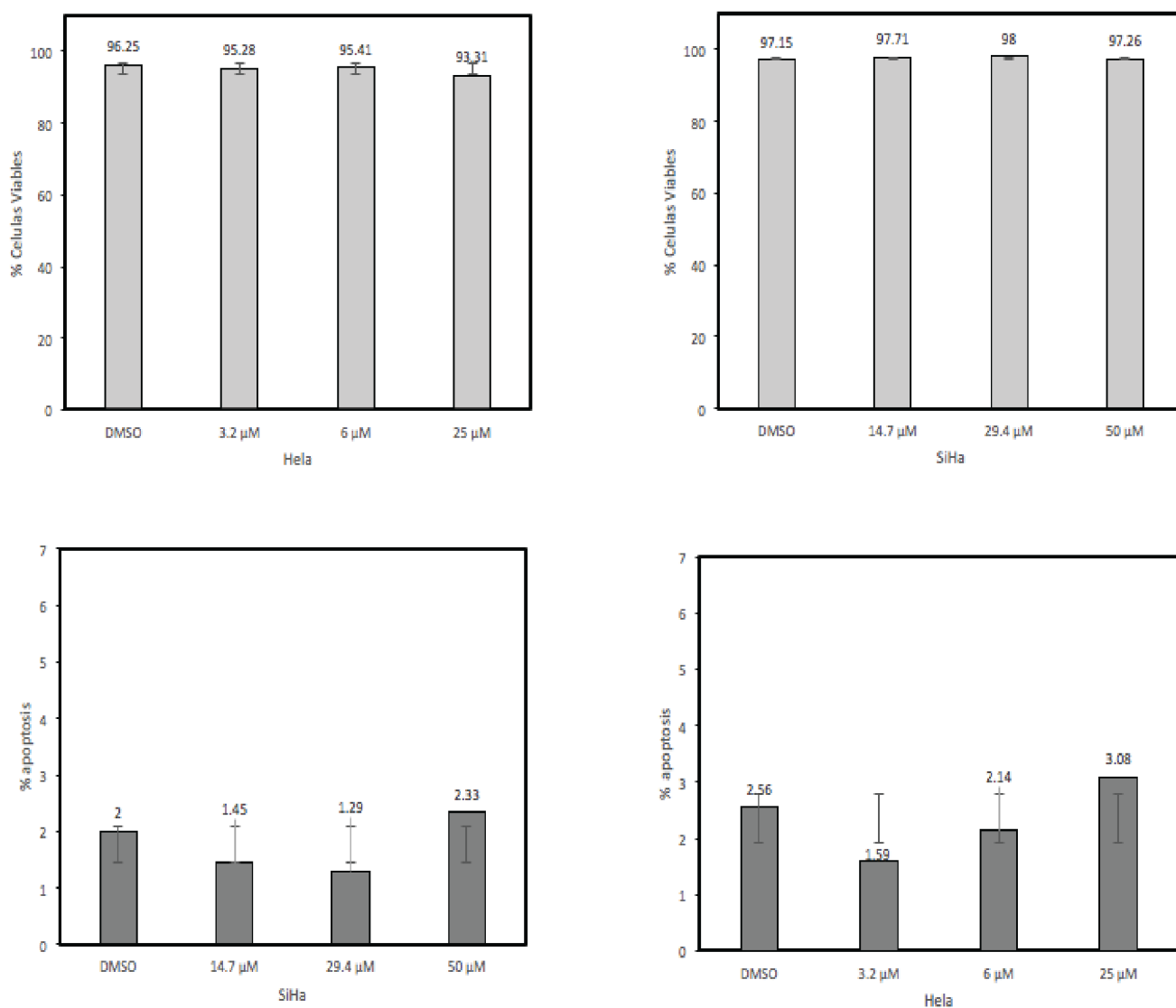


Figura 7.5: Efecto apoptótico y porcentaje de células vivas de SGLAf01 sobre células (HeLa y SiHa) representada en gráfica de barras.

7.1.3. Actividad proapoptótica del extracto crudo SGLAf01.

El extracto crudo induce la apoptosis a través de la ruta mitocondrial (Figura 2.9). La apoptosis se evaluó para determinar si la modificación del ciclo celular detectada, en las células HeLa tratadas con el extracto crudo, puede vincularse a la inducción de la apoptosis. Para tal fin, las células HeLa se trataron con el extracto SGLAf01 crudo en su CI 50 respectiva (65 μ g / mL) y se analizaron mediante citometría de flujo. La Figura 7.6 muestra un aumento sustancial de la apoptosis. Otros cambios mitocondriales sobresalientes fueron la disminución del potencial

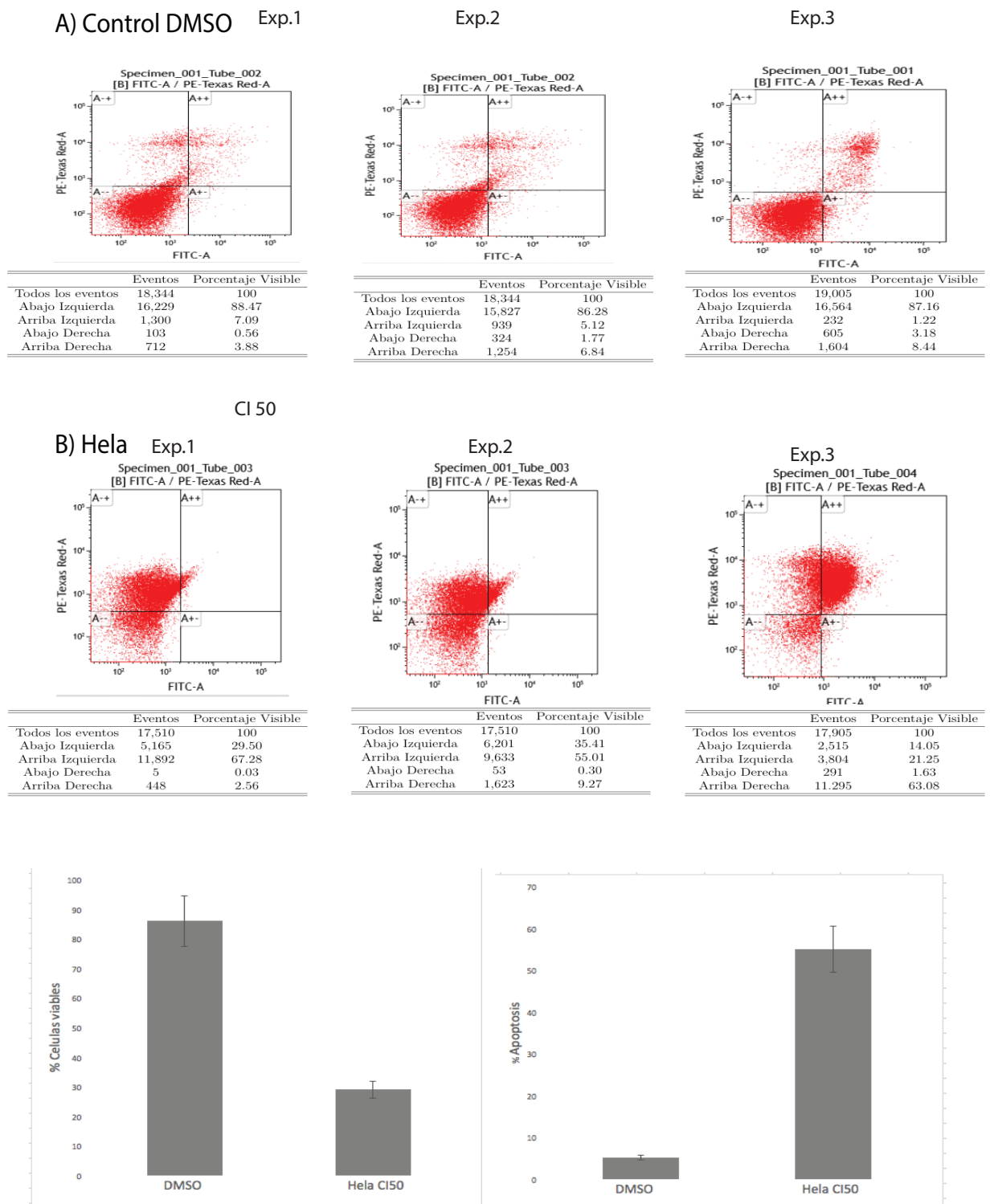


Figura 7.6: Efecto apoptótico del extracto crudo SLAGf01 sobre células de líneas de CaCu (HeLa) con citometría de flujo. Las evaluaciones indican el porcentaje de FITC incorporado por las células HeLa, tratadas con el extracto crudo SGLAf01 a la (CI 50).

de membrana mitocondrial, el aumento de la permeabilidad de la membrana y la liberación de citocromo c. Todos estos eventos parecen estar relacionados con la activación de la caspasa 3 y con la fragmentación del ADN.

7.1.4. Discusión de Resultados

Actualmente el cáncer cervicouterino (CaCu) puede detectarse tempranamente y tratar oportunamente, sin embargo, hoy en día el CaCu es una de las causas de muerte tanto a nivel mundial como a nivel nacional. En la mayoría de los casos, el CaCu es detectado cuando ya se encuentra en etapas avanzadas, por lo que hay que recurrir a tratamientos como la radioterapia y la quimioterapia los cuales provocan efectos secundarios que van degradando la calidad de vida de la mujer que fue sometida a este tipo de tratamientos los cuales, actualmente carecen de selectividad sobre células tumorales y de éxito en estadios avanzados de esta enfermedad. Los medicamentos usados en la quimioterapia causan la muerte celular, ya sea al interferir directamente con el ADN, o con proteínas clave que se requieren para la división o muerte celular. Desafortunadamente, también pueden ser citotóxico algunas células normales, sobre todo aquellas que están en constante división, como las de la médula ósea y las mucosas. Esta situación ha provocado un gran interés en la búsqueda de estrategias para combatir esta enfermedad, dentro de las cuales se encuentra la búsqueda de compuestos de origen natural con propiedades antitumorales y quimio-terapéuticas que puedan eliminar el proceso oncogénico y a su vez sean selectivos. Entre tales compuestos se encuentran los flavonoides los cuales, interfieren por distintos mecanismos en el proceso oncogénico, ya sea inhibiendo la proteína p53 mutante, la detención del ciclo celular, activación de la apoptosis e inhibición de la angiogenesis, lo que los hace posibles agentes de utilidad para combatir dicha enfermedad.

Se muestra que el extracto crudo y el extracto semipurificado *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01 tiene actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer cervical HeLa y SiHa. Mientras que el extracto crudo solo induce a varios eventos que conduce a la apoptosis en células HeLa.

Los medicamentos de quimioterapia pueden dañar las células cancerosas mediante la inducción de varios eventos que conducen a la apoptosis, como la detención del ciclo celular, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasa-3 (Qin y Ng, 2002; Wang *et al.*, 2000; Bacus *et al.*, 2001; Zhang y Huang, 2013). Se sabe que la proteína P53 es un activador de apoptosis crucial (Fridman y Lowe, 2003; Pflaum *et al.*, 2014), la acumulación de proteína P53 generalmente induce la transactivación de sus genes diana y la apoptosis a través de la ruta mitocondrial (Wang y Sung, 2010). Los agentes quimioterapéuticos conocidos como el cisplatino o el taxol, así como los compuestos polifenólicos como el resveratrol o la curcumina, inducen la apoptosis mediante la activación de la vía P53 (Damia *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002; Lontas y Yeger, 2004; Bragado *et al.*, 2007). Los resultados sugieren que el extracto SGLAf01 semipurificado activa la vía apoptótica intrínseca después de la inducción de P53, independientemente de la línea celular utilizada, es decir, HeLa o SiHa. Además, la expresión de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Puma, Bax, Noxa) es clave dado que las proteínas codificadas por estos genes son importantes efectores de la apoptosis a través de la ruta mitocondrial (Youle y Strasser, 2008; Zhang *et al.*, 2013). Estas proteínas se encuentran en la mitocondria e interactúan con los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-x) inhibiendo su actividad y liberando Bax de Bcl-2 o Bcl-x, permitiendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Youle y Strasser, 2008; Gallenne *et al.*, 2009; Jabbour *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios deberían ayudar a elucidar; otras vías de muerte celular activadas por el extracto SGLAf01 semipurificado, su potencial actividad citotóxica en células cancerosas de diferente origen, o en presencia de P53 mutante.

Trichophaea sp. pertenecen a la clase *Peizizomycetes*, una subfilum de hongos *ascomycetes* que no se han estudiado la relación de sus metabolitos bioactivos. La información de los metabolitos bioactivos de *Trichophaea sp.* se relaciona con la actividad antibiótica contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (CI 50 18 µg / mL), del extracto crudo de *Trichophaea abundans*, un hongo endofítico de *Pinus sp.* (Qadri *et al.*, 2013). *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01 se aisló junto con

el hongo estrechamente relacionado *Geopyxis*, que como *Trichophaea* pertenece a la familia *Pyronemataceae* (Soca-Chafre et al., 2011). *Geopyxis aff. majalis* y *Geopyxis sp.* Los hongos AZ0066, aislados del líquen *Pseudevernia* intenso, producen *geopyxinas* AE, diterpenoides con actividad citotóxica contra el cáncer de pulmón no microcítico humano (NCI-H460), glioma del SNC (SF-268), cáncer de mama (MCF-7), próstata metastásica adenocarcinoma (PC-3M) y adenocarcinoma de mama metastásico humano (MDA-MB-231) (Wijeratne et al., 2012). *Pulvinula sp.* 11120, un hongo aislado de *Cupressus arizonica* (ciprés de Arizona) y perteneciente también a la familia *Pyronemataceae*, produce las furanonas: pulvinulina A, graminina C, cisgregatina B y graminina B con actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (Wijeratne et al. , 2015). Sin embargo, más allá de estos cuatro hongos mencionados, no hay más estudios disponibles sobre los compuestos bioactivos de hongos dentro de la familia *Pyronemataceae*. Por lo tanto, este es el primer informe que muestra que un extracto semipurificado de una cepa fúngica de *Trichophaea* posee actividad antiproliferativa y proapoptótica en las células de cáncer de cuello uterino HeLa y SiHa.

8

Conclusiones

Índice

8.1. Conclusión	55
8.1.1. Propuestas	55
8.1.2. Perspectivas	56

8.1. Conclusión

- El extracto SGLAf01 semipurificado (F10) afecta el potencial proliferativo de manera dosis dependiente en la líneas celulares HeLa y SiHA, con una CI 50 de 3.2 µg/mL y 14.7 µg/mL a 48 horas de tratamiento.
- El extracto SGLAf01 semipurificado (F10) no induce a las células HeLa a expresar características morfológicas propias de células apoptóticas (proapoptótica).
- El extracto crudo SGLAf01 induce a las células HeLa a expresar características morfológicas propias de células apoptóticas (proapoptótica).

8.1.1. Propuestas

Como continuación de este trabajo se propone:

- Determinación de la actividad biológica por medio de modelos farmacológicos.
- Determinar las constantes de asociación por resonancia magnética nuclear.

- Determinar la posible existencia de polimorfos a través de calorimetría diferencial de barrido con apoyo de la técnica de análisis de difracción de rayos X de polvos.

8.1.2. Perspectivas

A pesar de demostrar que el extracto crudo de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, un hongo endofítico de *Taxus globosa* presenta una actividad antiproliferativa en células de cáncer cervicouterino HeLa y SiHa, y que dicho efecto no fue inducido por una muerte vía necrosis, sería pertinente determinar el mecanismo biológico por el cual provoca que disminuya el 50 por ciento de la población de células. Así como, también saber si presenta un efecto antiproliferativo en células no tumorales, especialmente en linfocitos de sangre periférica durante 24 horas de tratamiento, o en su defecto saber cómo es que se lleva a cabo el efecto antiproliferativo sobre los linfocitos a las 72 horas de tratamiento, partiendo del conocimiento de que al igual que en las células tumorales, también resultó no ser citotóxica. Lo antes mencionado, nos llevaría a tener información sobre su toxicidad, su forma de actuar y su selectividad. De tal manera que al final podamos saber si pudiera ser un buen candidato para que se desarrolle como fármaco y sea aplicado como agente en la quimioterapia.

- Caracterización química de la fracción del extracto semipurificado de *Trichophaea sp.* cepa SGLAf01, un hongo endofítico de *Taxus globosa*.
- Evaluar a 96h y 120h la expresión para el mensajero de citocromo c en la línea celular INBL.
- Evaluar la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bak, Bax).
- Evaluar la tumorigenicidad in vivo de estas nuevas subpoblaciones aisladas.
- Ampliar la caracterización de las cancer stem cells (CSC) derivadas de las líneas celulares SiHa, HeLa.
- Medir el potencial de membrana mitocondrial.

- Evaluar la presencia de la proteína, de citocromo c, en el citoplasma mediante citometría.
- Evaluar la expresión de receptores de muerte celular.

Apéndices



Apéndices del desarrollo experimental

Índice

A.1. Datos del árbol <i>Taxus Globosa</i> del que se obtuvo el hongo endófito.	61
A.1.1. Taxonomía <i>Trichophaea</i>	64
A.2. Líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu) . . .	64
A.3. Condiciones de los protocolos utilizados	66

A.1. Datos del árbol *Taxus Globosa* del que se obtuvo el hongo endófito.

- **Dominio:** Eukaryota () - Whittaker Margulis,1978
- **Reino:** Plantae () - Haeckel, 1866 - Plants
- **Subfilum:** *Euphyllophytina* ()
- **Clase :** *Taxopsida*() - Brongniart, 1843 - Dicotyledons
- **Orden:** *Taxales* () - Lindley, 1833
- **Familia:** *Taxaceae* () - Dumortier, 1822 - Sunflower Family
- **Género:** *Taxus* () - Kunth in A. von Humboldt et al., Nov. Gen. Sp. 4(fol.): 176. 1818; 4(qto.) - Goldeneye [For L. G. A. Viguier, 1790-1867, French physician]



Figura A.1: Vista de la corteza externa de un ejemplar de *Taxus Globosa* en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. Ramillas de *Taxus globosa* Schlecht. del Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México, durante la época de fructificación (arriba), estructuras femeninas en septiembre) y polinización (abajo), estructuras masculinas en enero). Foto tomada de Revista Chapingo Serie Horticultura 7(1): 77-94, 2001

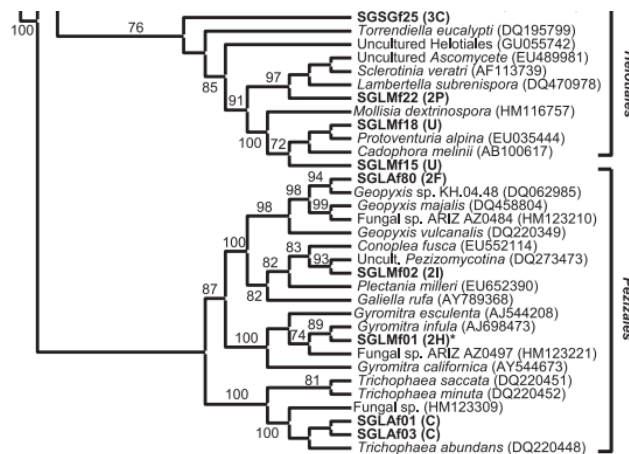


Figura A.2: Vista de la Filogenética

Nombre en latín	<i>Taxus Globosa</i>
Familia	<i>Taxaceae</i>
Distribución	norte de México
Sinónimos	Tejo mexicano
Nombre Común en Español	Tejo
Nombre Común en Inglés	Mexican yew
Nombre Común en Francés	viguiera à tête arrondie

Cuadro A.1: Datos de *Taxus Globosa*

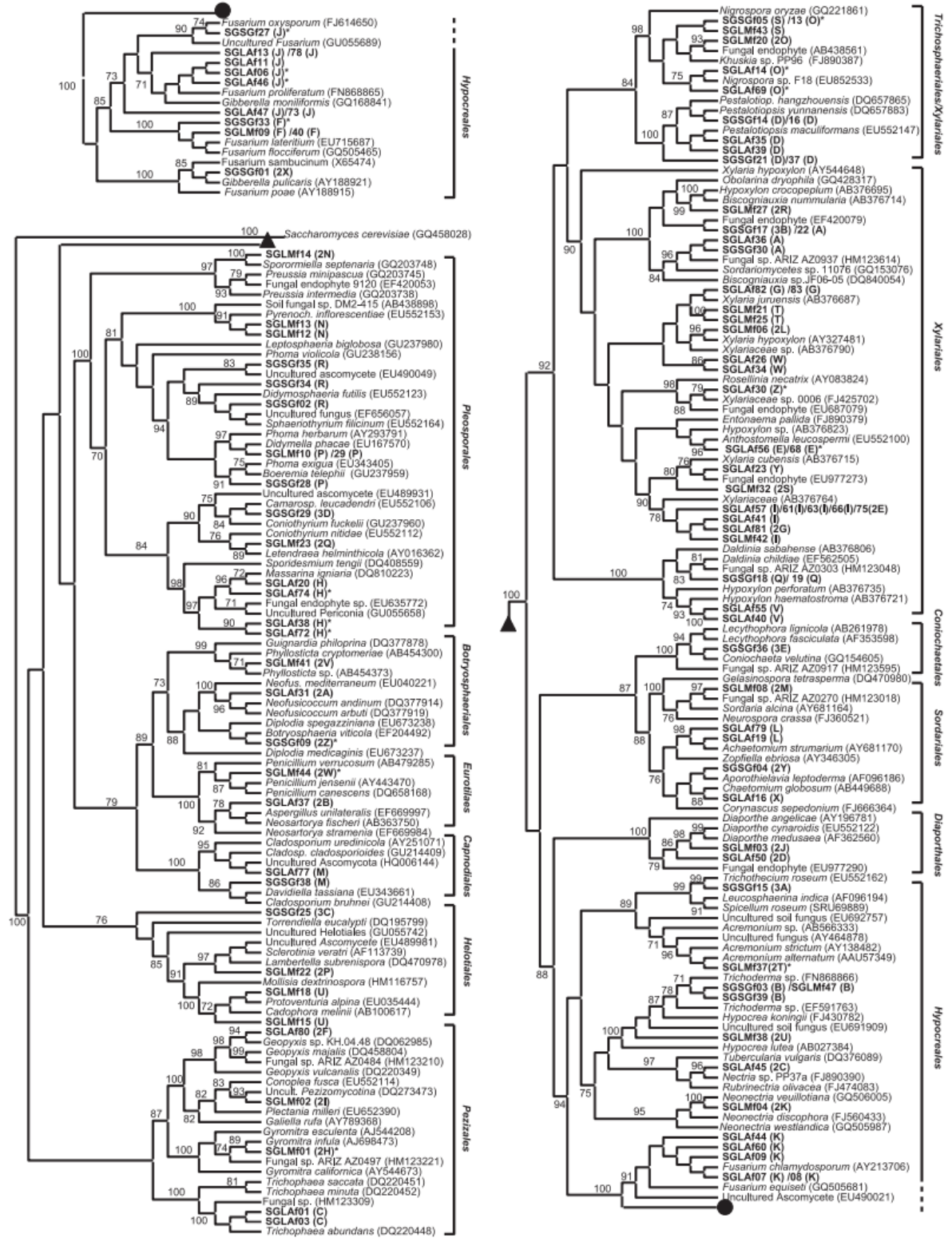


Figura A.3: Vista de la Filogenética Adaptado de (Soca Chafre *et al.*, 2011)

A.1.1. Taxonomía *Trichophaea*

- **Dominio:** Eukaryota () - Whittaker Margulis, 1978
- **Reino:** Fungi () - Haeckel, 1866 - Plants
- **Subfilum:** *Ascomycota* () - Brongniart, 1843 - Dicotyledons
- **Clase :** *Pezizomycete*() - Brongniart, 1843 - Dicotyledons
- **Orden:** *Pezizales*() - Lindley, 1833
- **Familia:** *Pyrenomycetaceae* () - Dumortier, 1822 - Sunflower Family
- **Género:** *Trichophaea Boud* () - Kunth in A. von Humboldt et al., Nov. Gen. Sp. 4(fol.): 176. 1818; 4(qto.) - Goldeneye [For L. G. A. Viguiet, 1790-1867, French physician] E

A.2. Líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu)

Las líneas celulares de CaCu que se utilizaron en este trabajo son: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18; y Siha, células provenientes de carcinoma cérvico-uterino, de tipo grado 2 por FIGO la línea es positiva a VPH 16.

Tipificación de la línea celular HeLa

- Especie: *homo sapiens*, Negro Mujer 31 años de edad; Tejido: cuello uterino.
- Morfología: epitelial.
- Tumor: Carcinoma, epitelial.
- Propiedades: prueba antitumoral; transformación; tumorigenicidad; citotoxicidad; biología celular; invasión bacteriana; virología; Susceptible a: adenovirus 3, el sarampión, virus de la polio 1, virus ECHO, vaccinia, arbovirus, virus sincitial respiratorio, reovirus 3, rinovirus, Coxsackie.

- Medio de congelación: MEM + 10 por ciento FBS + 8 por ciento DMSO; micoplasma negativo, HOECHST.
- Cultivo continuo, crecido como monocapa; MEM + 10 por ciento de FBS + 1 mM de piruvato de Na; 37 ° C, 5 por ciento de CO₂.
- Cariología: aneuploides.
- Se han reportado para contener un virus integrado del papiloma humano 18 (VPH - 18).
- Disponibilidad en los catálogos de líneas celulares: ATCC CCL 2, ECACC 85060701; IZSBS BS TCL20; DSMZ ACC 57; ICLC HTL95023.Sumerja. Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi (BGEBS, Brescia). CO₂.
- Referencia: (Pater ; Pater A , 1987).

Tipificación de la línea celular SiHa

- Especie: *homo sapiens*, Asiático Mujer 55 años de edad.
- Morfología: epitelial.
- Tumor: grado 2 estratificado contiene HPV.
- Propiedades: prueba antitumoral; transformación; tumorigenicidad; citotoxicidad; biología celular; invasión bacteriana; virología; Susceptible a: adenovirus 3, el sarampión, virus de la polio 1, virus ECHO, vaccinia, arbovirus, virus sincitial respiratorio, reovirus 3, rinovirus, Coxsackie.
- Medio de congelación: medio de crecimiento completo complementado con DMSO al 5 por ciento (v / v) Temperatura de almacenamiento: fase de vapor de nitrógeno líquido.

- Medio de cultivo : suero bovino fetal hasta una concentración final del 10 por ciento Ambiente: aire, 95 por ciento ; dióxido de carbono, 5 por ciento. Temperatura: 37 °C.
- Cariología: Esta es una línea celular humana hipertriploide con el número cromosómico modal de 71, que ocurre en el 24 por ciento de las células. La mayoría de las células tenían los números de cromosomas distribuidos entre 69 y 72.
- Se informa que la línea contiene un genoma del virus del papiloma humano integrado tipo 16 (VPH-16, 1 a 2 copias por célula).
- Referencia : (Baker CC, *et al.*, 1987).

A.3. Condiciones de los protocolos utilizados

Retrotranscripción

Para el presente estudio se partió de 2µg de RNA total para todas las muestras (controles y tratamientos). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula: Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofótometro.

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 1:10 en un volumen de 200 µL.

$$\left(\frac{(Absorbancia260)(VD)(40)}{1000}\right) = 1microgramo/microlitro \quad (A.1)$$

En donde:

- Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofótometro.
- Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 1:50 (4 µl de muestra más 196 µl de agua inyectable) en un volumen final de 200 µl.
- 40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) del ARN equivale a 40 µg/ml del biofótometro.

Reactivos	1RX	2RX controles	2RX tratamientos
Amortiguador 5x (PROMEGA)	5 μ l	10 μ l	10 μ l
dNTPs 10 Mm (INVITROGEN)	1.5 μ l	3 μ l	3 μ l
Enzima MMLV-RT (PROMEGA)	1 μ l	2 μ l	2 μ l
Oligo dT (PROMEGA)	1.8 μ l	3.6 μ l	3.6 μ l
Muestra	X μ l	X μ l	X μ l
Agua libre de RNAsas	X μ l	X μ l	X μ l
Volumen Total	25 μ l	50 μ l	50 μ l

Cuadro A.2: Condiciones del protocolo RT-qPCR

Teniendo los cálculos de todas las muestras, y partiendo de 2 μ g de RNAm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener (2 controles y 2 tratamientos):

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con los cDNA obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren (tabla 4), para cada primer utilizado en el presente estudio (-actina y citocromo c).

Reactivos y Soluciones Utilizados

Soluciones para cultivo

- DEM/10 por ciento SFB
- Solución fisiológica de verseno
- Solución de Fosfatos (PBS)
- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70 por ciento
- H₂O inyectable
- H₂O libre de RNAsas
- Amortiguador 5X (Promega)
- DTT 0.1M (Invitrogen)

- Enzima MMLV-RT (Promega)
- DNTP'S 5mM (Invitrogen)
- Oligo dT (Promega)
- H2O libre de RNAsas (Fermentas)
- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)
- DNTP'S 10 mM (Invitrogen)
- Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)
- Primers: - actina (1:5), Caspasa -8 (1:5), Caspasa -12 (1:5) (Unipars S.A)
- H2O libre de RNAsas (Fermentas)
- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1.5 por ciento
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga Blue/yellow 6X (promega)
- Bromuro de etidio

Preparación de Reactivos y Soluciones

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El suero fetal bovino (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57 °C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

Solución fisiológica de Verseno

Esta solución se emplea para desprender las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

- Tris base 3.04 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.04 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Etilen -diamen-tetra-acético (EDTA) 0.40 g (sigma chemical Co.U.S.A)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

- Cloruro de magnesio 0.10 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de calcio 0.10 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.20 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato monoácido de sodio 2.16 g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato diácido de potasio 0.20 g (sigma chemical Co.U.S.A)

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

DNTPS 10 mM (MIX)

Todos los nucleótido se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

- A 100µl (Invitrogen S.A de CV)
- G 100 µl (Invitrogen S.A de CV)
- T 100 µl (Invitrogen S.A de C.V)
- C 100 µl (Invitrogen S.A de C.V)

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de Rnasas para obtener 1 mL a una concentración de 10mM.

TBE 10X

- Tris base 108g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Ácido bórico 55g (sigma chemical Co.U.S.A)

- EDTA 0.5 M 40 mL. (sigma chemical Co.U.S.A)

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas.

Se almacena a Temperatura Ambiente hasta su uso. TBE 1X

Tomar 50 mililitros de TBE 10X y diluirlo en 450mililitros de agua destilada. TBE 0.5X

Tomar 250mililitros de TBE 1X y diluirlo en 250mililitros de agua destilada.

Tripsina

Este reactivo se emplea para despegar a las células tumorales adherentes (Hela y SiHa). Su preparación consiste en: pesar 100 mg de tripsina (Sigma-Aldrich; USA), en condiciones estériles se disuelve en 200 mL de verseno y se almacena a 4°C hasta su uso. Colorante cristal violeta al 0.1 por ciento (m/v). Reactivo utilizado para teñir a las células tumorales se: Preparan 500 mL de una solución de ácido fórmico 200 mM, ajustar el pH a 6 con una solución de NaOH 2 M y disolviendo el colorante cristal violeta. Finalmente se filtra y posteriormente se usa. Paraformaldehído al 2 por ciento. Reactivo utilizado para fijar las células tumorales: se pesan 10 gr de paraformaldehído, se disuelven en 500 mL de PBS, se calienta la solución a una temperatura no mayor a 60 °C (si se rebasa esta temperatura, el paraformaldehído se polimeriza y la solución no sirve para fijar). Mezcla de reacción del kit Citotox 96 ® Non-Radioactive Citotoxicity Assay Kit (Promega, USA). Mezcla que contiene Substrate Mix y Assay Buffer incluidos en el kit.

B

Bibliografía

- Arbuck SG, Blaylock BA, (1995). Taxol: clinical results and current issues in development. In: Suffness M (ed), Taxol: Science and Applications. *CRC Press, Boca Raton, Florida*. 415:379
- A.M. Jabbour, J.E. Heraud, C.P. Daunt, T. Kaufmann, J. Sandow, L.A. O'Reilly, B.A. Callus, A. Lopez, A. Strasser, D.L. Vaux, P.G. Ekert, (2009) Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim, *Cell Death Differ*. 16:555-563.
- Acehan. D. ET AL. (2002). Three dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9:423- 432.
- Akulapalli S., 2009, History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods, *J Cancer Sci Ther*. 1-7.
- American Cancer Society (2018) Consultado el 02 de junio de 2018 en: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html>
- Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. (2001) The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 37;2:246-50.

- Armstrong, D. K., J. T. Isaacs, et al. (1992). "Programmed cell death in an estrogen-independent human breast cancer cell line, MDA-MB-468." *Cancer Res* 52(12): 3418-3424.
- Ashrafi, G. H., Haghshenas, M., Marchetti B. y Campo, M. S. (2006). E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer*, 119, 2105-12.
- B.A. Perry, K. Hansen, D.H. Pfister, (2007) A phylogenetic overview of the family *Pyronemataceae* (Ascomycota, Pezizales), *Mycol. Res.* 111 549-571.
- Bacon, C. W., and J. F. White. (2000). Microbial endophytes. *Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.*
- Bashyal, B., J. Y. Li, G. A. Strobel, and W. M. Hess. (1999). Seimatoantlerium nepalense, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew (*Taxus wallichiana*). *Mycotaxon* 72:33-42.
- Baker CC, et al., (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 61: 962-971
- Belletti B., Nicoloso M. S., Schiappacassi M., Chimienti E., Berton S., Lovat F., Colombatti A. y Baldassarre G. (2005). "p27kip1 Functional Regulation in Human Cancer: A Potential Target for Therapeutic Designs". *Bentham Science Publishers Ltd. Current Medicinal Chemistry.* 12:1605.
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., Van doorslaer, K., Zur Hausen, H. y DE Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 40:70-9.
- Bernsdorff, R. Reszka, R. Winter. (1999) Interaction of the anticancer agent Taxol (paclitaxel) with phospholipid bilayers, *Journal of biomedical materials research*, 46:141-149

- Berek Jonathan S. y Hacker Neville F. (2005). “Ginecología oncologica practica”. *Mc Graw Hill. 4a ed. Mexico.* 908.
- Bills, G., A. Dombrowski, F. Pelaez, J. Polishook, and Z. An. (2002). Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi .165–194.
- Bouvard, V., Baam, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., EL Ghissassi, F.,. (2009). A review of human carcinogens–Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, 10:321-2.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. L. M. y Shah, K. V. (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244-265 .
- Bosslet K, Straub R, Blumrich M, *et al.* (1998). Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res*; 58:1195-201.
- Caballero A. y Moran J. (2002). “Mecanismos moleculares de la regulacion de la muerte apoptotica”. *Revista de Educación Bioquímica.* 21;4:243
- Studzinski G. P. (1995). “Cell growth and apoptosis A Practical Approach”. *Oxford University Press.* New York. 269.
- Carnero A. (2002). "Targeting the cell cycle for cancer therapy". *British Journal of Cancer.* 87:133 .
- Cotter, T. G. (2009). .Apoptosis and cancer: the genesis of a research field." *Nat Rev Cancer* 9;7:501-507
- D. C. Altieri, Survivin (2008). Cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature Rev. Cancer* 61-70.
- Debnath, J., Baehrecke, E. H., and Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1, 66–74.
- Demain, A. L. (1981). Industrial microbiology. *Science* 214:987–994.

- Dreyfuss, M. M., and I. H. Chapela. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals, 49–80.
- Ding, G. et al. Chaetoglobosin U, (2006) a cytochalasan alkaloid from endophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019. *J. Nat. Prod.* 69:302–304 .
- Doorbar, J. et al., (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70
- E.M.K. Wijeratne, et al., (2015). Structure-Activity Relationships of Geopyxins and Their Analogues, *J. Nat. Prod.* 75:361-369.
- E.M.K. Wijeratne, Y. Xu, A.E. Arnold, and A.A.L. Gunatilaka, (2015). Pulvinulin A, Graminin C, and cis-Gregatin B – new natural furanones from *Pulvinula* sp. 11120, a fungal endophyte of *Cupressus arizonica*, *at. Prod. Commun.* 10:107–111
- Ernst, M. K., L. L. Dunn, et al. (1995). "The PEST-like sequence of I kappa B alpha is responsible for inhibition of DNA binding but not for cytoplasmic retention of c-Rel or RelA homodimers." *Mol Cell Biol* 15;2:872-882
- Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst.* 6;86:527-37.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., and Orlandini, S. Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41–9.
- Flores Zoila R.B., (2009). .Aislamiento e identificación de microorganismos asociados al tejo mexicano(*Taxus globosa*) y estudio de su capacidad para producir taxol. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

- G. Damia, L. Filiberti, F. Vikhanskaya, L. Carrassa, Y. Taya, M. D'incalci, M. Brogini (2001). Cisplatinum and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation, *Neoplasia* 3 10-16
- De vuyst, H. *et al.*, (2009). Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*, 124:1626-36.
- G. L. Tan, H.Q. Li, J. B. Chen, M. Jiang, Y.H Ma, X.H. Liu, H. Sun, G.Y. Li (2002). Apoptosis induced by low-dose paclitaxel is associated with p53 upregulation in nasopharyngeal carcinoma cells, *Int. J. Cancer*, 97:168-172
- Kusari, S., Hertweck, C. and Spiteller, M. (2012) Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem and Biol.* 19:792-798.
- G. Minotti, et al., (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacological reviews*, 56:185-229.
- G. Soca-Chafre, F.N. Rivera-Orduña, M.E. Hidalgo-Laraa, C. Hernandez-Rodriguez, R. Marsch, L.B. Flores-Cotera (2011). Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*, *Fungal Biol.* 115:143–156.
- G.A. Strobel (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22:315-333
- GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. [Internet]. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality, prevalence and disability-adjusted life years worldwide in 2012.
- Gordaliza, M., (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* 9:767–776.

- Gueritte, F. and Fahy, J. In *The Vinca Alkaloids* (eds Cragg, G. M., Kingston, D. G. I. and Newman, D. J.) 123–136 (*Anticancer Agents from Natural Products* Taylor and Francis, Boca Raton, 2005).
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100 1:57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144:5:646-674.
- Hall M. N., Raff M. y Thomas G., 2004. "Cell Growth. Control of cell size". *Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York*. 100.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth." *Nat Rev Cancer* 2 1:38-47
- Hartzell H. (1991). *The yew tree, a thousand whispers. Biography of a species. Hulogosi Books, Communication, Inc. Eugene, Oregon, U.S.A.*
- Hawksworth, D. C., and A. Y. Rossman. 1987. Where are the undescribed fungi? *Phytopathology* 87:888–891
- Hetts, S. W. (1998). "To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease." *JAMA* 279;4:300-307.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15:1573–81.
- Hoffman, A., W. Khan, J. Worapong, G. Strobel, D. Griffin, B. Arbogast, D. Borofsky, R. B. Boone, L. Ning, P. Zheng, and L. Daley. (1998). Bioprospecting for taxol in angiosperm plant extracts. *Spectroscopy* 13:22–32.
- Holton R. A. et al. (1994). "First Total Synthesis of Paclitaxel." *Journal of the American Chemical Society*. 23 February 1994:1597-1598.

- Horvitz, H. R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59, 1701s–1706s.
- In R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. Issac, and C. H. Robinson. (ed.), *Tropical mycology: micromycetes*, vol. 2. CABI Publishing, New York, N.Y
- J. Pflaum, S. Schlosser, M. Müller, (2014). p53 family and cellular stress responses in cancer. *Front Oncol.* 21:285.
- J. Wei, D. Persoh, R. Agerer, (2010). Four ectomycorrhizae of *Pyronemataceae* (*Pezizomycetes*) on Chinese Pine (*Pinustabulaeformis*): morpho-anatomical and molecular-phylogenetic analyses, *Mycol. Prog.* 9:267-280.
- J.K. Harper, A.M. Arif, E.J. Ford, G.A. Strobel, J.A Porco, D.P. Tomer, K.L. O'Neill, E.M. Heider, D.M Grant, (2003). Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 59:2471-2476.
- J.S. Fridman, S.W Lowe, (2003). Control of apoptosis by p53, *Oncogene* 22:9030-9040.
- K. Hansen, B.A. Perry, A.W. Dranginis, D.H. Pfister, (2013). A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family *Pyronemataceae* *Pezizomycetes*, *Ascomycota* clarifies relationships and evolution of selected life history traits, *Mol. Phylogenet. Evol.* 67:311–335
- Kerr, J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 71–4:181–182.
- L. Tedersoo, K. Hansen, B.A. Perry, R. Kjoller, (2006). Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhizal, *New Phytol.* 170: 581-596.

- L.F. Qin, I.O.L. Ng, (2002). Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells, *Cancer Lett.* 175: 27-38.
- Lizano, Soberon Marcela, Carrillo, Garcia Adela y Contreras, Paredes Adriana. (2009). Infección por Virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. Unidad de Investigación Biomédica en Cancer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. *Cancerología* 4:205-216.
- Kharwar, R. N., Mishra, A., Gond, S. K., Stierle, A. and Stierle, D. (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod.* 28:1208–1228.
- Kreimer, A. R., CLIFFORD, G. M., BOYLE, P. and FRANCESCHI, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14:467-75.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller J (1992). T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15;89(24):12180-4.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al., (2002) A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*. 21;347:1645-51.
- Lavey, C. J., Lowndes, C. M. and Shah, K. V. (2006). Chapter 4: Burden and management of noncancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*, 24;3:35-41.
- Lázaro Germán, J.D., (2014). “Actividad antiproliferativa en células HeLa y CaSki de extractos y exudados de hongos endófitos del tejo mexicano (*Taxus*

globosa)." Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

- L.N. Zhang, J.Y. Li, W. Xu, (2013). A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Gene Ther.* 20:1-7.
- Lee, J. C., G. A. Strobel, E. Lobkovsky, and J. C. Clardy. (1996). Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *J. Org. Chem.* 61:3232–3233
- Levine, A. J. and M. Oren (2009). "The first 30 years of p53: growing ever more complex." *Nat Rev Cancer* 9;10:749-758.
- Li, C., R. P. Johnson, and J. A. Porco. (2003). Total synthesis of the quinine epoxide dimer (-)-torreyanic acid: application of a biomimetic oxidation/ electrocyclization/Diels-Alder dimerization cascade. *J. Am. Chem. Soc.* 125:5059–5106.
- Li, J. Y., G. A. Strobel, R. Sidhu, W. M. Hess, and E. Ford. (1996). Endophytic taxol producing fungi from Bald Cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology* 142:2223–2226
- Li, J. Y., R. S. Sidhu, E. Ford, W. M. Hess, and G. A. Strobel. (1998). The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *J. Ind. Microbiol.* 20:259–264
- Liontas, H. Yeger, (2004). Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma, *Anticancer Res.* 24:987-998
- Liu K, Ding X, Deng B, Chen WQ, (2009). Isolation and characterization of endophytic Taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36:1171-1177.

- Lizano, Soberón Marcela, Carrillo, García Adela y Contreras, Paredes Adriana. (2009). Infección por Virus del Papiloma Humano: Eidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. *Cancerología* 4:205-216.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S., L., Matsudaira P., Baltimore D. y Darnell J. E. (2002). "Molecular Cell Biology". *WH Freeman and Company* 5:973.
- Malumbres M, Carnero A (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle*. 5:5-18.
- M. Qadri, S. Johri, B.A. Shah, A. Khajuria, T. Sidiq, S.K. Lattoo, M.Z. Abdin, S. Riyaz-Ul-Hassan, (2013) Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas, *SpringerPlus* 2 art number 8.
- M.A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, J.M. Prez, (2003). Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways, *Current medicinal chemistry*. 10:257-266.
- Mans, D.R., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* .5:185-198
- Mihara, M., S. Erster, et al. (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." *Molecular Cell* 11;3:577-590.
- Mitscher, L. A.; Drake, S.; Gollapudi, S. R.; Harris, J. A.; and Shankel, D. M. (1986). In Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms; Shankel, D. A., Hartman, P. A., Cotta, T., Hollaender, A., Eds; *Plenum Press* 153-165.

- Mittermeier, R. A., N. Meyers, P. R. Gil, and C. G. Mittermeier. (1999). Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions. *Toppan Printing Co.*
- Moody, C. A. and LAIMINS, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10:550-60.
- Mow, B. M., A. L. Blajeski, et al. (2001). "Apoptosis and the response to anticancer therapy." *Curr Opin Oncol* 13;6:453-462.
- Morgan DO, (2007). The cell cycle: principles of control. *London: New Science Press.*
- Munoz, N., Castellsague, X., De gonzalez, A. B. and Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24;3:1-10.
- Murray A. y Hunt T. 1993. "The Cell Cycle an introduction". Oxford University. New York. 11 pp
Alfaro M. E., Garcia C. C. y Duenas G. A. 2000. "Metodos de deteccion de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones". *Revista del Instituto Nacional de Cancerologia*. Vol. 46. Num. 4. 280 pp.
- Nicolaou K. C., Yang Z., Liu J.J, Ueno H., Nantermet P.B., Guy R.K., Claiborne C.F., Renaud J., Couladouros E.A., Paulvannin K., Sorensen E. J. (1994). Total Synthesis of paclitaxel. *Nature*. 367:630-634.
- Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* .41:367-401.
- Patel R.N.(1998). Tour de Paclitaxel. *Annu. Rev. Microbiol*. 98:361-395
- Pater MM, Pater (1985). A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145:313-318.
- Panwar, A., BATRA, R., LYDIATT, W. M. and GANTI, A. K. (2013). Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: *A growing epidemic. Cancer Treat Rev.*

- P. Bragado, A. Armesilla, A. Silva, A. Porras, (2007). Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 alpha MAPK activation through ROS generation, *Apoptosis* 12:733-1742.
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:72–5
- Polyak, K., Y. Xia, et al. (1997). .^ model for p53-induced apoptosis." *Nature* 389;6648:300-305
- Pommier, Y., O. Sordet, et al. (2004). .^apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks." *Oncogene* 23;16:2934-2949.
- Pyeon, D. et al., (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*, 5;1000318.
- Puri, S. C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G. N. and Spiteller, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.* 68:1717–1719.
- Qi FH, Jing TZ, Wang ZX, Zhan YG, (2009). Fungal endophytes from *Acer ginnala* Maxim: isolation, identification and their yield of gallic acid. *Letters in Applied Microbiology* 49:98-104.
- Ramachandran C, Melnick SJ. (1999). Multidrug resistance in human tumors—molecular diagnosis and clinical significance. *Mol Diagn* 4:81-94.
- R.J. Youle, A. Strasser, (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:47-59.
- Rositch, A. F., Koshiol, J., Hudgens, M. G., Razzaghi, H., Backes, D. M., Pimenta, J. M., Franco, E. L., Poole, C. and Smith, J. S. (2013). Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 133:1271-85.

- Redell, P., and V. Gordon. (2000). Lessons from nature: can ecology provide new leads in the search for novel bioactive chemicals from rainforests?, 205–212.
- Robert A., Stephanie F. y Kenneth P., (2006). Simulating the hallmarks of cancer, *Artificial life*, 12:617-634.
- Rodriguez, R. White, J., Arnold A.E. and Redman, R (2009). fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New. Phytol.*182:14-330
- Rubini, B. Belfiori, V. Passeri, L.B. Falini, S. Arcioni, C. Riccioni, F. Paolocci, (2011). The AD-type ectomycorrhizas, one of the most common morphotypes present in truffle fields, result from fungi belonging to the *Trichophaea woolhopeia* species complex, *Mycorrhiza* 21:17-25.
- R.P. Shefferson, T. Kull, K. Tali, (2008). Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills, *Am. J. Bot.* 95:156-164.
- R. W. Bradford and H. W. Allen (1992). The Primordial Thesis of Cancer *Medical Hypotheses* 37:20-23
- S.B. Horwitz,(1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action, *Ann Oncol.* 5;6:S3-6
- S.H. Zhang, Q. Huang, Etoposide induces apoptosis via the mitochondrial- and caspase-dependent pathways and in non-cancer stem cells in Panc-1 pan
- S.S. Bacus, A.V. Gudkov, M. Lowe, L. Lyass, Y. Yung, A.P. Komarov, K. Keyomarsi, Y. Yarden, R. Seger, (2001). Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53, *Oncogene* . 20:147-155.
- Shemluck M, Nicholson R, Estrada E, Brobst S, (2003). A preliminary study of taxane chemistry and natural history of the Mexican yew, *Taxus globosa*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 72:119-127

- Schiff, P. B., and S. B. Horowitz. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:1561–1565.
- Schillett, J. T., Day, P. M. and Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*, 118:2-7.
- Schulz BU, Wanke U, Drager S, Aust HJ, (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* 97:1447-1450.
- Schutz, B. (2001). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites, In British Mycological Society, international symposium proceedings: bioactive fungal metabolites—impact and exploitation. University of Wales, Swansea, Wales. *creatic cancer cells, Oncol.* 30 .2765-2770
- Shrestha, K., G. A. Strobel, S. Prakash, and M. Gewali. (2001). Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal. *Planta Med.* 67:374–376.
- Simonovicova, A. Novakova, D. Pangallo, V. Hnatova, V. Hubka, (2014). The occurrence of heat-resistant species of *Trichophaea abundans* in different types of soil in Slovakia and Czech Republic, *Biologia* 69:168-172.
- Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14376–81.
- Stanley, M. (2010)a. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*, 5:19.
- Stanley, M. (2010)b. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*, 117:5-10
- Stierle, A. A. and Stierle, D. B. (2000) *Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman* 24:933–977 .

- Stierle, A., G. A. Strobel, and D. Stierle. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science* 260:214–216.
- Stinson, M., D. Ezra, and G. Strobel. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Sci.* 165:913–922. 55.
- Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R. S. Sidhu, and W. M. Hess. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* 142:435–440
- Strasser, A., A. W. Harris, et al. (1990). "Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2." *Nature* 348;6299: 331-333.
- Strobel G, Daisy B, (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:491-502
- Strobel, G. A. (2002). Microbial gifts from rain forests. *Can. J. Plant Pathol.* 24:14–20.
- Strobel, G. A., A. Stierle, D. Stierle, and W. M. Hess. (1993). *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbiferous *hyphomycete* associated with Pacific yew. *Mycotaxon* 47:71–78.
- Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R. S. Sidhu, and W. M. Hess. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* 142:435–440
- Suffness, M. (1995). Taxol, science and applications. *CRC Press, Boca Raton, Fla.*
- Suffness, M., Douros, J., (1982). Current status of the NCI plant and animal product program. *Journal of Natural Products* 45:1–14.

- Suffness, M., Pezzuto, J.M., (1990). Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity* 6:71–133
- Tan, R. X. and Zou, W. X. (2001): Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod.* 18, 448-459(2001)
- T. Abbas, A. Dutta, (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Rev. Cancer* 9:400-414.
- . Gallenne, F. Gautier, L. Oliver, E. Hervouet, B. Noel, J.A. Hickman, O. Geneste, P.F. Cartron, F.M. Vallette, S. Manon, P. Juin, (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members, *J. Cell Biol.* 185:279-290.
- Taylor EW, Francis group. (2004). The health Professional's VPH HANDBOOK,1: Human papillomavirus and cervical cancer: *The European Consortium of Cervical Cancer education.*
- T.A. Chan, P.M. Hwang, H. Hermeking, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, (2000). Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint, *Genes Dev.* 14:1584-1588.
- T.H. Wang, H.S. Wang, Y.K. Soong, (2000). Paclitaxel-induced cell death - Where the cell cycle and apoptosis come together, *Cancer* 88:2619-2628
- Tan, R. X., and W. X. Zou. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18:448–459
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* 267;5203:1456-1462.
- U.F. Castillo, G.A. Strobel, K. Mullenberg, M.M. Condrón, D.B. Teplow, V. Folgiano, M. Gallo, R. Ferracane, L. Mannina, S. Viel, M. Codde, R.

- Robison, H. Porter, J. Jensen, (2006). Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. *FEMS Microbiol. Lett.* 255:296-300.
- Wang, J., G. Li, H. Lu, Z. Zheng, Y. Huang, and W. Su. (2000). Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 193:249–253.
 - W.R. Taylor, G. R. Stark, (2001). Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene.* 20:1803-1815.
 - Wagenaar, M., J. Corwin, G. A. Strobel, and J. Clardy. (2000). Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. *J. Nat. Prod.* 63:1692–1695.
 - Wall, M. E.; Wani, M. C. Abstracts of Papers, 153rd National Meeting of the American Chemical Society, Miami, Beach, FL 1967; No. M-006.
 - Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, H. T.; Sim, G. A. (1966) Abstracts of Papers *J. Am. Chem. Soc.* , 88:3888-3890.
 - Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, (1971) Abstract of papers *Am. Chem. Soc.* , 93:2325-2327.
 - Washington Insight, Persinos, E., Ed.; Sept. 15, 1990
 - Wilson, D (1995). Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos.* 73,274-276.
 - Williams, D. H.; Stone, M. J.; Hauck, P. R.; Rahman, S. K. *J. Nat. Prod.* 52:1189-1208.
 - Woodbury, A. M.; Wall, M. E.; Willaman, J. J. *J. Econ. Bot.* 15: 79-86.
 - Wu, C.-G. and W. Kimbrough, J., (1996). Ultrastructure of Spore Ontogeny in Species of *Trichophaea* (Pezizales). *International Journal of Plant Sciences,* 157;5:595–604.

- Y. Matsuda, Y. Noguchi, S. Ito, (2009). *Ectomycorrhizal* fungal community of naturally regenerated *Pinus thunbergii* seedlings in a coastal pine forest, *J. For.* 14:335-341.
- Young, D. H., E. J. Michelotti, C. S. Sivendell, and N. E. Krauss. (1992). Antifungal properties of taxol and various analogues. *Experientia* 48:882– 885.
- Yousef Ahmed Foua1 , Carmen Aanei (2017). Revisiting the hallmarks of cancer *Am J Cancer*7;5:1016-1036
- Z. Wang, Y. Sun, (2010). Targeting p53 for novel anticancer therapy, *Transl. Oncol.* 3:1-12
- Zamudio Ruiz, S. (1992). Familia *Taxaceae*. En: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Instituto de Ecología. Patzcuaro*,9:7.
- Zhang P, Zhou PP, Yu LJ, (2009). An endophytic Taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology* 59:227-232.
- Zhao K, Ping W, Li Q, Hao S, Zhao L, Gao T, Zhou D, (2009). *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of Taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China. *Journal of Applied Microbiology* 4:1202-1207.
- Zhong JJ, (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Review. Journal of Bioscience and Bioengineering* 94:591-599.
- Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 40:481–95.