

**González Jiménez
Martha Elena**

**“Estandarización de métodos para la obtención de extractos
fúngicos de distintas polaridades y para el crecimiento de
una línea celular de cáncer de mama”.**

2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química



**“Estandarización de métodos para la obtención de
extractos fúngicos de distintas polaridades y para el
crecimiento de una línea celular de cáncer de mama”.**

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de:

Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

Martha Elena González Jiménez

Dirigido por:

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina

Co-Director:

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Querétaro, Qro. a 11 de Diciembre del 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica



“Estandarización de métodos para la obtención de extractos
fúngicos de distintas polaridades y para el crecimiento de una línea
celular de cáncer de mama”.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta:

Martha Elena González Jiménez

Dirigido por:

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina

Co-dirigido por:

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina

Presidente

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Secretario

Dr. Miguel Angel Ramos López

Vocal

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Suplente

Dr. Juan Campos Guillen

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Diciembre, 2020.
México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

AGRADECIMIENTOS

“La vida es aprender siempre, en todas partes y hasta el final”.
Anónimo.

La posibilidad de cursar la Maestría en Química Clínica Diagnóstica, realizar el trabajo de investigación y la redacción de esta tesis, ha sido gracias al apoyo económico y moral de varias instituciones y personas; por ello quisiera expresar mis agradecimientos:

A la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina, que me ha guiado y exigido desde el ejemplo de su dedicación. Gracias por la confianza depositada en mí, por sus consejos, por sus palabras de aliento y por la paciencia infinita demostrada durante estos dos años llenos de enseñanzas y de trabajo. Sobre todo, gracias por la maravillosa oportunidad de superar mis expectativas profesionales y trazarme nuevos retos.

Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, por abrirme las puertas a su segundo hogar y hacerme sentir parte de él. Ha sido un placer trabajar a su lado, siempre atento a mis necesidades. Compartiéndome sus conocimientos, brindándome su tiempo en todo momento para aclarar dudas y darme consejos para la realización del presente trabajo. No existen palabras que expresen la gratitud que tendré siempre con usted, me siento muy honrada y afortunada por contar con su amistad.

A mis profesores, la Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez, el Dr. Juan Campos Guillén y al Dr. David Gustavo García Gutiérrez; gracias por su gran dedicación e invaluable contribución a mi formación tanto profesional como personal. Gracias por aterrizar los alcances de mi trabajo de investigación y por sus valiosos aportes. Desearía que el mundo no se hubiese detenido por la contingencia sanitaria y entregarles un trabajo a la altura de sus expectativas que son mías también. Gracias por su disposición a escuchar y sobre todo a enseñar y ayudar.

Al Dr. Miguel Angel Ramos López, guerrero de vida! Gracias por enseñarme que siempre habrá una mano amiga dispuesta a colaborar. Gracias por aceptar ser parte de este sueño, por el tiempo brindado y sugerencias para la mejora de este trabajo, por permitirme entrar a su laboratorio y compartir sus recursos y conocimientos conmigo.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por brindarme la posibilidad de realizar una estancia de investigación, punto crucial para la realización de este proyecto de tesis.

Al Mtro. Armando y la Dra. Griselda, gracias por todo el apoyo y acompañamiento en la maravillosa experiencia que ha sido estar en una institución de primer nivel. Pero sobre todo, mi entero agradecimiento al Mtro. Alfonso. Gracias Poncho! por tu amistad, por tus enseñanzas profesionales y de vida. Gracias por tu ejemplo, me has demostrado que aunque las circunstancias sean adversas, lo importante es el empeño y la voluntad de seguir adelante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante los dos años de estudio.

A mi amada familia; especialmente a ti Mamá, mi tabla en el naufragio y mi faro en la tormenta. Sin ustedes no hubiese sido posible. Porque con ustedes ¡todo! y sin ustedes ¡nada!, espero hacerlos sentir felices y orgullosos como yo lo estoy.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	6
Índice de figuras.....	7
Resumen.	10
1. Planteamiento del problema y justificación.	12
2. Antecedentes.	13
2.1 Cáncer de Mama.	13
2.2 Cáncer de mama triple negativo.	15
2.3 Proceso de apoptosis en CMTN.	18
2.4 Metabolitos fúngicos y su actividad antitumoral.	23
3. Objetivos.	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. Materiales y Métodos.	29
4.1 Obtención de muestras.....	29
4.2 Estandarización de las condiciones de cultivo <i>in vitro</i> de las especies fúngicas <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp.....	29
4.3 Evaluación de las condiciones de extracción de los compuestos producidos por <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp., durante su cultivo <i>in vitro</i>	34
4.4 Generación de las condiciones de cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M.	41
4.5 Análisis estadístico.	47

5. Resultados y discusión	48
5.1 Condiciones del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp.	48
5.2 Evaluación de la extracción consecutiva por sonicación con metanol y hexano.	57
5.3 Cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M.	67
6. Conclusiones	72
7. Bibliografía	73

Dirección General de Bibliotecas de la UAO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación molecular y generalidades del CM.....	14
Tabla 2.	Clasificación, distribución y características generales del CMTN.....	16
Tabla 3.	Taxonomía de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp..	25
Tabla 4.	Condiciones de trabajo para el análisis mediante HPLC-DAD.	39
Tabla 5.	Resultados de la conidiación de las tres especies en PDA....	48
Tabla 6.	Formulación por litro de agua de los medios de cultivo evaluados.....	54
Tabla 7.	Micelio recuperado de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp ..	58
Tabla 8.	Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólico y hexánico.....	59
Tabla 9.	Condiciones de gradiente propuestos para el análisis de los extractos por LC-DAD.....	63
Tabla 10.	Viabilidad y proliferación celular de la línea BT-549, a las 48 h de cultivo.....	67
Tabla 11.	Distribución de fases del ciclo celular de la línea BT-549 a las 48 h de cultivo.....	71
Ecuación 1.	Fórmula para el recuento celular en cámara de Neubauer.....	31
Ecuación 2.	Fórmula de porcentaje de rendimiento de extracción.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vía extrínseca e intrínseca del proceso de apoptosis.....	19
Figura 2.	Vías de señalización de EGF y sus efectos en los procesos celulares.....	22
Figura 3.	Determinación del número de conidios/mL.....	30
Figura 4.	Esquema de trabajo para el cultivo en medio sólido de agar PDA.....	32
Figura 5.	Esquema de trabajo para el cultivo en medio líquido de Pontecorvo.....	33
Figura 6.	Proceso de extracción con hexano, a partir de cultivos en PDA.....	35
Figura 7.	Proceso de extracción con metanol, a partir de cultivos de PDA.....	37
Figura 8.	Proceso de extracción de los compuestos fúngicos, a partir de cultivos en medio líquido de Pontecorvo.....	38
Figura 9.	Proceso de análisis de los extractos en HPLC-DAD.....	39
Figura 10.	Esquema de trabajo para el cultivo celular de la línea BT-549...	43
Figura 11.	Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de azul de tripano.....	44
Figura 12.	Diseño para el subcultivo celular, en placa de 24 pocillos.....	45
Figura 13.	Esquema de trabajo para el análisis del ciclo celular por	
Figura 14.	citometría de flujo.....	47
Figura 15.	Cosecha de conidios de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp.....	49
Figura 16.	Morfología de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp...	50
Figura 17.	Cultivo de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp. en PDA.....	51

Figura 18.	Cultivo de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp., en medio líquido de Pontecorvo	52
Figura 19.	Eliminación del contenido de agua en cultivos de medio líquido de Pontecorvo.....	57
Figura 20.	Recuperación de micelio de <i>Cladosporium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., y <i>Penicillium</i> sp.....	58
Figura 21.	Máximos de absorción de los extractos metanólico y hexánico..	62
Figura 22.	Espectros cromatográficos de los extractos hexánicos por HPLC-DAD.....	65
Figura 23.	Espectros cromatográficos de los extractos metanólicos por HPLC-DAD.....	66
Figura 24.	Histogramas de la distribución de fases del ciclo celular.....	70

Resumen.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN), es uno de los cuatro subtipos del cáncer de mama (CM), principal neoplasia que afecta a mujeres en todo el mundo. La enfermedad residual y quimioresistencia, debido a alteraciones en proteínas implicadas en el proceso de apoptosis, son los factores que finalmente cobran la vida de estas pacientes. La evidencia acumulada respalda la capacidad de los hongos filamentosos, para producir metabolitos secundarios con actividad biológica sobre los procesos de apoptosis, en modelos celulares. Dada la importancia, de la estandarización de métodos que garanticen la calidad en las investigaciones, en el presente trabajo, se determinaron las condiciones de cultivo *in vitro* de las especies de hongos filamentosos *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., mediante la evaluación de los métodos de cultivo en agar sólido de PDA y medio líquido de Pontecorvo; en donde el cultivo en PDA permitió el óptimo crecimiento de las tres especies fúngicas, sin afectar la conidiación y desarrollo vegetativo. Así como también, se evaluaron las condiciones para una extracción sucesiva por sonicación, a una frecuencia de 40 kHz durante 30 minutos a 30°C, con los disolventes hexano y metanol, obteniendo un mayor rendimiento en los extractos metanólicos respecto a los obtenidos con hexano, para los tres hongos estudiados. Finalmente se estandarizaron las condiciones de cultivo de la línea BT-549 de CMTN subtipo M en placa de 24 pocillos, determinando que una concentración de 2×10^5 células, es idónea para llevar a cabo la evaluación del efecto de los extractos metanólico y hexánico de las especies aquí estudiadas, en esta línea celular, debido a que se mantuvo la viabilidad de partida evaluada mediante el ensayo azul de tripano y que durante el análisis la distribución de fases del ciclo celular por citometría de flujo presentó el 3.12% de apoptosis después de 48 horas de cultivo. La información obtenida en el presente trabajo, nos permite el desarrollo de protocolos que evalúen la actividad biológica de los extractos en la línea BT-549 de CMTN subtipo M.

Palabras clave: CMTN, BT-549, apoptosis, extractos fúngicos.

Abstract.

Triple negative breast cancer (TNBC) is one of the four subtypes of breast cancer (MC), the main neoplasm that affects women throughout the world. Residual disease and chemoresistance, due to alterations in proteins involved in the apoptosis process, are the factors that ultimately claim the lives of these patients. Accumulated evidence supports the ability of filamentous fungi to produce secondary metabolites with biological activity on apoptosis processes, in cell models. Given the importance of the standardization of methods that guarantee quality in the investigations, in the present work, the in vitro culture conditions of the filamentous fungi species *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., and *Penicillium* sp., by evaluating the culture methods on solid PDA agar and Pontecorvo liquid medium; where the PDA culture allowed the optimal growth of the three fungal species, without affecting the conidia and vegetative development. As well as, the conditions for a successive extraction by sonication were evaluated, at a frequency of 40 kHz for 30 minutes at 30 ° C, with the hexane and methanol solvents, obtaining a higher yield in the methanolic extracts compared to those obtained with hexane. , for the three fungi studied. Finally, the culture conditions of the BT-549 line of CMTN subtype M were standardized in a 24-well plate, determining that a concentration of 2×10^5 cells is ideal to carry out the evaluation of the effect of the methanolic and hexane extracts of the species studied here, in this cell line, due to the fact that the initial viability evaluated by the trypan blue assay was maintained and that during the analysis the distribution of phases of the cell cycle by flow cytometry presented 3.12% apoptosis after 48 hours cultivation. The information obtained in the present work allows us to develop protocols that evaluate the biological activity of the extracts in the BT-549 line of CMTN subtype M.

Keywords: CMTN, BT-549, apoptosis, fungal extracts.

1. Planteamiento del problema y justificación.

El Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020, emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Tiene como objetivo reducir para el año 2025, el 25% de la mortalidad prematura causada por estas enfermedades, entre ellas el cáncer de mama (CM), principal neoplasia que afecta a las mujeres, y que de no atenderse se proyecta un aumento del 62% para el año 2030 (IARC,2018; OMS, 2019).

Entre los distintos subtipos de CM destaca el cáncer de mama triple negativo (CMTN); presente en aproximadamente el 15% de todos los casos, debido a que afecta a mujeres menores de 40 años, tiene una mayor tasa de recurrencia (34%) tanto local como a distancia respecto a los otros subtipos. También presenta menor supervivencia libre de enfermedad y global; lo que lo vuelve el tumor de mama con peor pronóstico. Se ha documentado que aproximadamente el 40% de las pacientes, desarrolla enfermedad residual y quimioresistencia; debido a la alteración en la función de proteínas implicadas en el proceso de apoptosis. Siendo la enfermedad residual y quimioresistencia, los factores que finalmente cobran la vida de estas pacientes (Lehmann et al., 2016; Hernández et al., 2017).

Por otro lado, cada vez son más los estudios que demuestran el efecto antitumoral de metabolitos de origen fúngico sobre modelos celulares de cáncer de mama, a través de diversos mecanismos (Aly et al., 2008; Wijeratne et al., 2008; Ayers et al., 2011), y dado el reciente aislamiento hongos filamentosos *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. (Calvillo-Medina, et al., 2020), actualmente no existe evidencia de la estandarización de métodos para su cultivo *in vitro* y extracción de compuestos que permitan el desarrollo de protocolos que evalúen la naturaleza y posible actividad biológica en la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M, sentando las bases para investigaciones futuras.

2. Antecedentes.

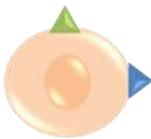
2.1 Cáncer de Mama.

La OMS define el cáncer, como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades, producto de la transformación celular a través de un proceso conocido como carcinogénesis. En el cual, las células van a presentar una multiplicación rápida (iniciación), nutriéndose del organismo y alterando su fisiología (promoción), que le permitirá invadir partes adyacentes y propagación a sitios lejanos en el cuerpo (progresión). En estos sitios, continúan su crecimiento originando metástasis, que en muchas ocasiones es la causa de muerte de los individuos afectados (Martín y Civetta, 2011; Sánchez, 2013; OMS, 2018).

Cuando el proceso de carcinogénesis tiene lugar en el tejido glandular mamario, se denomina cáncer de mama (CM). El cuál es la principal neoplasia que afecta a las mujeres y es el segundo tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial. Tan solo en 2018, de los 43,841,302 de casos cáncer en todo el mundo; 6,875,099 (15.7%) correspondieron a CM. De los cuales 2,088,849 fueron casos nuevos representando una incidencia mundial del 11.6%. En donde México contribuyó con 51,923 casos que corresponde al 26.4%, de los 196,652 casos reportados en la población mexicana para ese año (IARC,2018).

El CM es una enfermedad heterogénea, estableciéndose cuatro subtipos moleculares en función de sus patrones de expresión génica mediante el análisis con microarreglos de ADN; en donde dos de estos cuatro subtipos, el luminal A y el luminal B, se caracterizan por la expresión de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP). Mientras que los otros dos; el subtipo con sobreexpresión de HER2 (receptor epidermídico humano tipo 2) y el subtipo triple negativo (CMTN); se caracterizan por una baja o nula expresión de RE y RP, mostrando diferencias significativas en términos de incidencia, edad al diagnóstico, así como manifestaciones clínico-patológicas diversas e implicación terapéutica y pronóstica entre ellos (Tabla 1) (Imigo et al., 2011).

Tabla 1. Clasificación molecular y generalidades del CM. Modificado de: (Imigo et al., 2011).

SUBTIPO	INMUNOFENOTIPO	ILUSTRACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Luminal A	RE (+) y/o RP (+); HER2 (-)		<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo más común (65% junto con el luminal B) y menos agresivo. • Bajo grado histológico. Buen pronóstico. • Respuesta hormonal. • Asociado al incremento de edad.
Luminal B	RE (+) y/o RP (+); HER2 (+)		<ul style="list-style-type: none"> • Similar aunque con peor pronóstico que el subtipo luminal A. • Más frecuentemente RE (+)/RP(-).
Sobreexpresión de HER2	RE (-) y/o RP (-); HER2 (+)		<ul style="list-style-type: none"> • Presente en el 18-20% de los casos. • Subtipo agresivo. • Alto grado histológico. • Riesgo en menores de 40 años.
Triple Negativo	RE (-) y/o RP (-); HER2 (-)		<ul style="list-style-type: none"> • Menos común (15%). • Subtipo altamente agresivo. Peor pronóstico. • Alto grado histológico e índice mitótico. • Riesgo en menores de 40 años
<p>  RE: Receptor de Estrógenos, Humano Tipo 2  RP: Receptor de Progesterona  HER2: Receptor Epidérmico Humano Tipo 2 </p>			

Entre los distintos subtipos de CM destaca el CMTN; que a pesar de presentarse en aproximadamente solo el 15% de todos los casos, afecta a mujeres más jóvenes y presenta un curso clínico agresivo, ya que son generalmente tumores de gran tamaño, poco diferenciados, con alto grado histológico e índice mitótico y afectación ganglionar. El CMTN, tiene mayor tasa de recurrencia (34%) tanto local como a distancia (la mayoría en los tres primeros años a partir del diagnóstico) y una menor supervivencia libre de enfermedad y

global (5 años) respecto a los otros subtipos de CM; predominando las metástasis viscerales (cerebro y pulmón); lo que lo vuelve el tumor de mama con peor pronóstico (Lehmann et al., 2016; Hernández et al., 2017).

2.2 Cáncer de mama triple negativo.

El CMTN ha sido definido como un “estado inmunohistoquímico con biología y conducta clínica heterogénea” (Hernández et al., 2017). Los factores de riesgo contemplados para su desarrollo, se asocian en gran medida con la historia reproductiva de las pacientes como: una edad más temprana de embarazo, una mayor paridad y ausencia de lactancia materna o lactar menos de 4 meses. Existen controversias sobre el potencial riesgo de los anticonceptivos orales, así como sobre el impacto del índice de masa corporal (IMC). Mientras que el consumo de alcohol y hábito tabáquico parecen no estar relacionados; es más frecuente en mujeres afroamericanas e hispanas y los factores genéticos contemplan mutación positiva en los oncogenes BRCA1/BRCA2 (80 y 25% de riesgo respectivamente) (Anderson et al., 2014; Wang et al., 2020).

Además de la clasificación molecular en subtipos intrínsecos del CM del cual derivó el CMTN, estudios moleculares basados en perfiles de expresión génica en pacientes diagnosticadas con este subtipo, mostraron una elevada heterogeneidad, surgiendo nuevas clasificaciones específicas que lo subdividen en 4 grupos (Cuadro 2): dos de tipo basal (basal-like; BL1 y BL2), un tipo mesenquimal (M) y uno luminal con receptor androgénico (LAR) (Lehmann et al., 2016). Esta heterogeneidad inter e intratumoral presente en el CMTN, pone en evidencia que el tratamiento farmacológico actual con quimioterapia citotóxica basada en la combinación de antraciclinas y taxanos, no se adapta a la biología específica de TNBC y sus subtipos moleculares. Por esta razón, algunas pacientes tienen buena respuesta, mientras que entre el 30-40% en estadio precoz, presentarán recidivas y hasta un 25-35% fallecerán debido a la enfermedad residual tras neoadyuvancia (Abramson et al., 2015).

Tabla 2. Clasificación, distribución y características generales del CMTN.
Fuente:(Lehmann et al., 2016).

SUBTIPO	CARACTERÍSTICAS
BL1 (Basal-Like tipo 1)	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución: 35% • Suelen ser tumores basales puros, de alto grado histológico y alto índice proliferativo. • Presentan aumento en la expresión de genes implicados en vías del ciclo celular, proliferación y de reparación de ADN (ATR/BRCA). • Pueden presentar infra o sobre expresión de genes relacionados con procesos inmunes. • A nivel de IHQ, son CK5 y/o HER1 positivos y Ki67 alto.
BL2 (Basal-Like tipo 2)	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución: 22% • Muestra un aumento en la expresión de genes implicados en vías del ciclo celular, proliferación y de reparación de ADN así como de señalización por factores de crecimiento (Vía EGF, vía NGF, vía MET, Wnt/β-catenina y vía IGF1). • Presentan un aumento en la glucólisis y gluconeogénesis. • Pueden presentar infra o sobre expresión de genes relacionados con procesos inmunes.
M (Mesenquimal)	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución: 25% • Es el grupo con mayor índice proliferativo. • Muestra un aumento en la expresión de genes implicados en vías del ciclo celular, reparación de ADN, diferenciación y motilidad celular, de interacción con la matriz extracelular, transición epitelio-mesenquima, de señalización por factores de crecimiento (Vía EGF, vía NGF, vía MET, Wnt/β-catenina y vía IGF1) y genes asociados a células madre mesenquimales. • Pueden presentar infra o sobre expresión de genes relacionados con procesos inmunes. • A nivel de IHQ, son CK5 y/o HER1 positivos y Ki67 alto.
LAR (Luminal con Receptor de Andrógenos)	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución: 17% • Son mayoritariamente tumores de bajo grado histológico con expresión génica de patrón luminal. • Presenta altos niveles de AR y una elevada expresión de genes implicados en vías de síntesis de esteroides y metabolismo andrógeno/estrógeno. • Aparece en edades más tardías que el resto de CMTN. • La incidencia de metástasis óseas es significativamente mayor que en los otros subtipos (46% vs 16%, $p=0.046$).

ATR: Ataxia Telangiectasia y Rad3, BRCA: Gen supresor de tumores (del inglés, breast cáncer); CK5: Citoqueratina 5, IHQ: Inmunohistoquímica, HER1: Receptor Epidermídico Humano tipo 1, Ki67: Proteína nuclear, EGF: Factor de Crecimiento Epidermídico, NGF: Factor de Crecimiento Nervioso, Wnt: Proteína de señalización (del inglés, Wingless e Int), IGF1: Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 y AR: Receptor de Andrógenos.

Se han logrado grandes avances en la clínica, se ha evaluado la respuesta farmacológica en modelos de líneas celulares representativos para cada uno de los subtipos de CMTN; identificando que los subtipos BL1 y BL2, que presentan una mayor expresión del ciclo celular y los genes de respuesta al daño del ADN, respondieron preferentemente al Cisplatino. Mientras que los modelos celulares del subtipo M que está enriquecido con genes asociados a la transición epitelio-mesénquima (TEM) y las vías del factor de crecimiento (EGF) presentaron buena respuesta a NVP-BEZ235 (un inhibidor PI3K/mTOR) y Dasatinib (un inhibidor *abl/src*) y finalmente, el subtipo LAR que se caracteriza por la señalización del receptor de andrógenos (AR) sus líneas celulares fueron especialmente sensibles al antagonista Bicalutamida. Sumándose a la evidencia de que la respuesta farmacológica está dada en función del subtipo molecular de CMTN que se trate (Abramson et al., 2015).

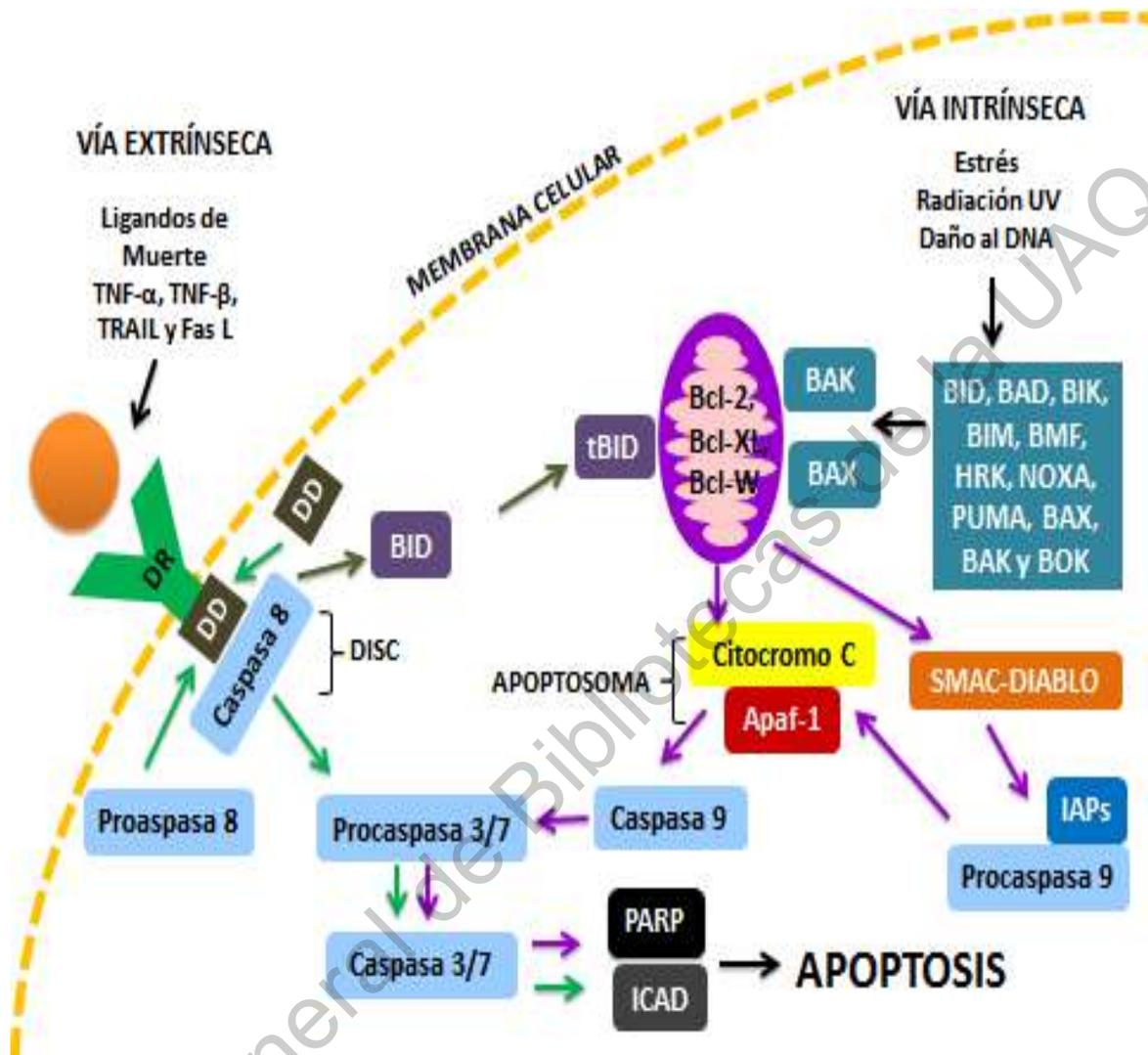
Teniendo estos antecedentes y debido a que las líneas celulares se han utilizado ampliamente para investigar la patobiología del CM, así como para detectar y caracterizar nuevas terapias (Kao et al., 2009; Moreira et al., 2019), uno de los objetivos terapéuticos más prometedores identificados a través de nuevas tecnologías de secuenciación, es el estudio de vías apoptóticas y las alteraciones en los genes implicados en estos procesos (O'Toole et al., 2013). Se ha demostrado que dichas alteraciones, están presentes en el 90% de los casos de la enfermedad residual post-neoadyuvancia en CMTN, perpetuando la proliferación celular (Balko et al., 2014; Sohn et al., 2013). También se ha documentado que la fosforilación de la proteína quinasa antiapoptótica Akt (vía PI3K/Akt pro-survival) mediada por la proteína similar a la kinesina (KIF14), promueve la quimioresistencia a Docetaxel en pacientes con CMTN. Esto es de suma importancia ya que representa el 90% del fracaso en el tratamiento de cánceres metastásicos de CMTN, siendo observada además en mayor medida en pacientes con subtipo molecular M (Reilly et al., 2015).

2.3 Proceso de apoptosis en CMTN.

La apoptosis, también denominado muerte celular programada, es un proceso altamente regulado; existiendo dos vías principales por las que puede llevarse a cabo: la vía intrínseca (o mitocondrial) y la vía extrínseca (o del receptor de muerte), coincidiendo finalmente en una vía común, o fase de ejecución (Figura 1). Lo que conduce a una reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, activación de caspasas y formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos lo que evita que se produzca inflamación y con ello, el daño a las células vecinas (Méndez, 2002; Velázquez y Vaca, 2010; Ávila y Vega, 2015; Hernández-Dimas, 2016).

Existen diversos mecanismos por los cuales las células tumorales evaden el proceso de apoptosis. Sin embargo para CMTN, la Red de Investigación del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), utilizando seis plataformas que incluyen matrices de números de copias de ADN genómico, metilación de ADN, secuenciación de exomas, matrices de ARN mensajero, secuenciación de microARN y matrices de proteínas de fase inversa, mostró que esta se debe a la alta frecuencia de alteraciones de pérdida de función en los genes de reparación del daño del ADN como TP53 y BRCA1 y de ganancia de función en las vías de señalización del factor de crecimiento (EGF) (Abramson et al., 2015).

Aproximadamente el 50 a 85% de las pacientes con CMTN, presenta mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2; los cuales están implicados en los mecanismos de reparación del daño de doble cadena del DNA; que en condiciones normales, ante un daño genético, los puntos de control en el ciclo celular detendrían el avance hasta su reparación o derivando a la célula a la apoptosis (Abramson et al., 2015; Foulkes y Shuen, 2013).



TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa, TNF- β : Factor de Necrosis tumoral beta, TRAIL: Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado con TNF, Fas L: Ligando del antígeno de apoptosis 1 o antígeno de diferenciación CD95, DR: Receptor de muerte, DD: dominio de muerte, DISC: Complejo de Inducción de Muerte, BID: Agonista de Interacción del dominio de Muerte BH3, tBID: BID truncada, Bcl-2: Células B de Linfoma 2, -xL: Extra grande, -W: similar a Bcl-2, BAD: proteína similar a Bcl-2 asociada a muerte, BAX: proteína 4 similar a Bcl-2 asociada a muerte, BAK: proteína antagonista asesina de Bcl-2, BIM: Mediador de muerte celular de interacción con Bcl-2, APAF-1: Factor 1 activador de la proteasa apoptótica, SMAC: Segundo Activador de Caspasas derivado de Mitocondrias, DIABLO: proteína de unión a IAP directa con bajo PI, IAPs: Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis, PARP: Poli-ADP-Polimerasa, ICAD: Inhibidor de la Desoxiribonucleasa Activada por Caspasa.

Figura 1. Vía extrínseca e intrínseca del proceso de apoptosis (Hernández, 2016; Oropesa, et al., 2015; Mendez, 2002; Velázquez y Vaca, 2010).

Sin embargo, los pacientes con CMTN portadoras de células con mutaciones BRCA1/2, tienen una deficiencia de reparación por los mecanismos habituales; poniendo en marcha mecanismos alternativos como la reparación basada en recombinación homóloga, produciendo un escape a los puntos de control del ciclo celular y en consecuencia de la apoptosis. Por otro lado, se ha descrito que las mutaciones de BRCA1/2 en pacientes de CMTN, condicionan una especial sensibilidad a los agentes que inducen daño en el DNA como las sales de platino o los inhibidores de la Poli-ADP-Ribosa polimerasa (PARP). Estudios iniciales con inhibidores de PARP, han demostrado tasas de respuesta con un perfil de seguridad favorable, en este subgrupo de pacientes. Por lo que actualmente hay estudios que se encuentran en desarrollo tanto para la enfermedad metastásica como para la enfermedad localizada. Existen estudios que sugieren que la pérdida de p53, coopera con la pérdida de BRCA1 o BRCA2 en el desarrollo tumoral (Abramson et al., 2015; Foulkes y Shuen, 2013).

El gen TP53, codifica a la fosfoproteína p53; que en condiciones fisiológicas se expresa como factor transcripcional inactivo de localización variable a lo largo del ciclo celular, en donde cumple su función biológica como mecanismo de control a través de la regulación transcripcional de genes, que dependiendo del tipo celular y del contexto, (como por ejemplo, ante el daño inducido durante el tratamiento con quimioterapia y radioterapia) detiene la proliferación o induce la muerte por apoptosis (Hernández-Dimas, 2016; Oropesa et al., 2015; Mendez, 2002; Velázquez y Vaca, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, la alteración y ausencia de funcionalidad de p53 es uno de los mecanismos responsables para el desarrollo de enfermedad residual y quimioresistencia. Dicha condición, está presente en más del 50% de los CMTN, según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), más del 95% de mutaciones en p53, se producen en aminoácidos de dominio de unión al ADN. En consecuencia podemos decir, que la pérdida de la función de p53 conduce a la ausencia de expresión de la proteína p21, a la no

inhibición de las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas), a la no detención del ciclo celular y reparación del daño al ADN; y sí, a la continuidad del ciclo celular y preservación de la inestabilidad genómica (IARC, 2019; Reilly et al., 2015; Sohn et al., 2013).

Por otro lado, las implicaciones en la ganancia de función de las vías del EGF, presente en pacientes de CMTN; se deben a que como su nombre lo indica, es una proteína que estimula el crecimiento y la diferenciación celular mediante la unión con su receptor EGFR/HER1, un miembro de la familia HER (receptor epidérmico humano). Esta unión genera un cambio conformacional que activa vías mitogénicas; desencadenando diversos procesos celulares para la supervivencia sostenida y evasión de la apoptosis en células tumorales de CMTN (Figura 2) (Colonia et al., 2015; Pinzón et al., 2009).

En torno a la terapia dirigida a las vías del EGF, se ha evaluado el anticuerpo monoclonal anti-EGFR, Cetuximab y los inhibidores de tirosina quinasa EGF/Src, Dasatinib, Sunitinib y Neratinib. Debido a que el objetivo de la rapamicina en mamíferos serina-treonina quinasa (mTOR) es promover la traducción de proteínas, la angiogénesis, la proliferación y la migración y que la inhibición de la vía de señalización de PI3K/Akt mediada por mTOR elimina las respuestas proliferativas celulares y provoca la detención del ciclo celular; la rapamicina y sus análogos Temsirolimus, Everolimus y Deforolimus están siendo evaluados clínicamente en el tratamiento con TNBC (Colonia et al., 2015; Pinzón et al., 2009).

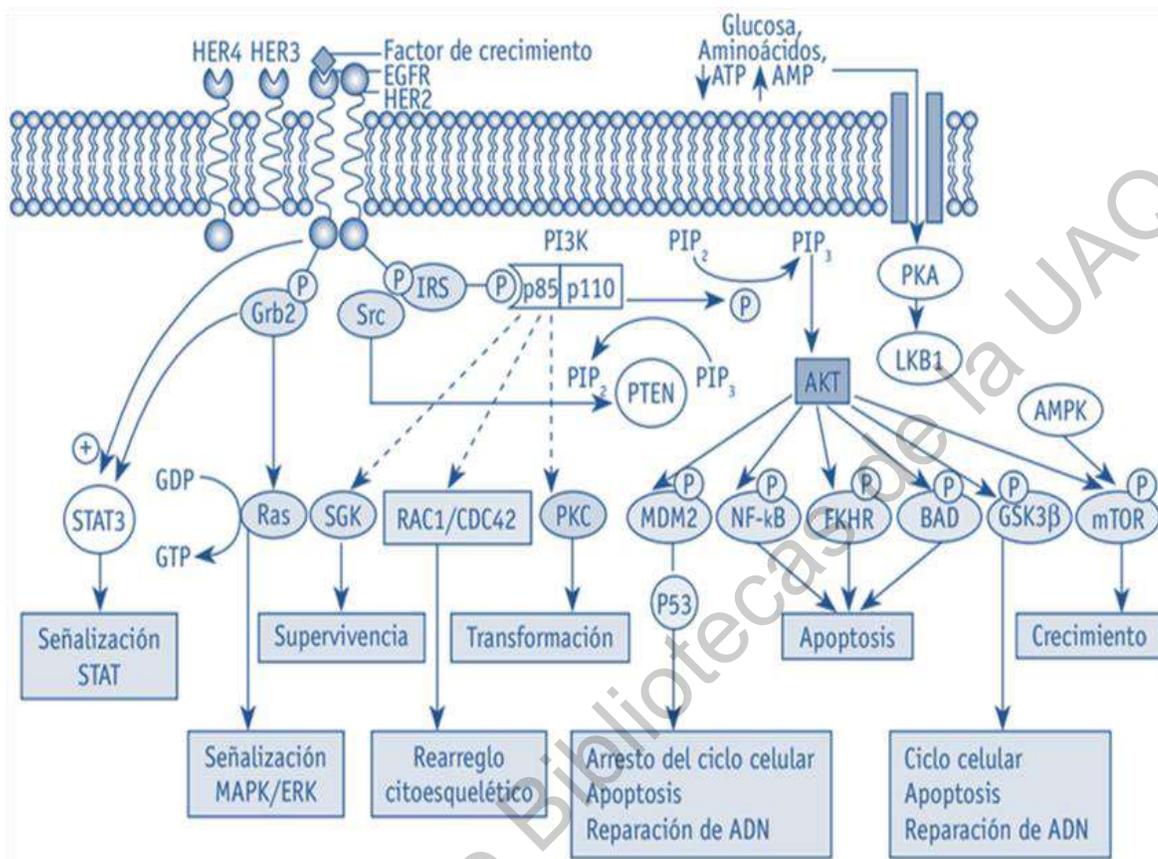


Figura 2. Vías de señalización de EGF y sus efectos en los procesos celulares. Tomado de: (Pinzón et al., 2009)

Sin embargo; a pesar de estos notables avances, otra línea de investigación que está siendo explorada para el desarrollo de fármacos es el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios de origen fúngico. A partir del aislamiento del diterpeno cíclico paclitaxel (taxol), del hongo *Taxomyces andreanae*, un endófito de la conifera *Taxus brevifolia*, donde originalmente fue aislado este importante fármaco quimioterapéutico; y fue aprobado en 1993, para el tratamiento de CM, cuyo mecanismo de acción se basa en la estimulación del ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina, impidiendo la despolimerización e inhibiendo la formación del huso mitótico en la división celular (Aly et al., 2010; Nisa et al., 2015).

2.4 Metabolitos fúngicos y su actividad antitumoral.

De los aproximadamente 1,5 millones de especies de hongos en el mundo (de los cuales sólo 120,000 se han descrito en la literatura); se aislaron aproximadamente 6,500 hongos de diversas fuentes para su estudio. Se ha documentado, que además de los metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, acetona, etanol, etc.), los hongos producen una amplia gama de metabolitos secundarios durante el crecimiento celular activo, los cuales se definen como compuestos heterogéneos de bajo peso molecular. Dichos compuestos no son necesarios para el crecimiento del organismo, pero si para su preservación; por ejemplo, protección contra la depredación, contra el estrés del medio ambiente, para la comunicación, competencia y toxicidad contra otros microorganismos. Dichos metabolitos se relacionan con diversos grupos estructurales (alcaloides, policétidos, péptidos no ribosomales, terpenos, entre otros) que presentan actividad biológica (Tan y Zou, 2001; Téllez-Jurado et al., 2009). Sin embargo, a la fecha solo unos pocos han sido investigados por su potencial actividad antitumoral que pueden usarse directa o indirectamente como agentes quimioterapéuticos (Debbab et al., 2009; Rabha y Jha, 2018).

Entre los ejemplos más destacados, se encuentra el alcaloide vincristina utilizado clínicamente en el tratamiento de quimioterapia para CM. Dicho alcaloide, a diferencia del paclitaxel, detiene la mitosis al unirse a los dímeros de tubulina, lo que inhibe su ensamblaje a las estructuras de microtúbulos. Se ha demostrado la producción de vincristina por *Fusarium oxysporum*, aislado de la planta herbácea *Catharanthus roseus* (Aly et al., 2008).

Wijeratne y su equipo de trabajo, informaron los nuevos compuestos: hidroximetilciclozonarona, filospinarona, 3 α -hidroxitauranina, 12-hidroxtauranina y 3-ketotauranina, junto con el compuesto conocido tauranina, extraídos con acetato de etilo del hongo *Phyllosticta spinarum*, endófito del pino *Platycladus orientalis* colectado en Arizona. Los compuestos se evaluaron para determinar la inhibición

de la proliferación celular, en donde la tauranina mostró actividad con valores de CL_{50} (concentración letal media) de 1.5 μM contra la línea celular MCF-7 de CM, mediante inducción de apoptosis por activación de caspasas (Wijeratne et al., 2008).

Mientras que en 2011, el extracto metanólico del hongo filamentoso MSX 63935, aislado de hojarasca recolectada en Nigeria, mostró una actividad citotóxica prometedora contra la línea celular MCF-7 de CM. Mediante la inhibición de la proteína chaperona de choque térmico Hsp90; que se encuentra sobreexpresada en diversos tumores y células transformadas. La cual además, está implicada en el funcionamiento de los receptores de hormonas esteroideas, la actividad o estabilidad de proteínas quinasas (CKs), que participan en la transducción de señales y en el control del ciclo celular, el funcionamiento de la telomerasa, entre otras. La caracterización química del extracto, identificó dos lactonas de ácido resorcílico nuevas: (15-O-desmetil- (5Z) -7 -oxozeaenol y 7-epi-zeaenol) y las conocidas zeaenol, (5E) -7-oxozeaenol, (5Z) -7 -oxozeaenol, y LL-Z1640-1, donde 5Z-7-oxozeaenol mostró los mejores resultados con un valor de CL_{50} de 3.8 μM (Ayers et al., 2011).

Se ha reportado que la producción de los metabolitos secundarios está dada en función del biotopo y señales que el hongo recibe del medio. Por lo que resulta de interés el estudio de los provenientes de medios con condiciones extremas; como los hongos pertenecientes a los géneros *Cladosporium*, *Mucor* y *Penicillium*, recientemente aislados de los glaciares “La Panza” del Iztaccihuatl, ubicado en los límites de Puebla y el Estado de México y del “Jamapa” del Citlaltépetl, ubicado los límites de Veracruz y Puebla; (Tabla 3). Cabe mencionar que al analizar ciertos marcadores moleculares de dichos hongos, no se encontró correspondencia con especies hasta ahora reportadas (Calvillo-Medina et al., 2020) convirtiéndose en una oportunidad para ser estudiados.

Tabla 3. Taxonomía de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., (Schulz et al., 2002; Ramírez et al., 2006).

	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
Dominio:	Eucariota	Eucariota	Eucariota
Reino:	Fungi	Fungi	Fungi
Phylum:	Ascomycota	Zygomycota	Ascomycota
Clase:	Ascomycetes	Zigomycetes	Euascomicetos
Orden:	Dothideales	Mucorales	Eurotiales
Familia:	Mycosphaerellaceae	Mucoraceae	Trichomaceae
Género:	<i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Penicillium</i>

Los principales compuestos secretados por el género *Cladosporium* son emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona) y cladosporina (3,4-dihidro-6, 8-dihidroxi-3-(tetrahydro-6-metil-2H-pirra-2-il) metilisocumarina) (Ogórek et al, 2011). Estudios realizados para evaluar los efectos antiproliferativos y antimetastáticos de la emodina *in vitro* e *in vivo*, mostraron un alto porcentaje de inhibición del crecimiento y apoptosis en la línea celular de cáncer pancreático (SW1990) y suprimió la migración e invasión de una manera dependiente de la dosis, regulando la actividad de unión del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), el cual es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN (Liu et al., 2011).

En los mucorales; el policétido macrocíclico, rizoxina, presenta actividad antimetastática notablemente fuerte en la mayoría de las células eucarióticas, incluidas varias líneas celulares de cáncer humano, atrayendo un interés considerable como posible fármaco antitumoral (Partida y Hertweck, 2005).

La evaluación del compuesto tirosol [2-(4-hidroxifenil) etanol], caracterizado a partir del extracto de acetato de etilo de *Mucor* sp., mostró capacidad para inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), en células de microglía murina BV-2, lo que lo vuelve un agente anticancerígeno (Dewapriya et al., 2014).

Por otro lado, el género *Penicillium* comprende más de 350 especies y es uno de los grupos más estudiados. Entre los metabolitos producidos por especies del género *Penicillium* con actividad biológica contra el cáncer, se encuentran: policétidos (zosteropenilinas, agroclavina I, aurantioclavina, festuclavina), alcaloides (brevianamidas A y B, piscarininas A y B, rugulosovinas A y B, felutanina A-E, isofelutanina A y C, viridicatina, viridicatol y fumaquinazolininas A y B) y derivados de aminoácidos (questiomicina) (Rabha y Jha, 2018).

Los policétidos zosteropenilinas A-L, fueron investigados sobre la viabilidad de la línea celular PC3 de cáncer de próstata, en donde el análisis reveló un aumento en los niveles de la proteína p62, involucrada en la formación de autofagosomas, lo que sugiere la inhibición de la autofagia inducida por fármacos (Afiyatulloev et al., 2017).

Policétidos como la agroclavina I y aurantioclavina, muestran citotoxicidad contra líneas celulares de leucemia; así como la festuclavina, que tiene efectos inhibitorios sobre la captación de nucleósidos e incorporación al ADN y ARN en células Molt 4B de leucemia linfocítica humana (Rabha y Jha, 2018).

Los alcaloides brevianamida A y la roquefortina C, indujeron citotoxicidad y producción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la proteína-2 inflamatoria de macrófagos (MIP-2) y la producción de interleucina-6 (IL-6) en células pulmonares de ratón (Rand et al., 2005).

Recientemente se reportó el aislamiento de dos péptidos cíclicos, PF1171A y PF1171C, de *Penicillium* sp. Su evaluación *in vitro* utilizando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), mostró inhibición de la proliferación en

concentraciones que no exhiben citotoxicidad. Además de suprimir de manera significativa al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que induce migración, invasión, proliferación y la neovascularización. También se identificó una asociación entre la actividad antiangiogénica de los compuestos aislados y la regulación a la baja tanto de la fosforilación del receptor 2 de VEGF como de la expresión del factor-1 α inducible por hipoxia a nivel proteico; sugiriéndose prometedor su papel en la inhibición de la angiogénesis (Jang et al., 2017).

Para poder llevar a cabo aplicaciones farmacológicas de metabolitos fúngicos como las arriba mencionadas, se requiere de la evaluación de las condiciones de cultivo de las especies fúngicas de interés, las condiciones de extracción de los compuestos producidos durante su cultivo *in vitro* y de análisis para determinar la naturaleza de dichos compuestos, así como para la evaluación de su posible actividad biológica en modelos celulares, en función de sus características intrínsecas.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Estandarizar las condiciones de cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M así como de las especies *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., para la obtención de extractos fúngicos.

3.2 Objetivos específicos.

1. Determinar las condiciones de cultivo *in vitro* de las especies fúngicas *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp.
2. Evaluar las condiciones de extracción de los compuestos producidos por *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., durante su cultivo *in vitro*.
3. Generar las condiciones de cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M.

4. Materiales y Métodos.

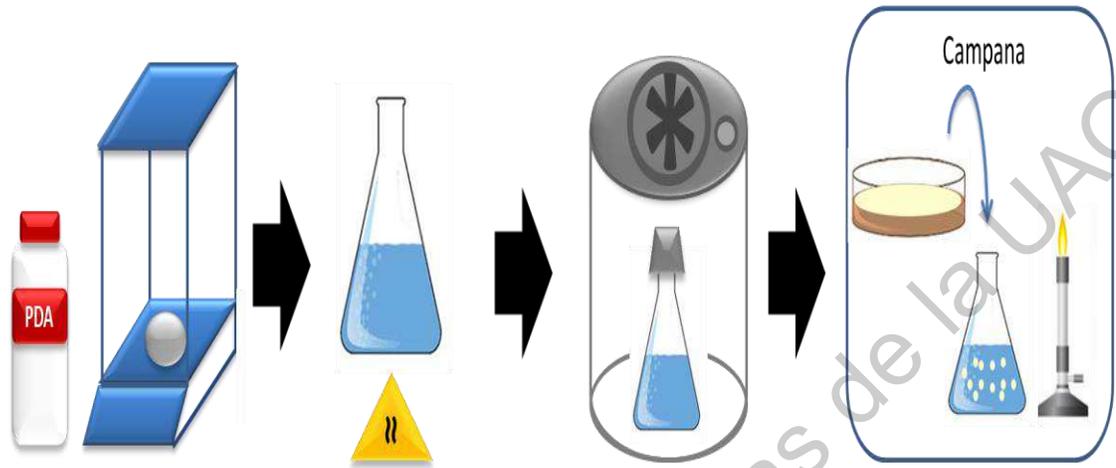
4.1 Obtención de muestras.

Los cultivos axénicos de los hongos *Cladosporium* sp. (Cit4/IOM 325,299 /MH890625), *Mucor* sp. (Cit1/IOM 325,312/MH890638) y *Penicillium* sp. (Izt1/IOM 325,315/MH890641), fueron proporcionados por el grupo de investigadores del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, lo cuales fueron aislados a partir de muestras tomadas de los glaciares “La Panza” del Iztaccihuatl, ubicado en los límites de Puebla y el Estado de México y del “Jamapa” del Citlaltépetl, ubicado en los límites de Veracruz y Puebla (Calvillo-Medina, et al., 2020).

4.2 Estandarización de las condiciones de cultivo *in vitro* de las especies fúngicas *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp.

Para cumplir con el primer objetivo, se evaluaron dos metodologías para el cultivo *in vitro* de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. Una de ellas consistió en cultivar las especies en medio sólido de agar dextrosa papa (PDA) y la otra mediante fermentación en medio líquido de Pontecorvo.

A fin de determinar el volumen de inóculo a emplear, se realizó un primer cultivo de las muestras proporcionadas, durante 14 días a 28°C, en 20 mL de PDA (Bioxon®, BD México), contenidos en matraces Erlenmeyer de 125 mL (Pyrex™, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante (Figura 3). Una vez obtenidos los cultivos; en una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añadió a cada matraz, 50 mL de una solución acuosa con Tween® 20 (monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano) al 0.01% (Merk, Alemania) y una barra de agitación magnética (ambos previamente esterilizados), para su posterior colocación en agitador magnético de placa MS7-H550-S (Scilogex™, USA), a 150 rpm, durante 15 minutos.

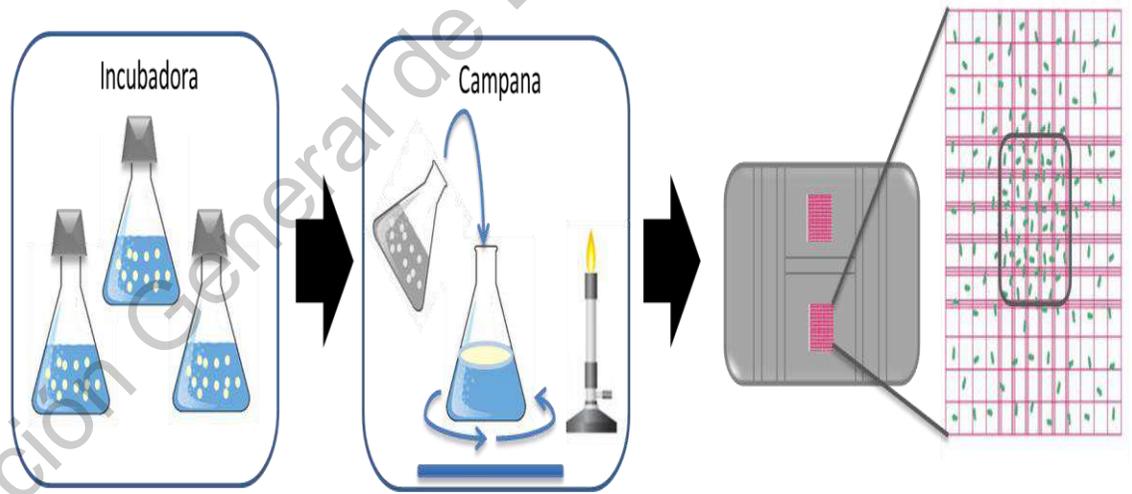


1. Pesar los g del medio de cultivo.

2. Rehidratar y calentar hasta ebullición durante 1 min.

3. Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión, 15 min.

4. Inocular los matraces a partir de los cultivos axénicos.



5. Incubar a 28°C, durante 14 días.

6. Cosechar los conidios con Tween 20 al 0.01% y agitador magnético, 15 min.

7. Realizar conteo en cámara de Neubauer y determinar # de conidios por mL.

Figura 3. Determinación del número de conidios/mL.

A partir de las emulsiones obtenidas, se procedió a leer en el cuadrante central de una cámara de Neubauer, a 10x con ayuda de un microscopio óptico Leica® DM300 (Leica™, Alemania) (Figura 3), una vez determinado el número de conidios presentes por mL de solución (Ecuación 1), se almacenaron a 4°C hasta su utilización (Romero, 2019).

$$N = (CC)(FC)(FD)$$

Dónde:

N: # de Conidios/mL.

CE: Cuenta de Conidios en los 25 cuadrantes centrales de la cámara.

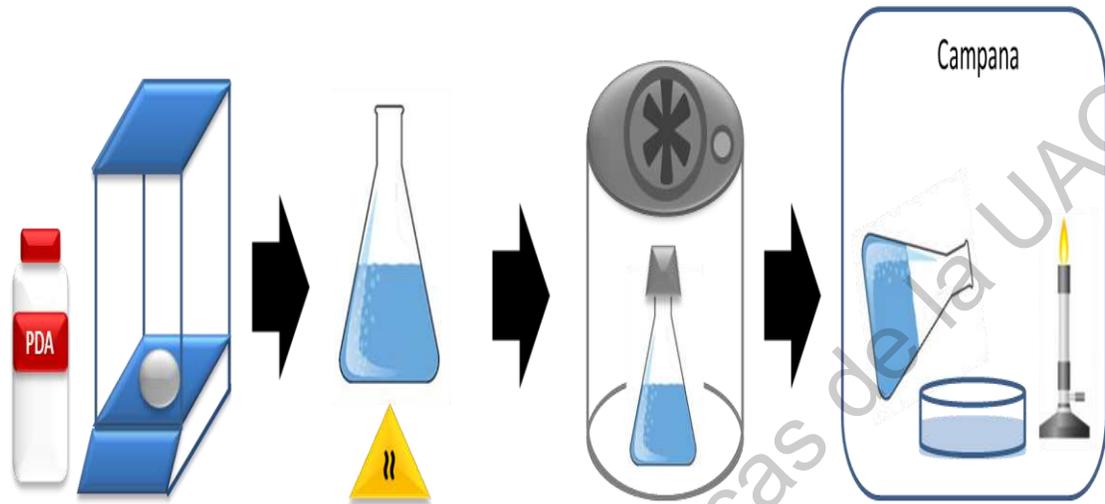
FC: Factor de la Cámara (1×10^4 células/mL).

FD: Factor de Dilución (1:100).

Ecuación 1. Fórmula para el recuento celular en cámara de Neubauer.

Posterior a esto, se procedió a cultivar 2×10^7 conidios por gramo de fuente de carbono, en 20 mL de PDA (Bioxon®, BD México), empleando para ello, placas Petri de poliestireno grado médico (SYM Laboratorios®, México). Los cálculos y la preparación, se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante; correspondiendo para cada especie de hongo, tres grupos de 10 cajas.

En campana de flujo laminar (previa asepsia), se realizó la siembra tomando el volumen correspondiente de la solución de conidios, con ayuda de una pipeta semiautomática y colocándolo en el centro de la caja, para posteriormente con un asa bacteriológica previamente esterilizada en la flama del mechero y enfriada. Se distribuyó el inóculo en toda la superficie del medio, seguido de incubación durante 14 días a 28°C, en condiciones ambientales de luz/obscuridad (Figura 4).

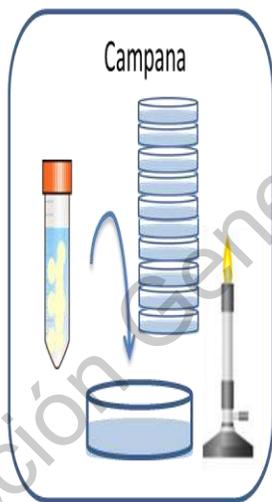


1. Pesar los g del medio de cultivo.

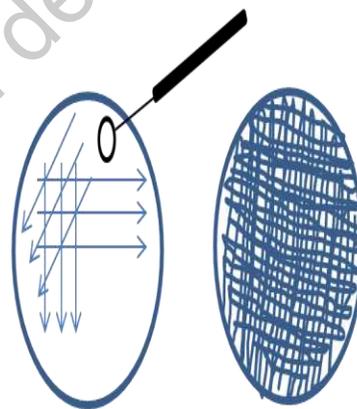
2. Rehidratar y calentar hasta ebullición durante 1 min.

3. Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión, 15 min.

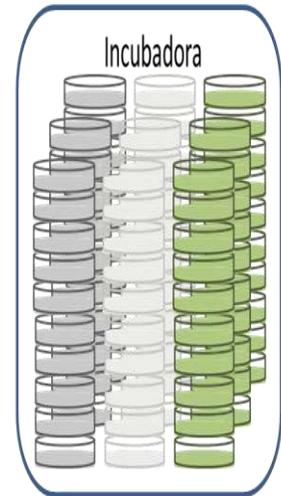
4. Vaciar a las placas en condiciones de esterilidad.



5. Inocular con 2×10^7 conidios por g de fuente de carbono.



6. Distribuir el inóculo por toda la superficie del medio.



7. Incubar a 28°C, durante 14 días.

Figura 4. Esquema de trabajo para el cultivo en medio sólido de agar PDA.

Por otra parte, para la evaluación de las condiciones del cultivo *in vitro* de las tres especies fúngicas, por fermentación en medio líquido de Pontecorvo, se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex™, Thermo Fisher Scientific) y se pesaron en balanza analítica Sartorius® CP225D (Sartorius™, Alemania), las sales que lo componen, seguida de su rehidratación con agua destilada para un volumen total de 100 mL cada uno, esterilizándolos en autoclave a 121°C y 15 lb de presión, durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo y manteniendo las condiciones de esterilidad, se procedió a inocular con ayuda de una pipeta semiautomática, el volumen correspondiente para 2×10^7 conidios por cada gramo de fuente de carbono, a cada uno de los medios y se incubaron durante 14 días, a 28°C y 100 rpm, en condiciones ambientales de luz/obscuridad (Figura 5).

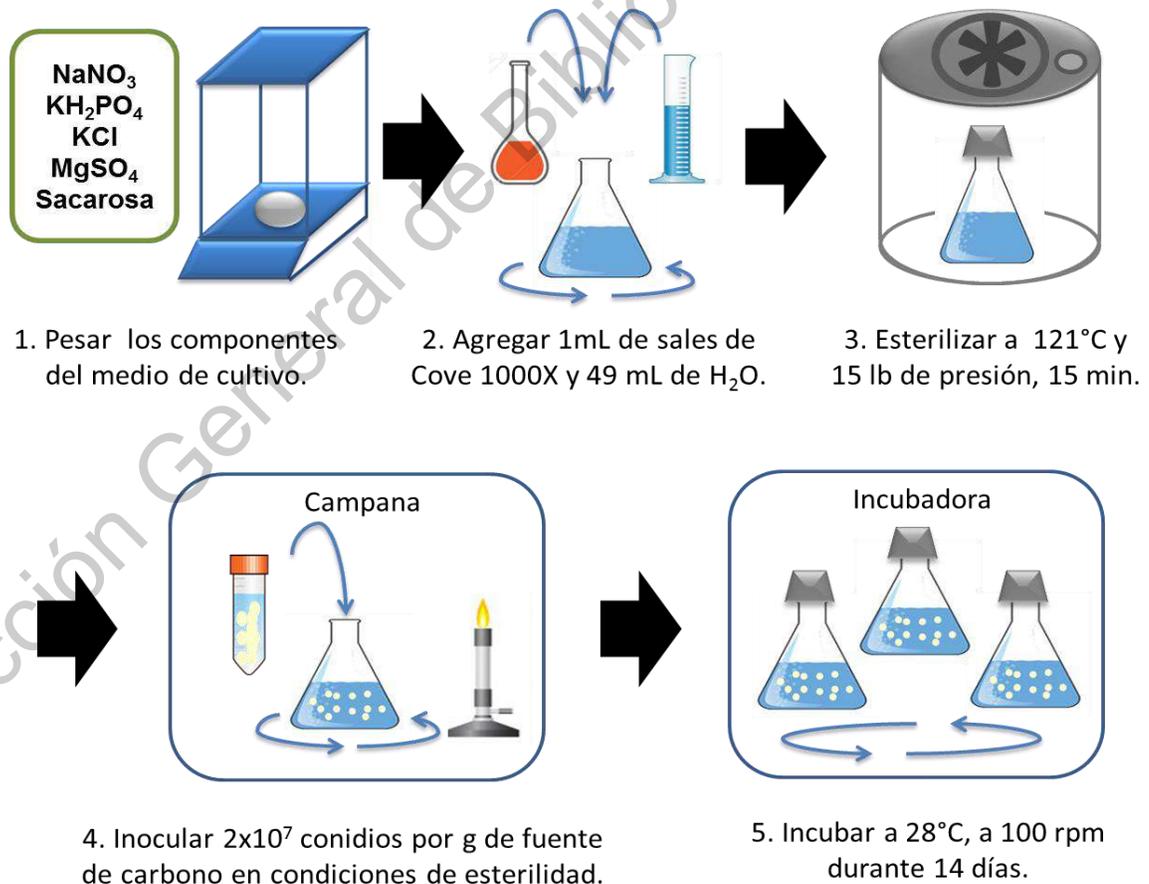


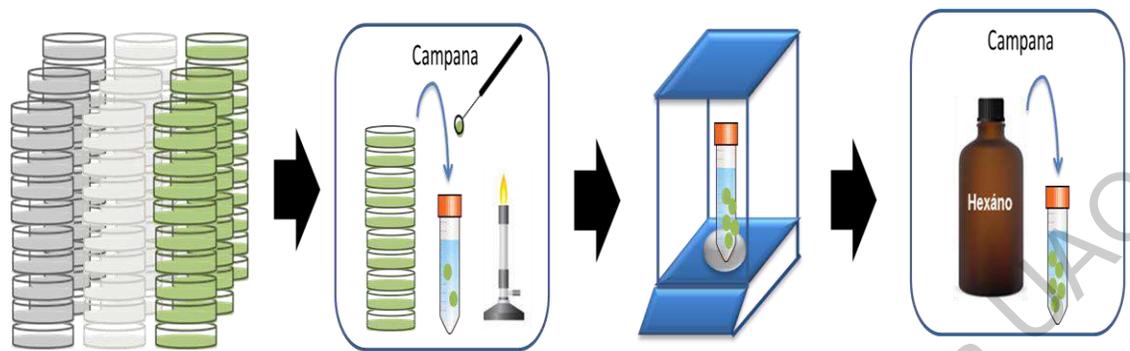
Figura 5. Esquema de trabajo para el cultivo en medio líquido de Pontecorvo.

4.3 Evaluación de las condiciones de extracción de los compuestos producidos por *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., durante su cultivo *in vitro*.

De los 30 cultivos en PDA obtenidos para cada especie, se formaron al azar tres grupos de 10 cajas para cada uno y se recuperó todo el micelio en una campana de flujo laminar (previa asepsia), con ayuda de un asa bacteriológica. La biomasa se colocó en tubos Falcon (Corning™, Sigma Aldrich), de 50 mL estériles previamente pesados en una balanza analítica Sartorius® CP225D (Sartorius™, Alemania), determinando por diferencia de pesos los gramos de micelio obtenido.

Con base a los resultados obtenidos, se calculó el volumen de disolvente a emplear, guardando una relación 1:50 p/v, para realizar dos extracciones consecutivas por sonicación. Primero para los compuestos no polares (Figura 6); utilizando para ello hexano grado reactivo (Golden Bell^{MR}, Chemical Instruments) como disolvente y un baño ultrasónico Elmasonic® 40SH (Elma™, Alemania). El proceso consistió en un ciclo de 30 minutos, a una frecuencia de 40 kHz y manteniendo una temperatura de baño de 30°C. Seguida de filtración al vacío, a través de un filtro Whatman® No.1 (Whatman™, Thermo Fisher Scientific), con tamaño de poro de 11 µm. Se recuperó la biomasa y a los filtrados resultantes se eliminó el disolvente empleando un evaporador rotatorio IKA® RV10 Basic (IKA™, Thermo Fisher Scientific), a 180 rpm, manteniendo una temperatura de baño de 40°C.

El extracto crudo contenido en el balón se recuperó con 3 mL de hexano, y se colocó en un frasco ámbar de 10 mL estéril con taparoca debidamente etiquetado y previamente pesado, para su posterior colocación en estufa a 35°C durante 24 h para eliminar el disolvente de recuperación. Una vez transcurrido el tiempo, los frascos fueron nuevamente pesados para determinar por diferencia de pesos, los gramos de extracto obtenido, así como el porcentaje de rendimiento de extracción (Ecuación 2), los extractos se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

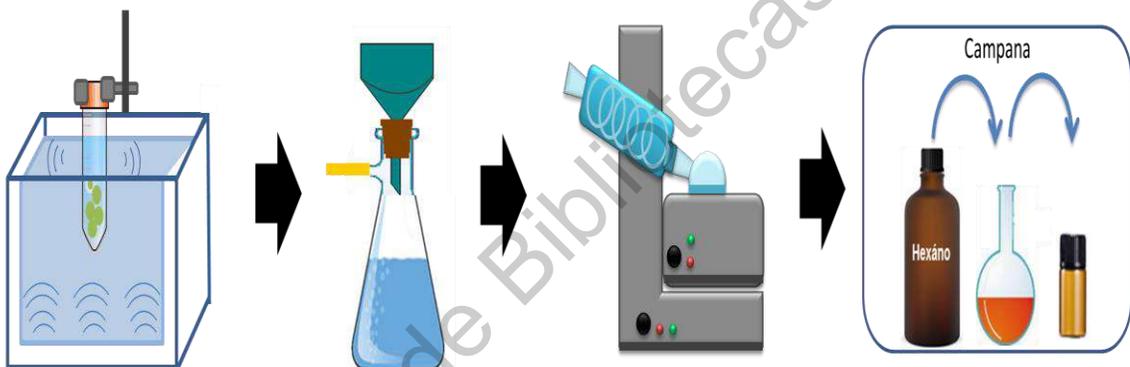


1. Formar para cada especie, 3 grupos de 10 cajas de cultivo elegidas al azar.

2. Transferir todo el micelio de cada grupo a tubos Falcon de 50 mL.

3. Determinar por diferencia de pesos los g de micelio obtenido.

4. Agregar los mL de Hexano en relación 1:50 p/v.

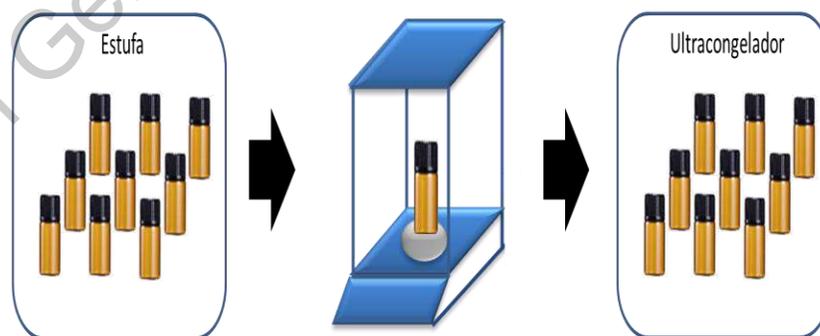


5. Sonicar en baño ultrasónico, 30 min, a 40 kHz y 30°C.

6. Filtrar al vacío con Whatman #1 y recuperar la biomasa.

7. Eliminar el disolvente en un agitador rotatorio, a 40°C y 180 rpm.

8. Recuperar el extracto con 3mL de disolvente en frascos ámbar de 10 mL.



9. Evaporar el disolvente de recuperación, en estufa a 40°C, durante 24 h.

10. Determinar los g de extracto obtenido y porcentaje rendimiento de extracción .

11. Almacenar los extractos a -70°C, hasta su utilización.

Figura 6. Proceso de extracción con hexano, a partir de cultivos en PDA.

$$P = \frac{M_2}{M_1} (100)$$

Dónde:

P: Porcentaje de rendimiento de la extracción.

M₂: Masa final (g).

M₁: Masa inicial (g).

100: Factor matemático.

Ecuación 2. Formula de porcentaje de rendimiento de la extracción.

Para la segunda extracción (Figura 7), se empleó metanol grado reactivo (Golden Bell^{MR}, Chemical Instruments) y la biomasa recuperada tras la filtración al vacío, la cual fué transferida a tubos Falcon (CorningTM, Sigma Aldrich), estériles de 50 mL, previamente pesados. Determinando por diferencia de pesos, los gramos de biomasa de los que se parte y añadiendo el volumen de disolvente, en una relación 1:50 (p/v).

Las condiciones de esta segunda extracción para metabolitos polares, fueron las mismas que las empleadas con hexano. En un baño ultrasónico Elmasonic® 40SH (ElmaTM, Alemania), durante 30 minutos, a una frecuencia de 40 kHz y temperatura de baño de 30°C. Seguida de filtración al vacío, a través de un filtro Whatman® No.1 (WhatmanTM, Thermo Fisher Scientific). En este punto, se desechó la biomasa y a los filtrados resultantes se eliminó el disolvente a 180 rpm y una temperatura de baño de 40°C; empleando para este fin, un evaporador rotatorio IKA® RV10 Basic (IKATM, Thermo Fisher Scientific). El extracto crudo contenido en el balón, se recuperó con 3 mL de metanol, y fué transferido a un frasco ámbar de 10 mL estéril, previamente pesado, y colocado en estufa a 35°C durante 24 h para eliminar el disolvente de recuperación. Finalmente se determinó los gramos de extracto obtenido y el porcentaje de rendimiento de extracción (Ecuación 2), y se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

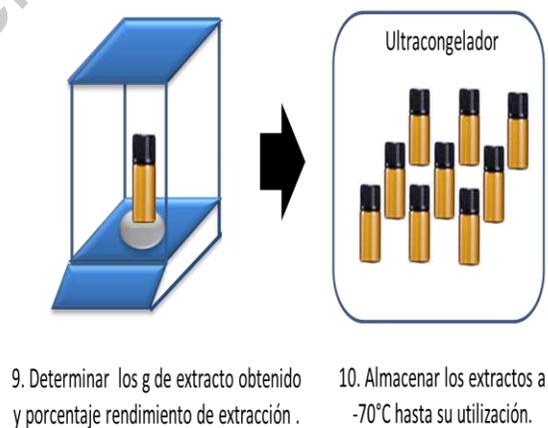
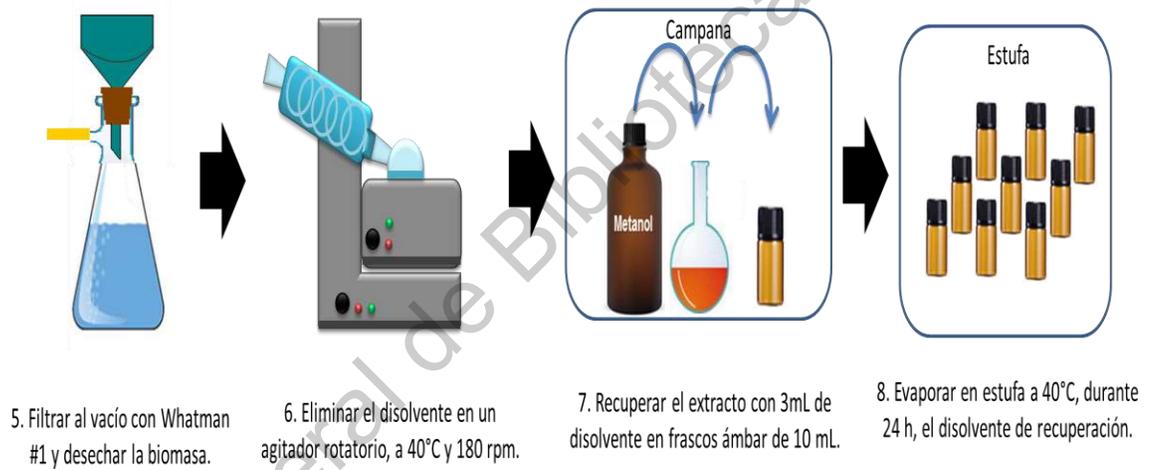
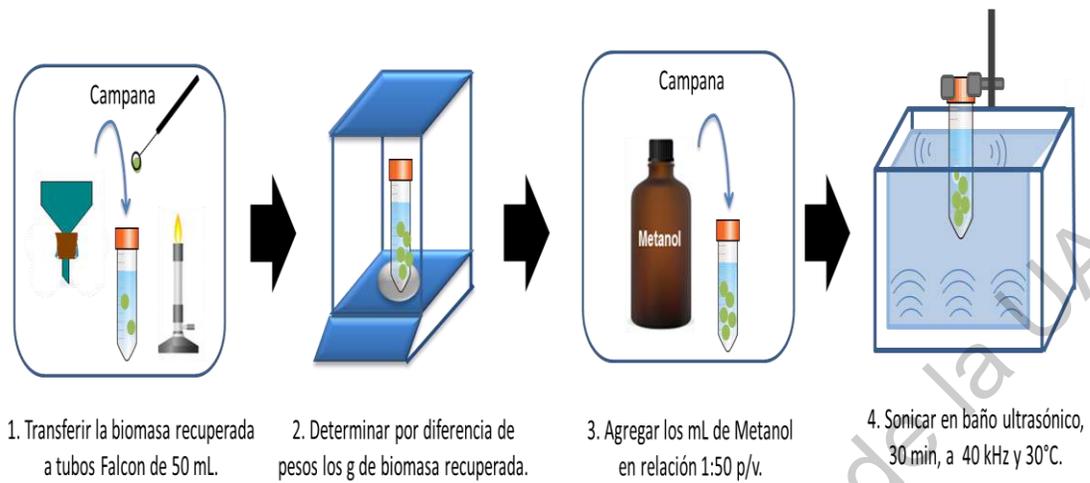


Figura 7. Proceso de extracción con metanol, a partir de cultivos de PDA.

En el caso de los cultivos realizados en medio líquido de Pontecorvo, se formaron al azar tres grupos de cinco matraces cada uno y en una campana (previa asepsia), se procedió a separar la biomasa por filtración al vacío, a través de filtro Whatman® No.1, con tamaño de poro de 11 μm y se transfirió todo el micelio de cada grupo con ayuda de una espátula estéril, así como el filtrado resultante, a tubos Falcon de 50 mL estériles; y fueron colocados en estufa de convección a 40°C, para eliminar el contenido de agua, ambos recipientes fueron previamente pesados y vuelto a pesar con la biomasa y el filtrado, en una balanza analítica Sartorius CP225D, determinando por diferencia de pesos los gramos de biomasa y filtrado obtenidos (Figura 8); y en función de éstos, se calculó el volumen de disolvente a emplear, guardando una relación 1:50 p/v. El proceso de extracción por sonicación, de los compuestos no polares, seguida de la extracción de compuestos polares; se realizaron de la misma manera que para los cultivos en PDA (Figura 6, 4-11 y Figura 7, 3-10), respectivamente. Los extractos obtenidos fueron almacenados a -70°C hasta su utilización.

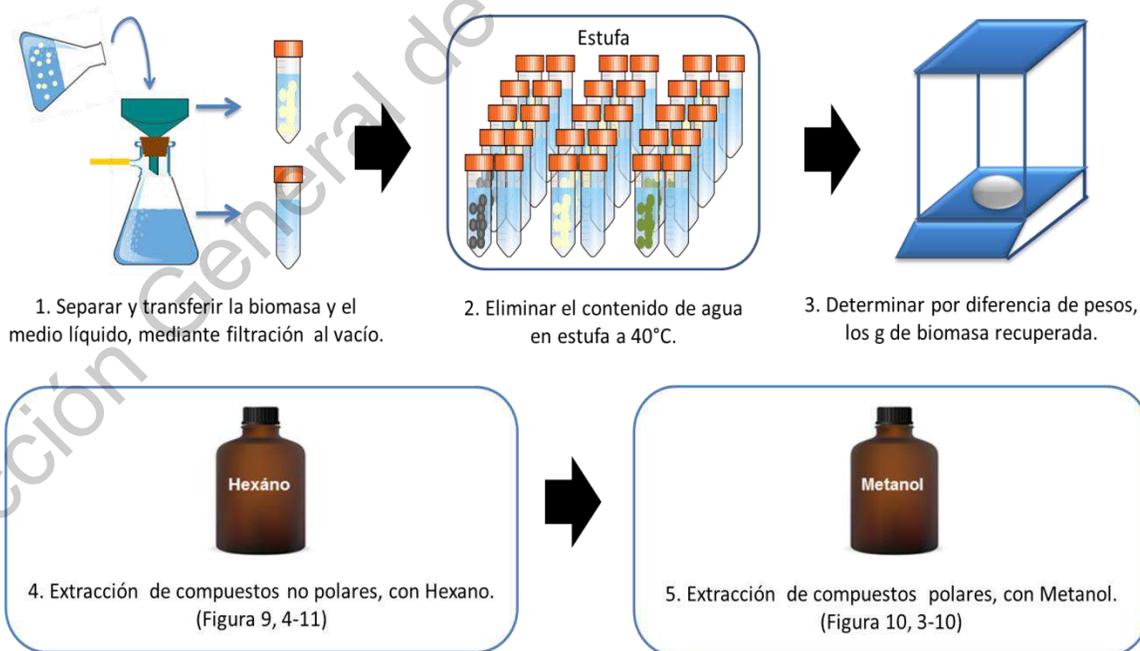
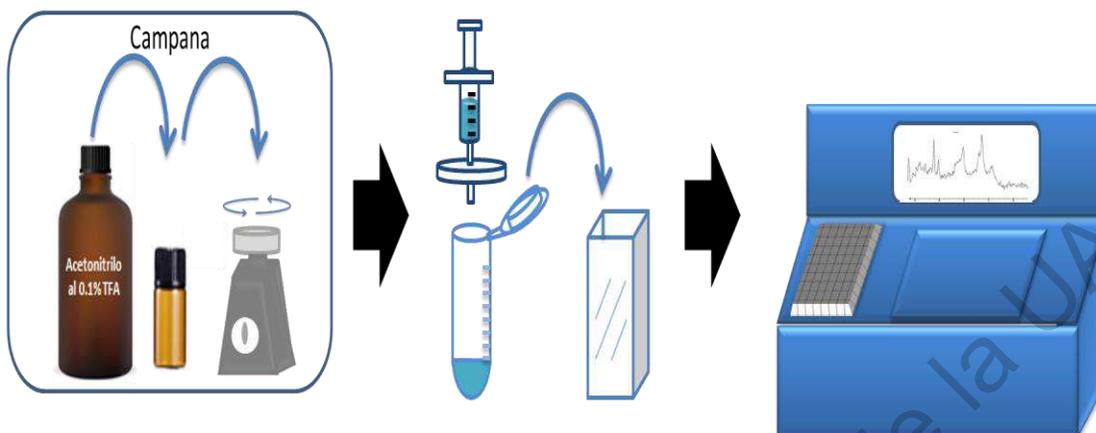


Figura 8. Proceso de extracción de los compuestos fúngicos, a partir de cultivos en medio líquido de Pontecorvo.

A fin de evaluar de manera cualitativa las señales cromatográficas de los extractos mediante un sistema Waters 2695 Alliance HPLC (WatersTM, EE.UU.), provisto de un detector de longitud de onda de matriz de fotodiodos (DAD, Waters 2998). Los extractos fueron recuperados en 1 mL de acetonitrilo (ACN) al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), homogenizando las muestras en un agitador Vórtex-Mixer VM-10 (WitegTM, Alemania), durante 2 minutos y pasada a través de un filtro de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), de tamaño de poro de 0.22 µm (AllcromTM, Brasil), antes de transferirlas a una celda de cuarzo, para su análisis en un espectrofotómetro UV/Vis Ultrospec 2100*pro* (BiochromTM, UK), en un rango de absorbancia de 200 a 700 nm, determinando los máximos de absorción de los extractos y seleccionar las zonas de monitoreo. La separación en fase reversa se realizó durante 37 minutos, en condiciones de gradiente (Tabla 4), utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.7 µm) (AgilentTM, EE.UU.), con una fase móvil de agua con 0.1% de TFA (fase A) y ACN con 0.1% de TFA (fase B), caudal de 0.5 mL/min, temperatura de la columna ajustada a 40°C y volumen de inyección de muestra de 20 µL (Figura 9).

Tabla 4. Condiciones de trabajo para el análisis mediante HPLC-DAD, (ACN: acetonitrilo).

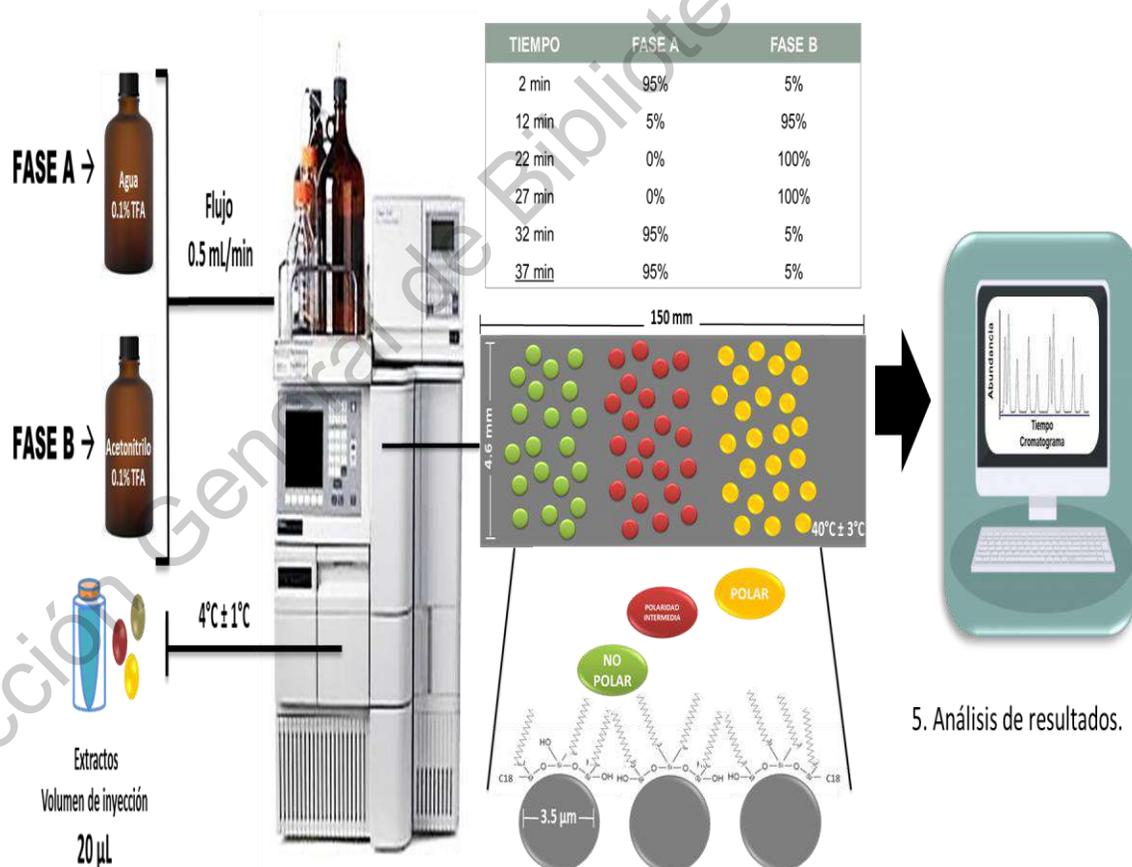
TIEMPO	FASE A	FASE B	FLUJO
2 min	95%	5%	0.5 mL/min
12 min	5%	95%	0.5 mL/min
22 min	0%	100%	0.5 mL/min
27 min	0%	100%	0.5 mL/min
32 min	95%	5%	0.5 mL/min
<u>37 min</u>	95%	5%	0.5 mL/min



1. Recuperar el extracto con 1mL de ACN al 0.1% de TFA, homogeneizar.

2. Filtrar en membrana de PVDF de 0.22 μm y transferir a celda de cuarzo.

3. Leer en espectrofotómetro a 200-700 nm y determinar máximos de absorción.



4. Programar condiciones de trabajo y analizar extractos en HPLC-DAD.

5. Análisis de resultados.

Figura 9. Proceso de análisis de los extractos en HPLC-DAD.

4.4 Generación de las condiciones de cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M.

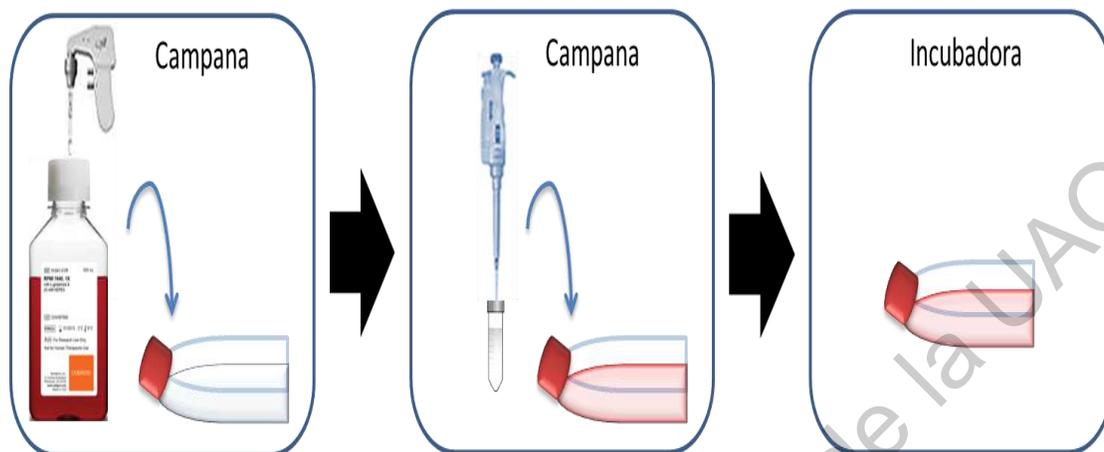
Para el establecimiento de las condiciones de cultivo de la línea celular BT-549 (ATCC®, HTB-122™) que corresponde al fenotipo de CMTN subtipo M, las células fueron cultivadas en monocapa hasta confluencia en una concentración de partida de aproximadamente 1×10^6 células (Figura 10) en botellas de poliestireno de 175 cm² (Corning™, Thermo Scientific) con 10 mL de medio RPMI-1640 (ATCC® 30-2001™) complementado con suero fetal bovino (SFB) (ATCC® 30-2020™) a una concentración final del 10%; reemplazándolo por medio fresco cada 48 horas. Durante todo el proceso de cultivo, se mantuvo una temperatura de 37°C y una atmosfera 95% aire y 5% de dióxido de carbono (CO₂), empleando para ello, una incubadora VIOS® 250i (Heracell™, Thermo Scientific).

Una vez que se determinó la ocupación celular sobre toda la superficie disponible, mediante observación de las botellas de cultivo bajo un microscopio óptico Leica® DM300 (Leica™, Alemania) se realizó su conteo y evaluación de viabilidad celular mediante el ensayo de azul de tripano (Crowley, et al., 2018; Kladniew, et al., 2016) (Figura 11). Para lo cual, en campana de flujo laminar (previa asepsia) se eliminó el medio de cultivo y se agregaron 5 mL de solución con 0.05% (p/v) de Tripsina-EDTA 0.53 mM, manteniendo a 37°C hasta la separación de la capa celular. Posteriormente se agregaron 5 mL de medio de crecimiento completo para detener la actividad de la tripsina, aspirando las células suavemente para su homogenización y transferencia a un tubo Falcon de 15 mL (Corning™, Thermo Scientific). Seguida de dos ciclos de lavado con 5 mL de buffer salino de fosfatos (PBS) (Gibco™, Thermo Scientific) en centrifuga refrigerada Primo™R (Sorvall™, Thermo Scientific) a 1,100 rpm y 25°C durante 3 minutos.

El pellet formado en el último lavado se reconstituyó con 2 mL de PBS, homogeneizando suavemente. Se tomaron 20 µL de la suspensión celular

mezclándolos con 20 μ L de azul de tripano al 0.4% (Gibco™, Thermo Scientific) en un tubo eppendorf de 1 mL (Eppendorf™, Thermo Scientific) e inmediatamente se colocaron 10 μ L de esta mezcla en cada una de las 2 cámaras de un portaobjetos provistos para el conteo celular automatizado en el equipo TC20™ (BioRad®).

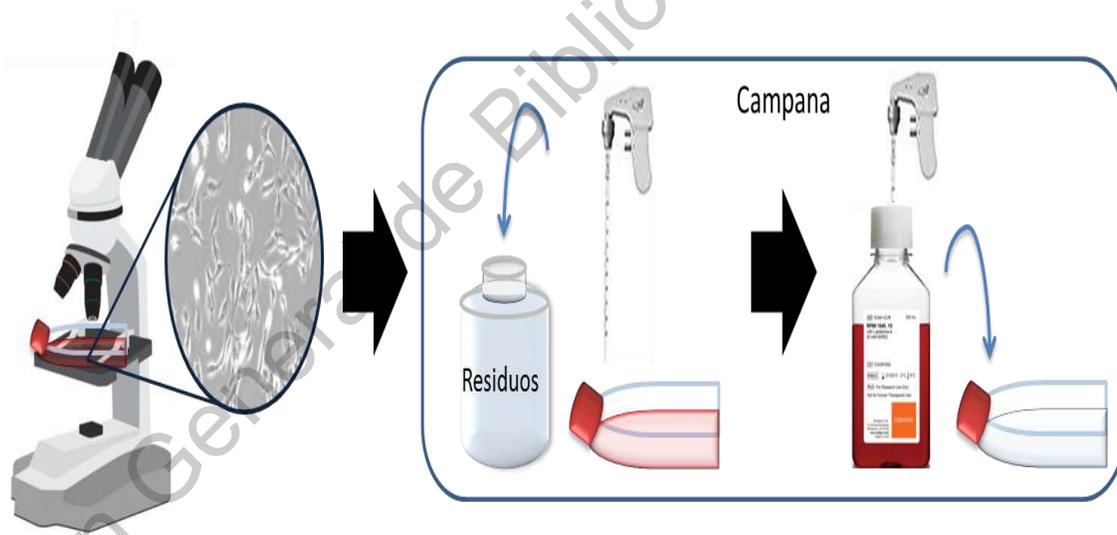
Finalmente, con los datos obtenidos, se realizó el subcultivo (Pase 4) de 1×10^6 células en botellas de 175 cm² con las condiciones antes descritas y la suspensión celular restante, fué almacenada en tubos criogénicos Nalgene® (Nalgene™, Thermo Scientific) de 1.8 mL a -70°C en un ultracongelador Revco® ExF (Revco™, Thermo Scientific) en alícuotas de 1 mL de SFB con 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Hybri-Max™, Sigma-Aldrich), conteniendo aproximadamente 1×10^6 células.



1. Depositar 10 mL de medio RPMI con 10% de SFB a una botella de 175 cm².

2. Descongelar las células a temperatura ambiente y transferirlas al medio de cultivo.

3. Incubar a 37°C, en atmosfera 95% aire y 5% CO₂.



4. Observar a 10 y 40x en microscopio óptico cada 24 h.

5. Renovar el medio de cultivo cada 48 h y mantener condiciones de incubación hasta confluencia.

Figura 10. Esquema de trabajo para el cultivo celular de la línea BT-549.

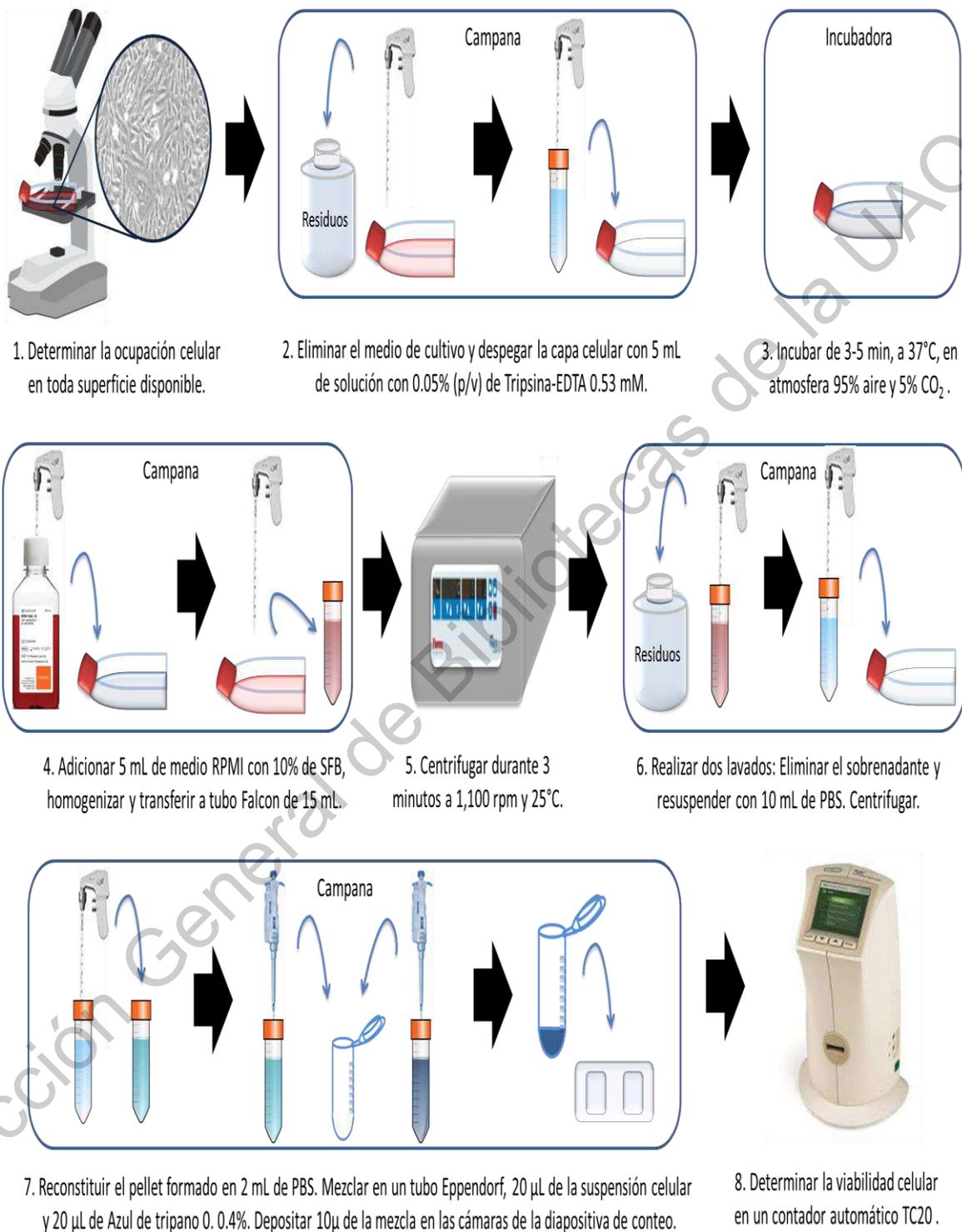


Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de azul de tripano.

Se evaluó la viabilidad y recuento celular, a las 24, 48 y 72 h, en función de las características morfológicas y tiempo de duplicación reportada para la línea BT-549 (Beltran y González, 2016; Risinger, et al., 2016), que nos permitiera una población de 1×10^6 células/mL, necesaria para el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Realizándose para ello un subcultivo a partir del pase 4, en placas de poliestireno de 24 pocillos Costar™ (Corning™, Thermo Scientific) (Figura 12) de 2 cm² de diámetro, con concentraciones de 2×10^5 y 5×10^5 células en 1 mL de medio RPMI, las condiciones de cultivo y el ensayo de viabilidad celular con azul de tripano se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Figura 10 y 11 respectivamente).

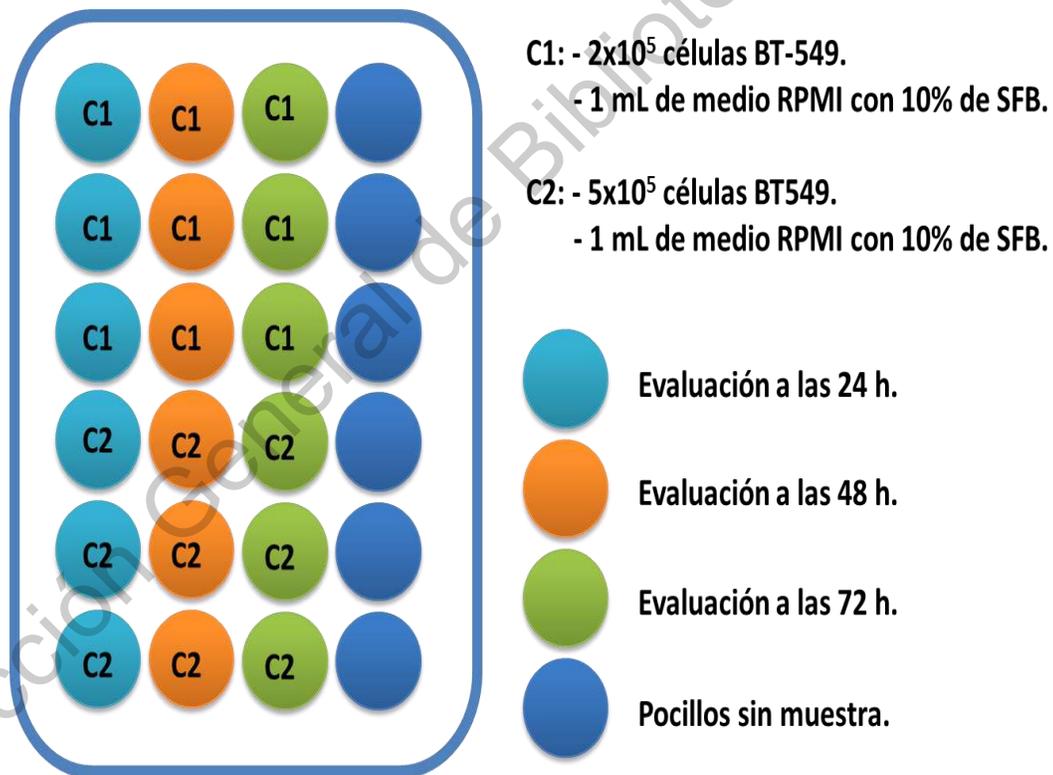


Figura 12. Diseño para el subcultivo celular, en placa de 24 pocillos.

El análisis para la caracterización de la distribución de fases, del ciclo celular de la línea BT-549 se realizó con cultivos de 48 h con las dos concentraciones celulares evaluadas mediante el ensayo de ADN BD Cycletest™ (Becton Dickinson, EE.UU.) en un citómetro de flujo FACS Aria III (Becton Dickinson, EE.UU.) (Figura 13).

Una vez determinada la concentración celular de partida, las muestras lavadas y resuspendidas en 1 mL de PBS, se transfirieron a tubos eppendorf de 1.8 mL y se centrifugaron a 1,100 rpm durante 5 minutos en centrifuga refrigerada Primo™R (Sorvall™, Thermo Scientific) a 25°C. Se decantó cuidadosamente todo el sobrenadante, extrayendo la última gota sobre un pañuelo Kimwipes® EX-L (Kimtech Science™, Kimberly-Clark).

Al pellet formado se agregaron 250 µL de solución A (tampón de tripsina), se mezcló suavemente con la mano y se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) durante 10 minutos, después se agregaron 200 µL de solución B (inhibidor de tripsina y RNase buffer) a cada tubo y se mezcló e incubó de la misma manera. Posteriormente se realizó la tinción con 200 µL con ioduro de propidio (PI) (Solución C) la cual se mantuvo en frío hasta su utilización (2- 8°C). Se homogenizó y se incubó en oscuridad cubriéndolo con papel aluminio, manteniendo las muestras sobre hielo durante 10 minutos y hasta su lectura en el citómetro de flujo dentro de las 3 horas posteriores (Figura 13).

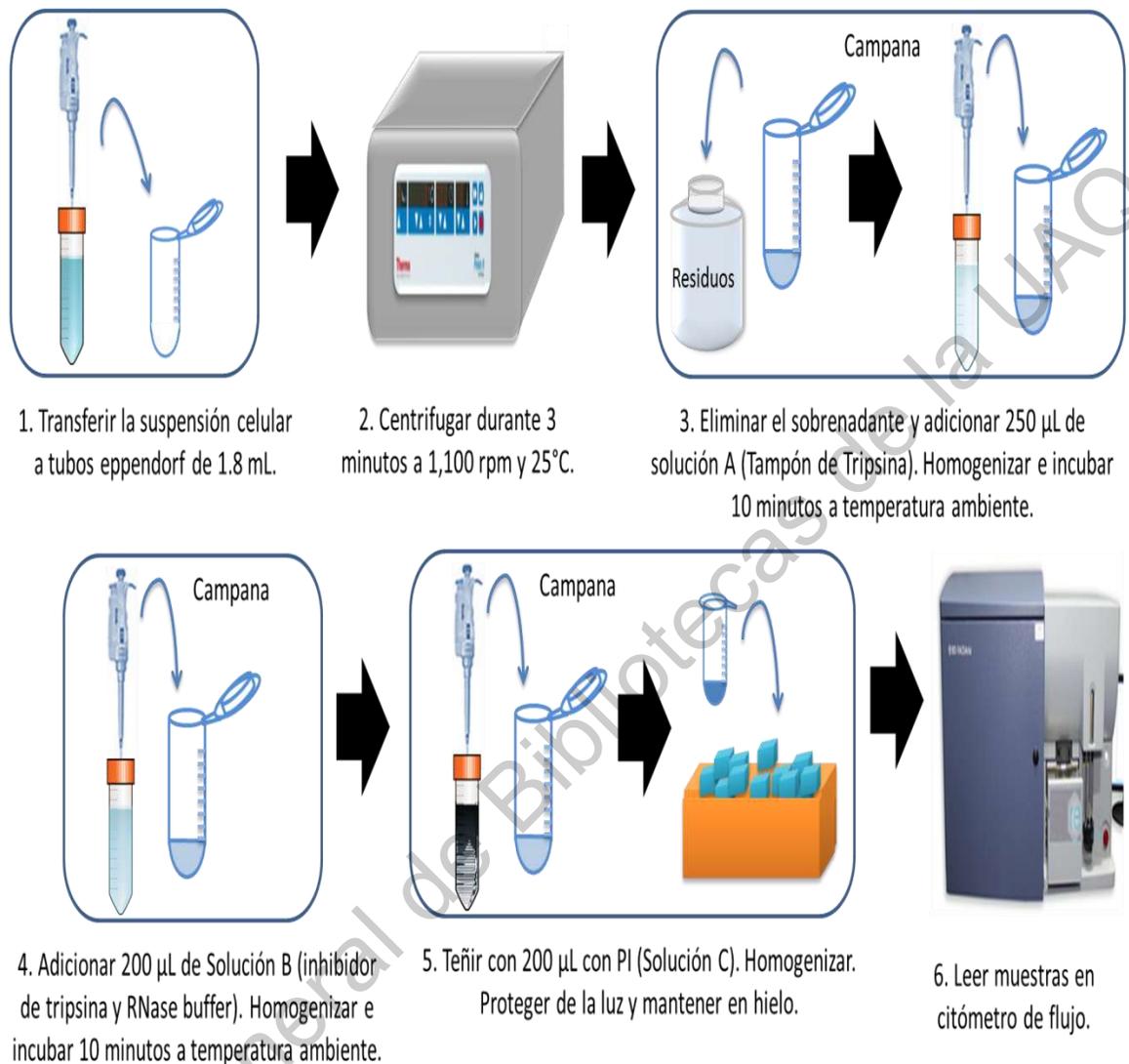


Figura 13. Esquema de trabajo para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

4.5 Análisis estadístico.

Se determinó la normalidad y homocedasticidad de los datos y se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), para tres poblaciones independientes y las diferencias entre grupos se consideraron significativas a un valor de p menor de 0.05 ($p < 0.05$) con la prueba de Tukey, utilizando el software SPSS® Statistics V.22.0 (IBM®, EE.UU.)

5. Resultados y discusión.

5.1 Condiciones del cultivo *in vitro* de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp.

En la tabla 5, se muestran los resultados del número de conidios/mL, producidos durante el cultivo de 14 días a 28°C, de 2×10^7 conidios por gramo de fuente de carbono, de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., en PDA, después de su conteo en cámara de Neubauer (Figura 15b). Observándose una disminución en la producción de conidios en la especie de *Penicillium* sp., respecto a *Mucor* sp., y *Cladosporium* sp., siendo esta última, la especie que mostró mayor producción de conidios aunque no hubo diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Tabla 5. Resultados de la conidiación de las tres especies en agar dextrosa papa (PDA).

Especie	Conidios/mL
<i>Cladosporium</i> sp.	1.2×10^9
<i>Mucor</i> sp.	1.19×10^9
<i>Penicillium</i> sp.	9.84×10^8

Es importante desarrollar un protocolo de inoculación que asegure la disponibilidad de suficiente material que actúe como propágulo inicial, debido a que el mantenimiento *in vitro* de microorganismos, requiere el uso de medio de cultivos que suministren tanto los nutrientes, como las condiciones necesarias para la multiplicación de estos (Kavanagh, 2017). Ya que a partir de la germinación de los conidios presentes, se forma una serie de tubos rígidos ramificados llamados hifas, y que a su vez conforman una estructura o cuerpo vegetativo filamentosos, denominado micelio (Figura 16) cuyo crecimiento se

prolonga mientras exista disponibilidad de nutrientes en el medio, los cuales son absorbidos a través de las hifas vegetativas que lo penetran. Mientras que las hifas aéreas, son las portadoras de las estructuras reproductoras (Hautbergue, et al., 2018; Kavanagh, 2017; Santamarina, et al., 2003).

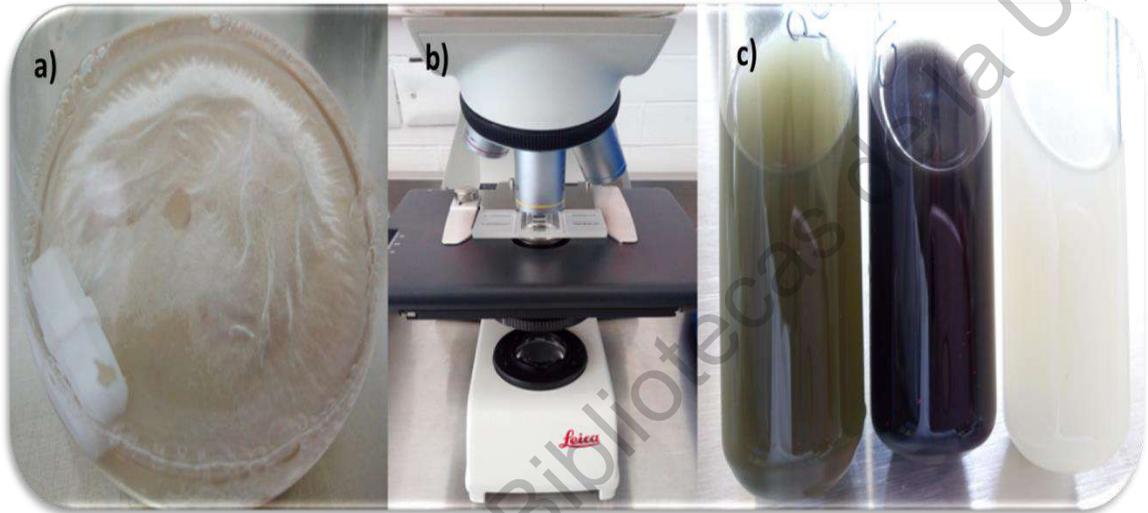


Figura 15. Cosecha de conidios de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. a) Cosecha de conidios de *Mucor* sp., b) Cuenta en cámara de Neubauer y c) Conidios cosechados de *Penicillium* sp., (izquierda), *Cladosporium* sp., (centro) y *Mucor* sp., (derecha).

Durante la determinación de las condiciones de cultivo *in vitro* de los hongos filamentosos o mohos, es importante considerar, que esto supone la modificación de factores a los que están expuestos en la naturaleza y que eventualmente pueden favorecer o afectar su actividad y crecimiento. Entre estos factores se encuentra, la temperatura, pH, luz, así como la naturaleza de los nutrientes del medio y las propiedades físico-químicas del mismo (Barranco et al., 2018; Herrera y Laurentin, 2012).

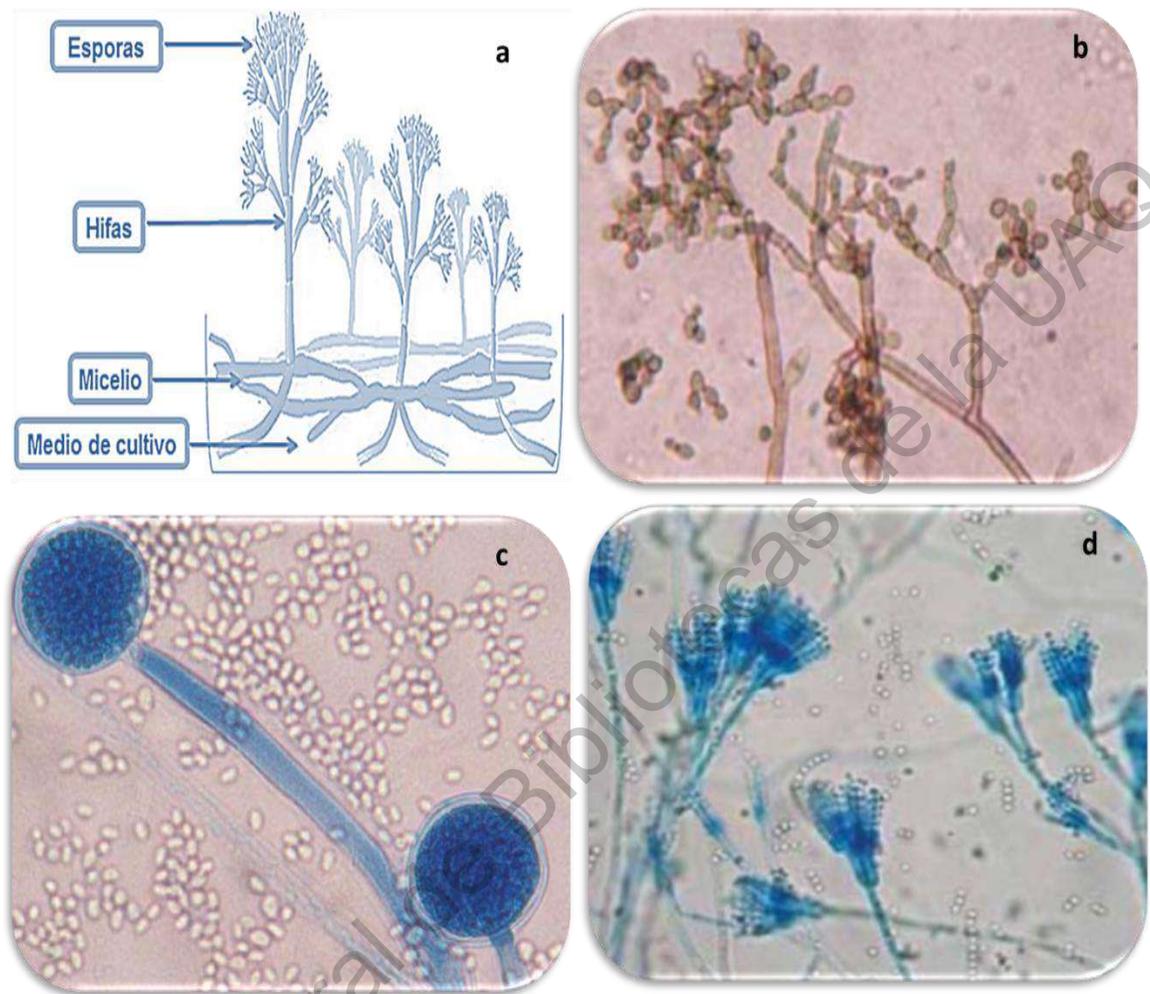


Figura 16. Morfología de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. a) Estructura general de los hongos filamentosos. Vista microscópica a 40x de: b) *Cladosporium* sp., (yodo lugol), c) *Mucor* sp., (azul de algodón) y d) *Penicillium* sp., (azul de algodón).

Teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvieron los resultados del cultivo de 2×10^7 conidios por gramo de fuente de carbono, de las tres especies en PDA y en medio líquido de Pontecorvo, observándose una ocupación en la totalidad de la superficie del medio por parte de las tres especies fúngicas, cuando fueron cultivadas en PDA (Figura 17). En donde su base nutricionalmente rica, debido a

la infusión de papa (Tabla 6), favorece el desarrollo del hongo, además de fomentar la producción de pigmentos y la conidiación.

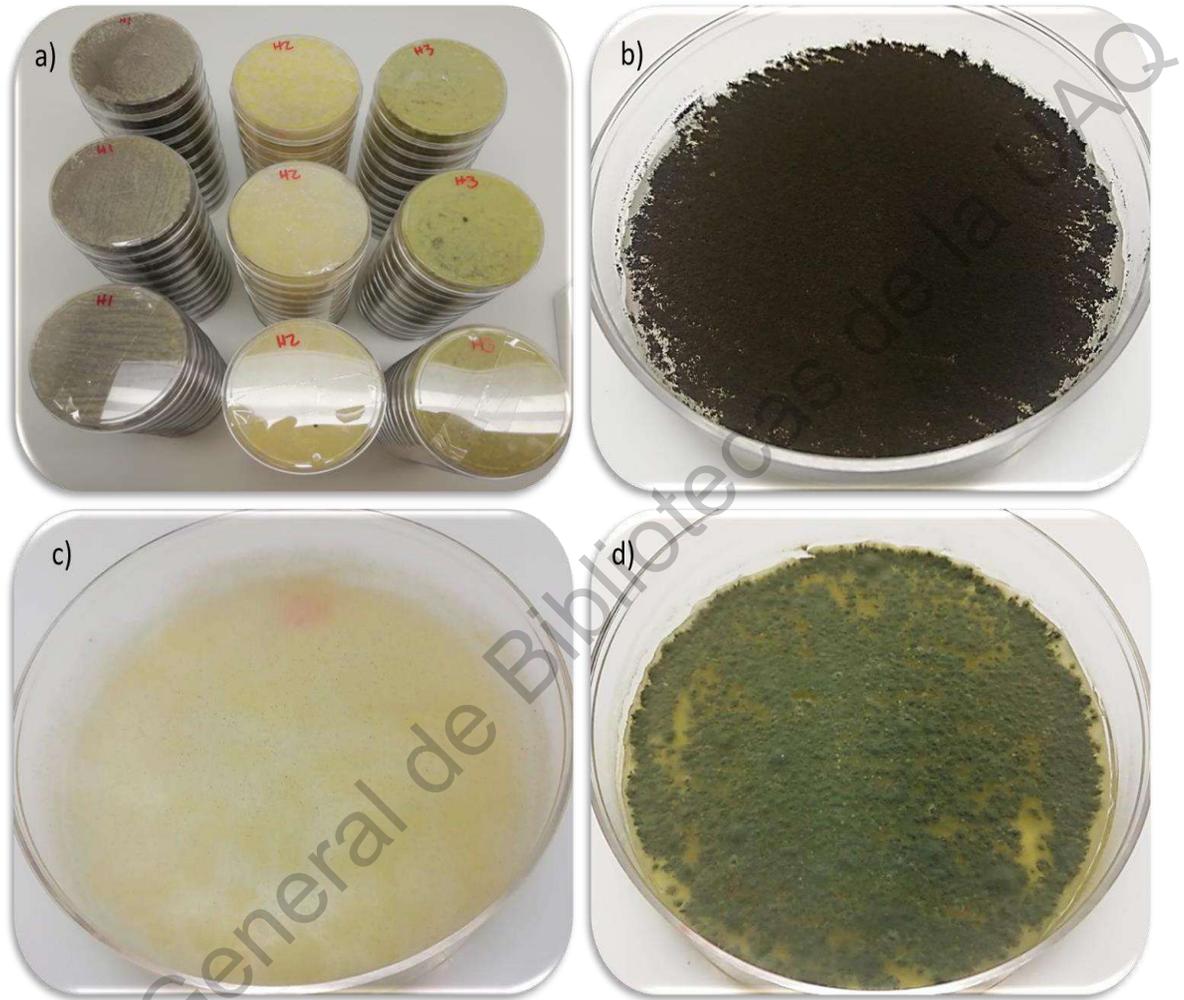


Figura 17. Cultivos de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., en PDA. a) Placas de cultivo de 14 días de las 3 especies fúngicas; *Cladosporium* sp., b), *Mucor* sp., c) y *Penicillium* sp., d).

Por otro lado, en la evaluación del cultivo en medio líquido se obtuvo el desarrollo de las especies *Cladosporium* sp., y *Penicillium* sp., no así de *Mucor* sp. (Figura 18). Siendo un factor determinante, en la elección de las condiciones óptimas de la evaluación *in vitro* de las especies estudiadas.

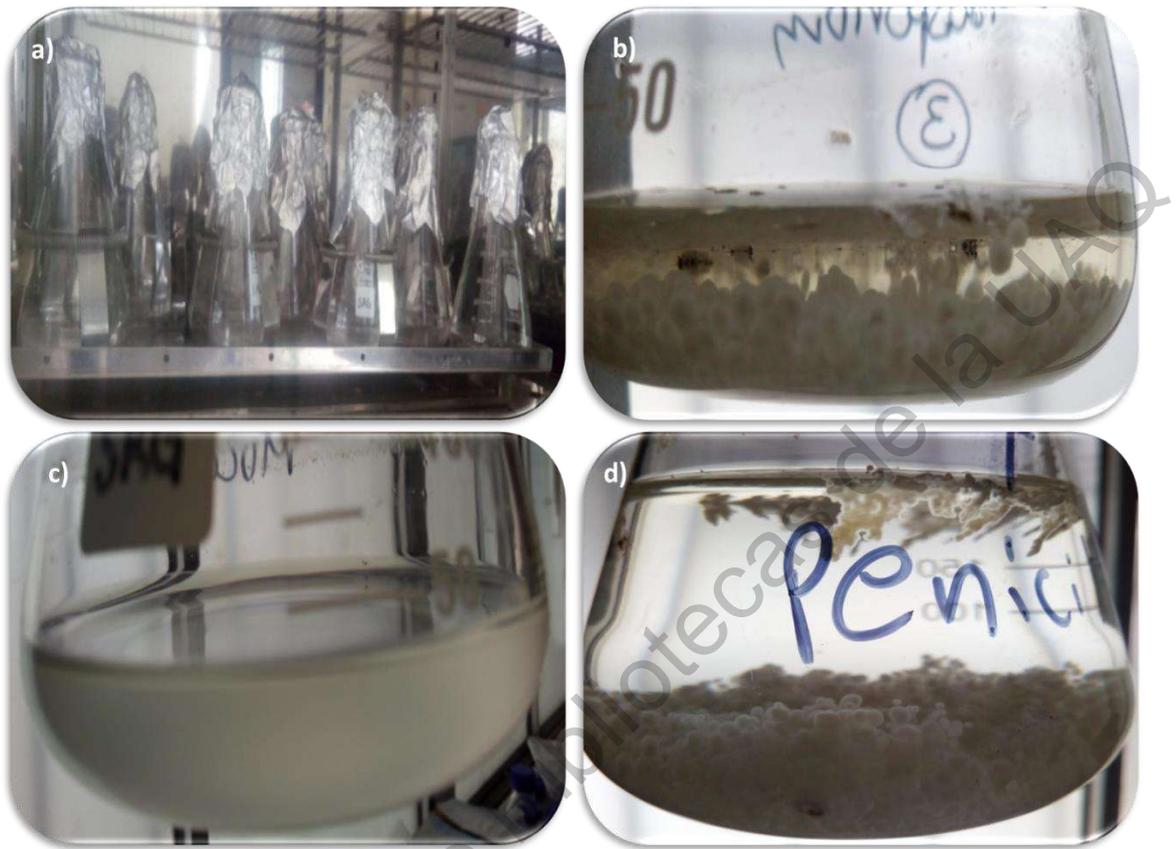


Figura 18. Cultivo de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., en medio líquido de Pontecorvo. a) Cultivos de 14 días de las 3 especies. *Cladosporium* sp. (b), *Mucor* sp. (c) y *Penicillium* sp. (d).

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que cuando se cultivan en igualdad de condiciones, 14 días de incubación, ciclos ambientales de luz/oscuridad, manteniendo una temperatura constante de 28°C y un pH de 5.6, los cuales se encuentran dentro de los rangos recomendados de 25 y 30°C y entre 4 y 6 respectivamente (Kavanagh, 2017); existen diferencias en el desarrollo vegetativo y esporulación de las especies evaluadas, haciendo notable la influencia de la naturaleza de los nutrientes del medio, así como las propiedades físico-químicas del mismo, incluyendo la cantidad de agua disponible, conocido como actividad de agua (a_w). La a_w tiene un valor máximo de 1.0 y un valor de 0.0; es considerado como uno de los factores determinantes en el crecimiento

fúngico y de gran importancia para comprender la ecología de las diferentes especies en su comportamiento individual. ya que su desarrollo, está dado en función de la cantidad de agua presente en el medio para la germinación de los conidios (Hautbergue et al., 2018; Kavanagh, 2017; Santamarina et al., 2003).

Sin embargo, a pesar de que se ha descrito una aw por encima de 0.82, para las tres especies fúngicas (Kavanagh, 2017; Santamarina, et al., 2003) el crecimiento en medio líquido de *Penicillium* sp., y de *Cladosporium* sp., podría estar relacionado con una mayor tolerancia en relación al afecto del estrés, el cual se puede generar por la presión osmótica presente en el medio de cultivo y a su capacidad de modificar sus necesidades fisiológicas, desarrollando estructuras de resistencias, que permiten su supervivencia durante largos periodo de tiempo y condiciones hostiles o de estrés extremo. A diferencia de *Mucor* sp., en donde se vió reducido su desarrollo vegetativo, lo que supone una menor tolerancia a las condiciones de estrés y una menor capacidad de adaptación respecto a *Penicillium* sp., y *Cladosporium* sp. (Figura 18c).

Contrastando de esta manera, con el crecimiento en medio sólido, en donde aunque la esporulación de *Penicillium* sp., se vió disminuida, no fué así para el desarrollo vegetativo de las tres especies, así como tampoco la producción de pigmentos (Figura 17). Siendo la ausencia de estos, otra de las diferencias observadas cuando se cultivaron en medio líquido (Figura 18); sugiriendo que también, la aw influye en las respuestas de adaptación; como por ejemplo, contra los efectos nocivos de la radiación luminosa. Ya que los pigmentos producidos a través de su metabolismo secundario y que confieren una coloración característica a las diferentes especies fúngicas. Se les atribuye una acción de agentes protectores; así como también, participando en funciones de señalización, regulando procesos tan importantes como el propio crecimiento y desarrollo. Así como para la síntesis de otras moléculas y como factores de virulencia (Kavanagh, 2017; Lucentini, et al., 2017).

Algunos ejemplos de éstos compuestos son los carotenos, producidos por muchos hongos, como *Mucor* que acumula β -caroteno en respuesta a la luz, presentando colonias de apariencia vellosa-algodonosa, con coloración que puede ir desde el blanco hasta el grisáceo-amarillento (Figura 17c). Las melaninas (típicas de animales y también de hongos), las cuales le confieren a *Penicillium* una pigmentación inicialmente blancas y que luego se convierten en verde-azuladas o gris-verdosas (Figura 17d). De manera similar, *Cladosporium* presentan colonias lanosas o de textura algodonosa, aunque éste último, con una coloración que va desde el olivo-grisáceo hasta el negro (Figura 17b) (Ramírez et al., 2006; Schulz et al., 2002).

Además de la diferencia en el agua disponible de los medios de cultivo empleados, también se puede observar en la tabla 4, las diferencias en relación a la naturaleza de los componentes del medio. Debido a que los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, no pueden realizar fotosíntesis; por lo que deben nutrirse a partir de materia orgánica disponible. Así mismo, debido a su pared celular formada por quitina el cual es un compuesto polisacárido fuertemente rígido, estos nutrientes deben ser además, simples y solubles para poder absorberlos (Kusari, et al., 2012; Sánchez-Pérez et al., 2014).

Tabla 6. Fórmula por litro de agua de los medios de cultivo evaluados.

Agar Papa Dextrosa		Medio líquido de Pontecorvo	
Extracto de papa	4.0 g	NaNO₃	6.0 g
Glucosa	20.0 g	KH₂PO₄	1.52 g
Agar	1.0 g	KCl	0.52 g
pH final 5.6 +/- 0.2		MgSO₄	0.52 g
		Sacarosa	10.0 g
		Sales de Cove	20.0 mL
		pH final 5.6 +/- 0.2	

Según Kavanagh (2017), una de las características principales de los hongos es su inhabilidad de utilizar el carbono inorgánico, siendo la glucosa, el compuesto más simple como fuente de energía, aunque también utilizan sacarosa como la presente en el medio líquido de Pontecorvo, así como compuestos complejos de carbono orgánico como el almidón del medio a base de papa. En vista de la formulación de cada medio, se observó un mayor enriquecimiento de fuente de carbono en el medio sólido en comparación con el líquido de Pontecorvo. Lo que pudiese explicar el óptimo crecimiento de los hongos cuando fueron cultivados en PDA. Sin embargo, se esperaría que el crecimiento se viera afectado para las tres especies durante su cultivo en medio líquido, lo cual solo sucedió para *Mucor* sp.

De igual forma, los hongos aprovechan fuentes de nitrógeno inorgánico como sales de amonio y nitratos (Kavanagh, 2017), como por ejemplo los presentes en el medio líquido de Pontecorvo (Tabla 6). Esto influye en el crecimiento, el cual puede ser dividido cualitativamente en tres fases: una primera fase, sin crecimiento aparente y que tiene dos componentes; una fase anterior a la germinación de conidios y una fase en que el crecimiento se presenta pero no se evidencia; mientras que en la segunda fase ocurre un rápido crecimiento y un desarrollo del micelio particularmente en las extremidades de las hifas, en donde las células al interior del micelio no contribuyen al crecimiento neto, sino que aportan nutrientes a células periféricas, especialmente a estructuras aéreas. En ésta fase ocurre la utilización de carbohidratos, nitrógeno y fosfatos; además pueden aparecer los conidios al final de ésta fase o antes de su finalización. Finalmente, una tercera fase sin crecimiento neto o de autólisis y disminución en peso seco, además de la aparición de nitrógeno y fosfato en el medio; lo que puede representar una fase de síntesis de polisacáridos, sin un aumento en otros componentes celulares. Pudiendo realizarse una movilización de nitrógeno a partir de hifas precursoras, para su uso en el crecimiento neto. Ya que éste es reutilizado después de agotar fuentes exógenas de nitrógeno disponible. La

autólisis del micelio es debido al rompimiento de quitina, carbohidratos y proteínas, catalizado por las enzimas del hongo; que entre otros productos de la lisis se encuentran el amoníaco, aminoácidos, compuestos de fósforo orgánico y compuestos de azufre. La disminución del crecimiento se debe a dos factores principales: la acumulación de metabolitos tóxicos, ácidos orgánicos en medios con gran cantidad de carbohidratos y de amoníaco en medios con alto contenido de nitrógeno, y debido al agotamiento de la fuente de carbono. Así mismo en esta fase las células realizan un metabolismo secundario, específicamente rutas metabólicas que no son esenciales para las células pero que están involucradas en la supervivencia del organismo (Barranco et al., 2018; Kavanagh, 2017; Fernández, 2012; Junco y Rodríguez, 2001) .

Entre los nutrientes que se precisan para el desarrollo fúngico, se encuentra el potasio, para el metabolismo de carbohidratos, actividad enzimática y para mantener el balance iónico; el fósforo, que es un componente esencial de ácidos nucleicos y de mecanismos para la transferencia de energía. El magnesio, que actúa como activador de enzimas requeridas en el metabolismo del ATP; el azufre, para la síntesis de algunos aminoácidos y vitaminas; y el calcio, que actúa como activador de algunas enzimas los cuales están presentes en mayor cantidad en la formulación del medio líquido de Pontecorvo (Kavanagh, 2017; Sánchez-Pérez et al., 2014; Borrego, 2012; Kusari et al., 2012).

Por lo que a pesar de las diferencias observadas en el crecimiento de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., cuando fueron cultivados en medios con nutrientes de diferente naturaleza, así como también diferentes propiedades físico-químicas, ambos cumplen con los requerimientos nutricionales de acuerdo a la literatura citada anteriormente. Siendo la propia biología así como las características intrínsecas de cada especie (Figura 16), las que determinan su crecimiento en las condiciones empleadas. Sugiriendo estudios más profundos que contribuyan a comprender la ecología de las diferentes especies fúngicas en su comportamiento individual.

5.2 Evaluación de la extracción consecutiva por sonicación con metanol y hexano.

La eliminación del contenido de agua en los cultivos en medio líquido, representaron una dificultad a la hora de llevar a cabo la recuperación de la biomasa, en donde la disposición de equipamiento que permita un adecuado procesamiento de las muestras representa un factor importante para el cumplimiento de los objetivos planteados. En este caso, el mantener las muestras en estufa de convección con la finalidad de eliminar el contenido de agua previo a la extracción de metabolitos, produjo en algunos casos, nuevamente el crecimiento del hongo y en otros, la contaminación de las muestras (Figura 19). Siendo la razón, por la cual se descartaron del proceso de extracción.



Figura 19. Eliminación del contenido de agua en cultivos de medio líquido de Pontecorvo.

Por otro lado, durante la recuperación del micelio a partir del cual se realizó la extracción de los compuestos producidos durante el cultivo *in vitro* en PDA, se observó mayor capacidad de penetración de *Cladosporium* sp., en el medio. Lo anterior representó un obstáculo cuando se precisa de la recuperación completa del micelio y que se refleja en una menor cantidad de micelio recuperado como se muestra en la tabla 7, no así para *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. (Figura 17), los

cuales se caracterizaron por una fácil recuperación de este, lo que supone una ventaja y contribuyó en la determinación de las condiciones óptimas para la extracción de los compuestos producidos y su posterior análisis cromatográfico.

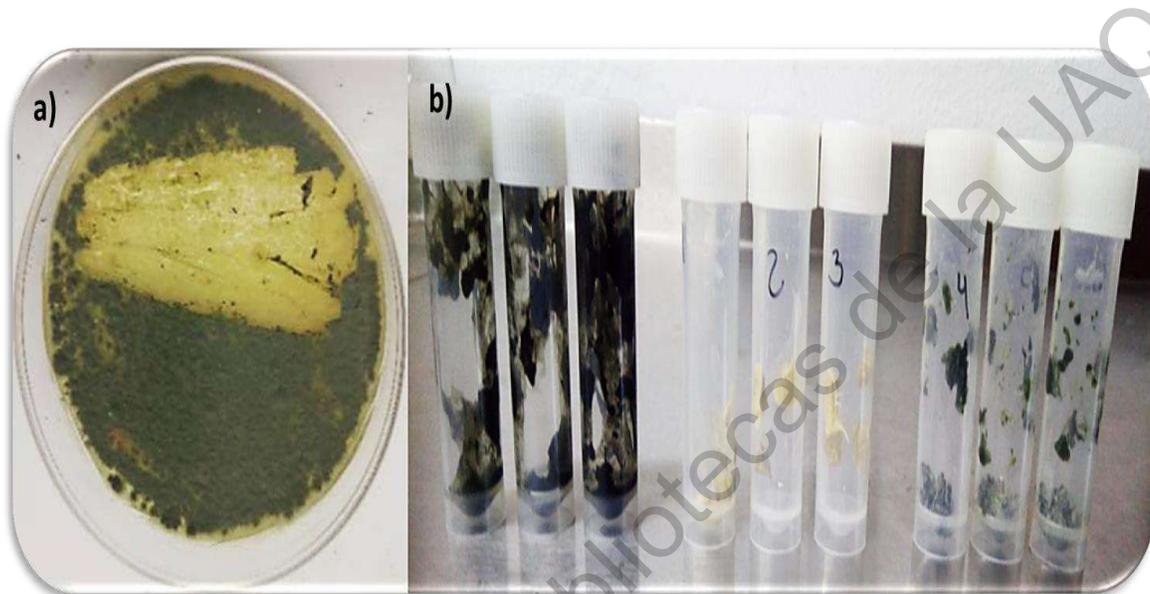


Figura 20. Recuperación de micelio de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. a) Recuperación de *Penicillium* sp., cultivado en PDA. b) Micelio recuperado de *Cladosporium* sp., (izquierda), *Mucor* sp., (centro) y *Penicillium* sp., (derecha).

Tabla 7. Micelio recuperado de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp.

Especie	Micelio recuperado (mg)
<i>Cladosporium</i> sp.	432 ± 31.19
<i>Mucor</i> sp.	528 ± 49.05
<i>Penicillium</i> sp.	954 ± 53.95

Los resultados del promedio de los miligramos obtenidos y su correspondiente porcentaje de rendimiento, de los extractos metanólico y hexánico para cada uno de los hongos se muestran a continuación.

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólico y hexánico.

Especie/Replica	Micelio (mg)	Extracto (mg)	% de rendimiento
<u>Extracción con hexano:</u>			
<i>Cladosporium</i> sp.	432 ± 31.19	33.3 ± 12.09	7.9 ± 3.52
<i>Mucor</i> sp.	528 ± 49.05	9.3 ± 1.15	1.8 ± 0.41
<i>Penicillium</i> sp.	954 ± 53.95	7.3 ± 1.15	0.9 ± 0.31
<u>Extracción con metanol:</u>			
<i>Cladosporium</i> sp.	199 ± 5.86	73.0 ± 9.54	36.9 ± 5.41
<i>Mucor</i> sp.	158 ± 5.29	44.7 ± 11.15	23.6 ± 30.01
<i>Penicillium</i> sp.	265 ± 19.97	56.7 ± 9.29	27.3 ± 6.64

Observándose que el mayor rendimiento de extracción (7.9%) se obtuvo del hongo *Cladosporium* sp., en función a los mg de micelio empleado, cuando se

utilizó hexano como disolvente para la extracción. Siendo la especie de *Penicillium* sp., la que menos extracto produjo y por ende tuvo muy bajo rendimiento (0.9%), esto a pesar de tener el 220.8% de micelio recuperado de las cajas petri respecto a *Cladosporium* sp.

Esto se replicó cuando se utilizó metanol como disolvente, *Cladosporium* sp., volvió a dar un mayor cantidad de extracto (156.4% y 135.2% de rendimiento) en comparación a las especies de *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., respectivamente. Sin embargo, en esta ocasión *Mucor* sp., fué la especie con menor cantidad de extracto obtenido, esto es un 55.8% si lo comparamos con *Cladosporium* sp., y del 86.4% respecto a *Penicillium* sp.

La extracción con solventes orgánicos es eficiente y sencilla y es la técnica más común para obtener los compuestos producidos por hongos, su finalidad es la separación de éstos por acción de un disolvente (Sierra, et al.; 2018).

Debido a que se desconoce la naturaleza química de los compuestos a extraer, se deben tener en cuenta que el rendimiento cuantitativo y cualitativo de la extracción depende en gran medida de la polaridad del disolvente utilizado, en este caso, la selección de hexano y metanol obedece a que son compuestos orgánicos de naturaleza polar y apolar, lo que contribuye a la extracción de compuestos similares ya que se desconoce la naturaleza de los compuestos producidos por las especies estudiadas. Reportándose en la literatura, el uso de diferentes proporciones como de solventes de extracción (Frisvad, 2014; Muñoz et al., 2016; Santamarina et al., 2003; Soto & Rosales, 2016).

Sin embargo, no existe un método y solvente definido, pues ello dependerá de la composición química de los compuestos a extraer, la concentración del solvente, temperatura, tiempo de contacto, relación masa-solvente, entre otros. El método seleccionado en el presente trabajo se realizó mediante un equipo de ultrasonido que como su nombre lo indica, aplica sonidos de alta frecuencia (20-100 kHz), logrando irradiaciones ultrasónicas y mediante estas se manifiestan

efectos fisicoquímicos, haciendo que las partículas sólidas y líquidas, vibren y se aceleren, a través del fenómeno llamado cavitación, donde la formación de burbujas; debido al crecimiento del núcleo de la biomasa y a su colapso, genera una variación de presión y permitiendo una mayor transferencia de masa, la cinética del calor y los efectos de la presión en la pared celular a través de ultrasonido, da como resultado una difusión más rápida o una mayor tasa de partición del soluto de la matriz sólida, al solvente, dando como resultado el pase eficiente de los compuestos de interés de la fase sólida al disolvente (Sierra, et al.; 2018).

Otro factor a considerar en el desarrollo de métodos para la extracción de compuestos, son las temperaturas de tratamiento, las cuales no deben sobrepasar los 40 °C para evitar la degradación de metabolitos termolábiles (Sierra, et al., 2018). Dicha temperatura, se mantuvo durante todo el proceso de extracción, así como durante la eliminación de disolvente, aquí descritos. Estos mismos autores, mencionan que en la homologación de técnicas de extracción, se recomienda hacer extracción sucesiva con dos solventes de polaridad creciente, empleando primero el de menor polaridad y luego el de mayor polaridad, como en este caso, primero con hexano, seguida de la extracción con metanol.

El análisis mediante UV/Vis inicial de los extractos, mostró máximos de absorción de 307, 316 y 394 nm para los extractos hexánicos de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., respectivamente. Mientras que los correspondientes a los extractos metanólicos, se ubicaron en 246, 322 y 418 nm, respectivamente (Figura 21).



Figura 21. Máximos de absorción de los extractos metanólico y hexánico de *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp.

En función de lo anterior, se seleccionaron 3 zonas de monitoreo (215, 350 y 450 nm) para el análisis por HPLC-DAD, el cual se realizó como una primera evaluación a fin de obtener los cromatogramas en función del tiempo y la señal obtenida (Figura 22 y 23). Los cuales sirven para garantizar la integridad de las muestras, empleándolos de referencia ante posible degradación de los compuestos o contaminación de las muestras, para lo cual se realizaría un análisis con las mismas condiciones de trabajo y se compararían los espectros de ambos. Además, a partir de este análisis, se modificaron los gradientes de las fases líquidas empleadas (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de gradiente obtenidos para el análisis de los extractos por LC-DAD.

EXTRACTOS HEXÁNICOS			EXTRACTOS METANÓLICOS		
TIEMPO	FASE A	FASE B	TIEMPO	FASE A	FASE B
2 min	95%	5%	5 min	100%	0%
7 min	5%	95%	7 min	95%	5%
32 min	0%	100%	22 min	5%	95%
35 min	95%	5%	24 min	5%	95%
37 min	95%	5%	29 min	95%	5%
			31 min	95%	5%

De esta manera, se obtuvo una mayor señal de los cromatogramas. Ya que como se observa en la figura 22a, la señal queda inconclusa al minuto 35 para el análisis del extracto hexánico (D1, Disolvente 1) de *Cladosporium* sp. (H1, Hongo 1), aumentando el tiempo de gradiente (Figura 22b) de 10 a 25 minutos para un 95% de ACN (fase B). Lo que permite la obtención de mayor señal; ya que los compuestos presentes al ser extraídos con un solvente apolar interaccionan en mayor medida con la fase estacionaria, aumentando su tiempo de retención (RT), requiriendo condiciones que les permitan ser detectados (De Villiers, et al., 2016).

Observándose además, diferencias en la intensidad de señal y número de picos obtenidos para cada extracto. Lo que sugiere un mayor enriquecimiento de compuestos de baja polaridad, en los extractos de *Cladosporium* sp., y *Mucor* sp., respecto a *Penicillium* sp. Esto concuerda con los datos obtenidos del rendimiento de la extracción (Tabla 9), en donde *Penicillium* sp., mostró los rendimientos más bajos en la extracción con hexano. Siendo un aspecto importante a considerar se

mantenga la concordancia entre los datos obtenidos en cada parte del proceso que se realiza cuando se busca la determinación de condiciones de análisis como los aquí presentados (Villas, et al.; 2005).

Por otro lado, los resultados del análisis de los extractos metanólicos mostrados en la figura 23, se observan los cromatogramas en condiciones iniciales de gradiente (Figura 23a). Así como después de su modificación (b, c y d). Donde ésta fue, a expensas de la observación de la señal sesgada hacia la derecha del primer análisis de *Cladosporium* sp. (a), obteniéndose una mejor señal y RT de los compuestos presentes (b). Teniendo en cuenta que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo de la sonicación con metanol (disolvente 2, D2), las señales obtenidas en comparación con los extractos hexánicos, son mayores.

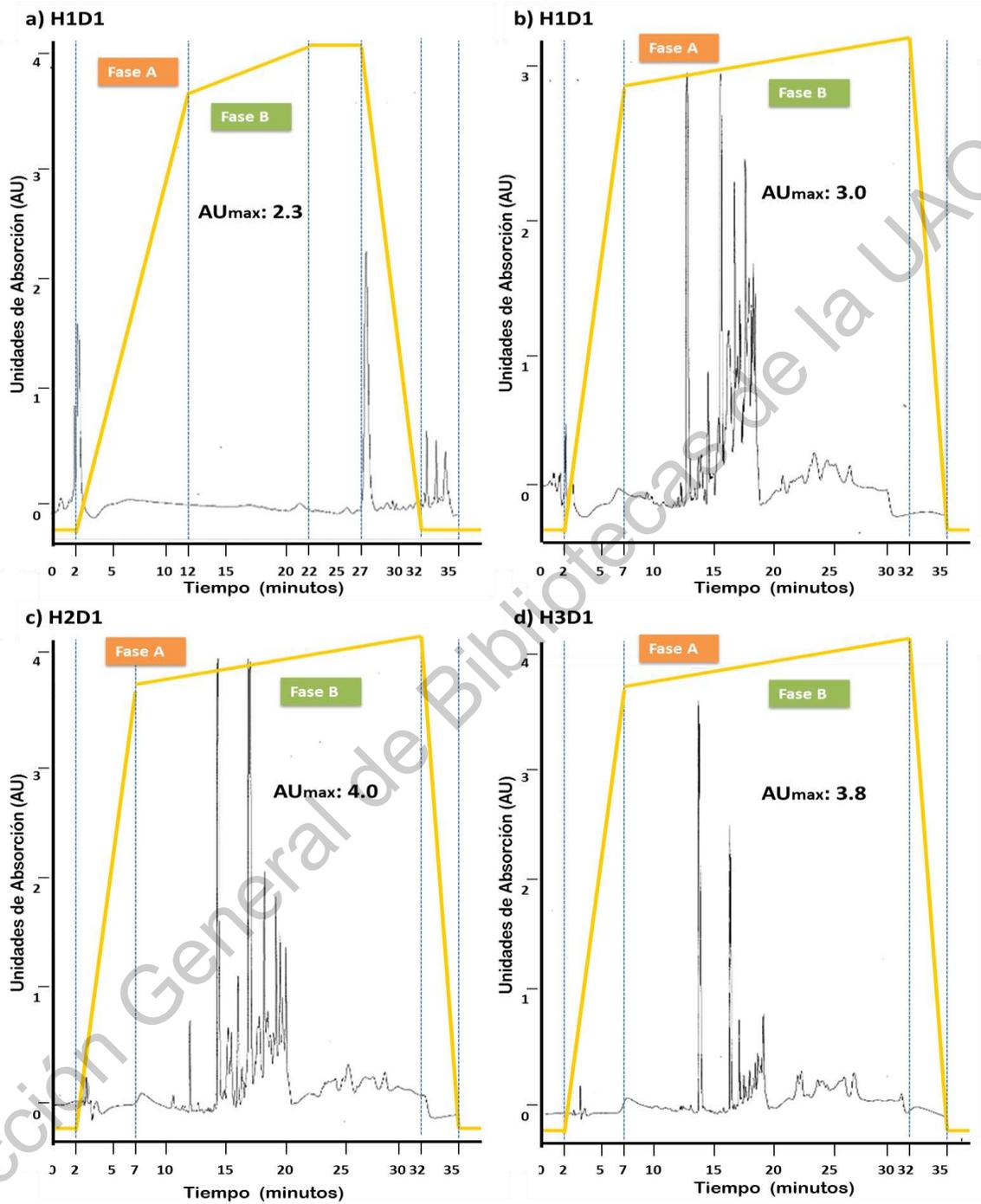


Figura 22. Cromatogramas de los extractos hexánicos (D1) por HPLC-DAD a 350 nm. a) Condiciones iniciales de gradiente y después de su modificación donde: a) y b) *Cladosporium* sp. (H1), c) *Mucor* sp. (H2) y d) *Penicillium* sp. (H3).

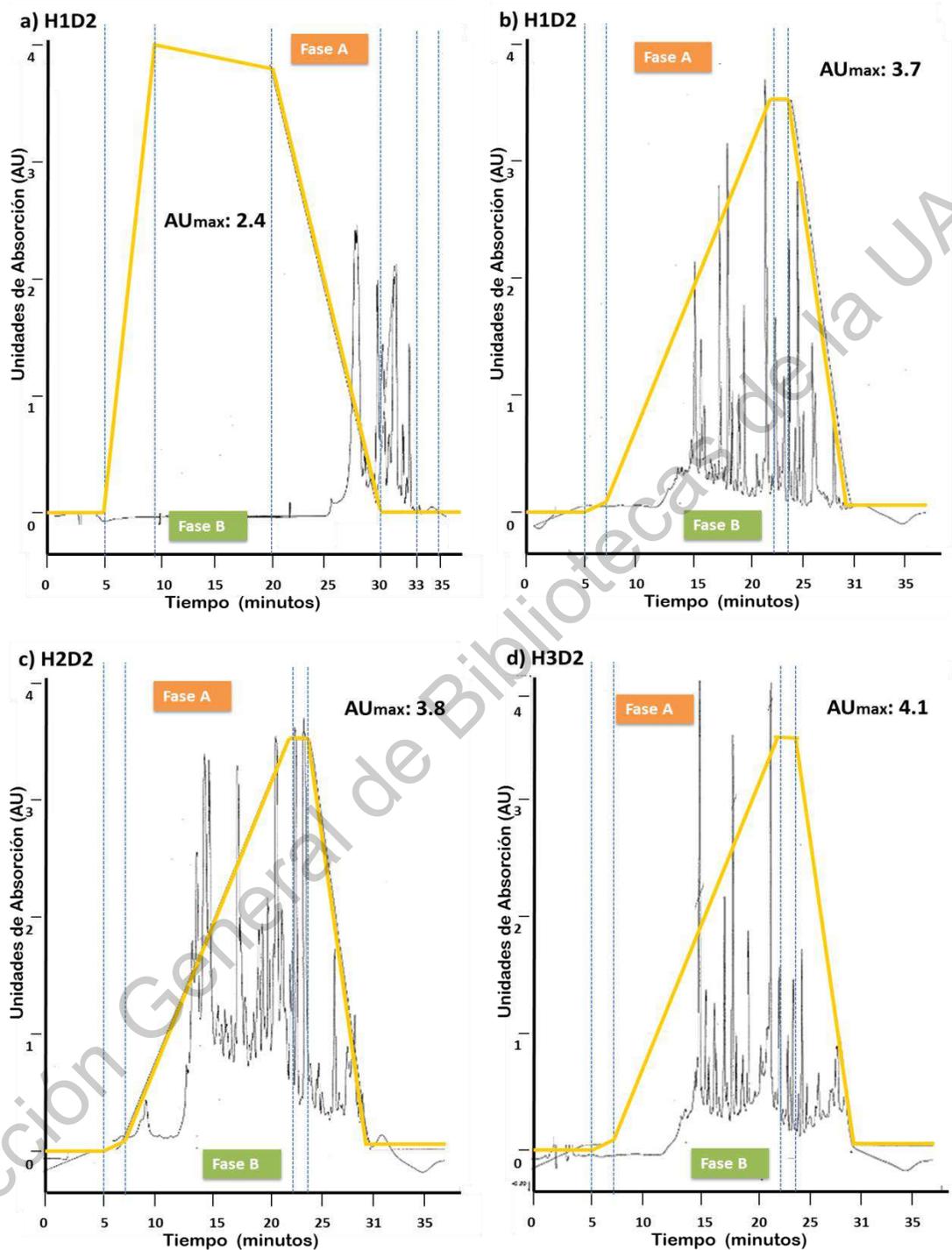


Figura 23. Cromatogramas de los extractos metanólicos (D2) por HPLC-DAD a 350 nm. a) Condiciones iniciales de gradiente y después de su modificación donde: a) y b) *Cladosporium* sp. (H1), c) *Mucor* sp. (H2) y d) *Penicillium* sp. (H3).

5.3 Cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M.

Los resultados de la evaluación de los cultivos con 2 concentraciones de poblaciones celulares (Tabla 10), a fin de determinar el número de células idóneo para los ensayos posteriores. Muestran al cultivo en placa de 24 pozos con una población de 2×10^5 células, como la ideal para los ensayos posteriores, ya que la viabilidad celular (86%) con la que se inició el subcultivo, se mantuvo. Además de que el número de células al final del análisis se ajusta al tiempo de duplicación reportado para la línea BT-549 de 20.9 h (Risinger, et al.; 2016).

En donde se consideró, que para la duplicación obtenida del 91% de las células cultivadas a las 48 h, las células de la línea BT-549 al igual que la mayoría de las células de vertebrados cultivadas *in vitro*, desarrollan un crecimiento en monocapa, adheridas a una superficie (dependiente de anclaje). Requiriendo tiempo para secretar proteínas de MEC y proteoglicanos, después de ser transferidas de un recipiente de cultivo a otro, que le permitan volver a adherirse al sustrato antes de proliferar (Beltran & González, 2016). Observándose en este caso un tiempo de 27.1 h, según los datos obtenidos.

Tabla 10. Viabilidad y proliferación celular, de la línea BT-549, a las 48 horas de cultivo.

Células cultivadas:	2×10^5 células	5×10^5 células
Células Totales	3.82×10^5	2.69×10^5
Células Vivas	3.29×10^5	1.67×10^5
Viabilidad	86%	62%
Duplicación	91%	27%

La evaluación de dos concentraciones celulares, obedece a que entre los factores que deben considerarse para elegir los recipientes de cultivo más adecuados para nuestro experimento, son: la masa celular requerida, el tipo de muestreo y de análisis requerido. En donde, debido a que el ensayo de citotoxicidad que se propone más adelante requiere de múltiples repeticiones (24 en total) y que para un procesamiento simultaneo de las muestras, se recomienda el uso de placas multipozos. Se eligió en este caso, la placa de 24 pozos la cual posee 2cm^2 de superficie disponible, en donde para conocer el número esperado de células que puede contener cada recipiente de cultivo, se utilizan como referencia las células HeLa (línea celular proveniente de carcinoma de cérvix). Señalándose que para una placa de 24 pocillos se espera una población de aproximadamente 5×10^5 en 1 mL de medio de cultivo (Beltran y González, 2016).

Los resultados obtenidos de 3.82×10^5 células a las 48h, a partir del cultivo de una población celular de 2×10^5 , y que como se mencionó anteriormente, esto representa la duplicación del 91% de las células de partida; son concordantes a las características particulares de la línea celular BT-549. Las cuales son células gigantes multinucleadas, polimórficas y con componentes de tipo epitelial, la cual posee un mayor tamaño comparada con las células HeLa de $\approx 20\text{-}40\mu$ de diámetro.

Los ensayos de proliferación/crecimiento celular son para medir el cambio en la proporción de células en división en una condición determinada; en este caso, la evaluación de 2 concentraciones celulares en placa de 24 pocillos; mientras que los ensayos de viabilidad celular, también considerados ensayos indirectos de proliferación celular; en donde el primero en ser desarrollado fué el ensayo colorimétrico MTT o de 3-(4,5-bromuro de dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; que cuantifica la proliferación celular, mediante la medición de la absorbancia producida luego de la ruptura de la sal de tetrazolio, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa y que da lugar a un producto coloreado (formazán); esta conversión sólo se realiza en células vivas y la cantidad de

formazán producido es proporcional al número de células vivas (Kumar, et al.; 2018; Sylvester, 2011).

Sin embargo, no se eligió en el presente trabajo como método para la evaluación de la viabilidad celular, debido a que requiere un paso adicional para disolver el precipitado de formazán insoluble en agua, antes de leer en espectrofotómetro, reportándose además, tóxico para las células y que interfiere con diferentes compuestos dando falsos aciertos (Beltran y González, 2016).

Entre los ensayos de exclusión de colorantes, que utilizan tintes no permeables de la membrana celular para teñir las células muertas, se encuentra el ensayo de azul de tripano. El cual es un tinte colorimétrico que tiñe las células muertas con un color azul, permitiendo su fácil observación y conteo, usando un hemocitómetro mediante microscopía óptica a baja resolución. Este ensayo fue elegido debido a que el procedimiento de tinción es rápido y las células se pueden analizar en minutos, si se dispone como en este caso, de equipos como el contador automático TC20 (BioRad®) empleado para determinar el número de células vivas (sin teñir) y muertas (azules). Considerándolo un ensayo conveniente para determinar rápidamente la viabilidad global de las células en un cultivo antes de comenzar la experimentación científica, o para cuantificar la muerte celular después del tratamiento con cualquier estímulo citotóxico (Crowley et al., 2018).

Por otro lado, debido a que la medición de la síntesis de ADN, es una de las principales formas de cuantificar la proliferación celular (Huh et al., 2017). Se realizó el análisis por duplicado mediante citometría de flujo, de la distribución de fases del ciclo celular de la línea BT-549, en cultivos con 2 y 5×10^5 células a las 48 h, a través del kit de ADN BD Cycletest™ Plus.

Este método consiste en disolver los lípidos de la membrana celular, con un detergente no iónico, eliminando de la célula el citoesqueleto y proteínas nucleares con tripsina, así como la digestión enzimática del ARN celular, y la estabilización de la cromatina nuclear con espermina. Lo que permite la

preparación de suspensiones uniformes de núcleos individuales, para su tinción con yoduro de propidio (PI) el cual se une estequiométricamente al ADN nuclear, a una concentración final de al menos 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, el PI es excitado a 488 nm a través de un láser de iones de argón emitiendo luz fluorescente, en donde el detector BD FACScan™, equipado con un filtro de paso de banda, analiza la luz emitida entre 580 y 650 nm; obteniéndose así los histogramas de fluorescencia resultantes (Figura 24). Su lectura requiere un número de al menos 20,000 eventos para garantizar la fiabilidad de nuestros resultados y ello depende de la concentración celular en las suspensiones de partida.

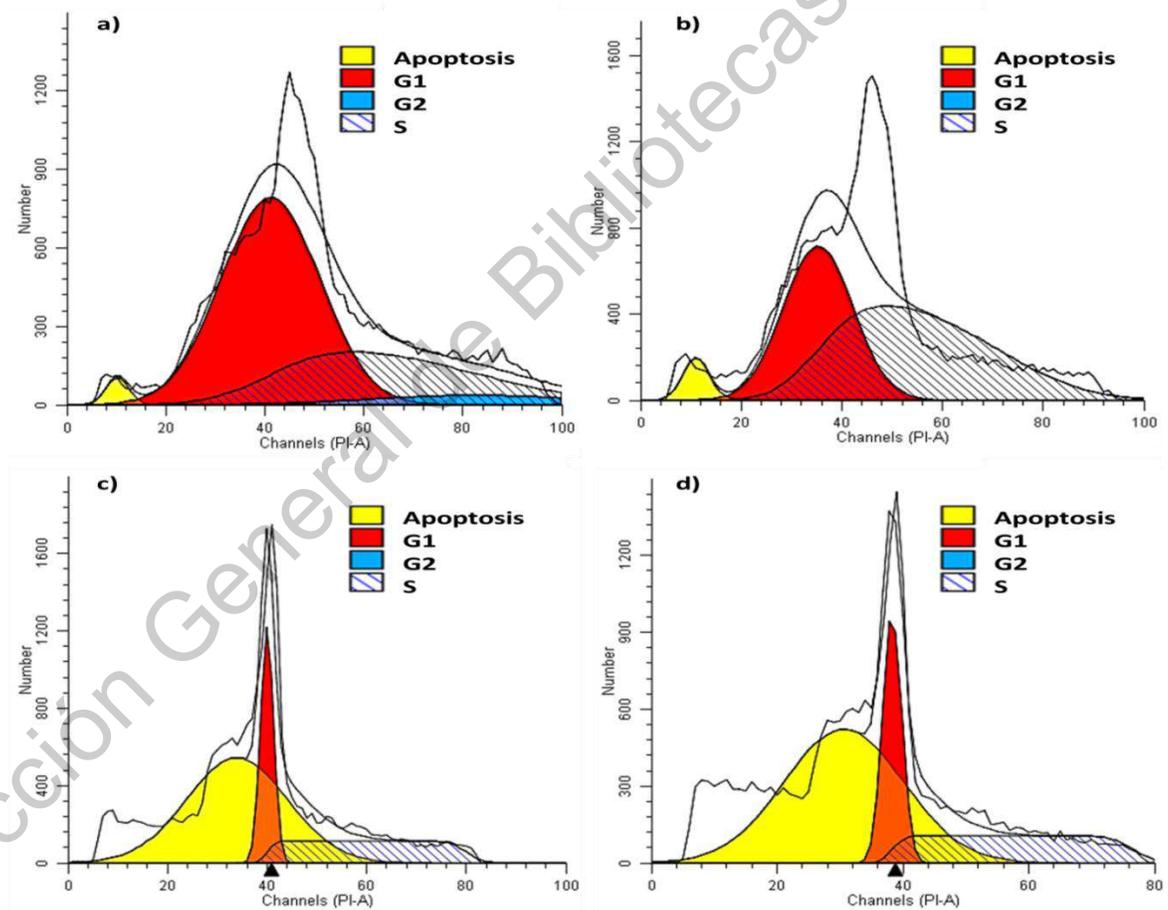


Figura 24. Histogramas de la distribución de fases del ciclo celular. De 2×10^5 células (a y b) y de 5×10^5 células (c y d), de la línea BT-549, cultivada en placas de 24 pozos de 2 cm^2 de diámetro.

En función de lo anterior, los resultados obtenidos de la evaluación por duplicado (Tabla 11), muestran que aunque ambas concentraciones celulares evaluadas, cumplen con el número de eventos requeridos para su análisis, se observan diferencias en las distribuciones de fase del ciclo celular de la línea BT-549 (Figura 24). Esto es concordante con los resultados de viabilidad mostrados anteriormente, ya que de los cultivos con 5×10^5 células, la población se redujo justificando la obtención de menor número de eventos y un alto porcentaje de células apoptóticas. No así para los cultivos con 2×10^5 células, en obteniéndose un número de 31,122 eventos, lo que respalda que el cultivo de la línea BT-549 en placa de 24 pozos, utilizando una concentración celular de partida de 2×10^5 células, es idónea para los ensayos posteriores.

Tabla 11. Distribución de fases del ciclo celular de la línea BT-549, a las 48 h de cultivo.

Cultivo celular inicial:	2×10^5 células	5×10^5 células
Fase G1	53.49%	47.56%
Fase G2	2.54%	0%
Fase S	43.98%	52.44%
Apoptosis	3.12%	61.72%
# Eventos	31,122	21,260

Dada la importancia de hacer pruebas y seleccionar el protocolo menos severo, con alta viabilidad y buena suspensión celular; es altamente recomendable familiarizarnos con el ciclo de crecimiento de la línea celular empleada en los protocolos de investigación, ya que éste controla la concentración de sembrado, la duración de crecimiento antes del subcultivo, la duración de los experimentos y los tiempos apropiados para el muestreo (Beltrán y González, 2016).

6. Conclusiones.

Cada vez son más los trabajos de investigación que demuestran la eficacia de los hongos como fuente de compuestos con actividad biológica utilizando modelos celulares. Debido a la importancia en la selección de métodos adecuados para su implementación que garanticen la calidad del mismo cuando se encamina a una aplicación que responda a hipótesis específicas, así como la interpretación biológica.

A través del presente trabajo, se logró la estandarización de las condiciones de cultivo *in vitro* de los hongos filamentosos *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., siendo idóneo un cultivo en medio sólido de agar PDA durante 14 días de incubación a 28 °C en condiciones ambientales de luz/obscuridad, para una extracción sucesiva por sonicación durante 30 minutos a 30°C, con los disolventes hexano y metanol en una relación 1:50 p/v.

Se logró además, generar las condiciones de cultivo de la línea celular BT-549 de CMTN subtipo M, para la eventual evaluación de la actividad biológica de los extractos hexánico y metanólico de las especies fúngicas estudiadas, siendo adecuado para este fin, a las 48 h de cultivo de 2×10^5 células de la línea BT-549 en placas de 24 pozos de 2 cm² de diámetro, determinando la viabilidad celular a través del ensayo azul de tripano al inicio y mediante citometría de flujo.

7. Bibliografía.

- Abramson, V. G., Lehmann, B. D., y Ballinger, T. J. (2015). Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*, 121(1), 8–16. <https://doi.org/10.1002/cncr.28914>.Subtyping.
- Afiyatullo, S.S., Leshchenko, E.V., Berdyshev, D.V., Sobolevskaya, M.P., Antonov, A.S., y Denisenko, V.A. (2017). Zosteropenillines: polyketides from the marine-derived fungus *Penicillium thomii*. *Marine Drugs*, 15(2), 46. <https://doi.org/10.3390/md15020046>.
- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R. A., Indriani, I. D., Wray, V., Müller, W. E. G., Totzke, F., y Ebel, R. (2008). Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 972–980. <https://doi.org/10.1021/np070447m>
- Anderson, S. R. (2014). Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: A review of the literature. *Breast Cancer Research*, 144(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2852-7>.
- Aronson, J. K., y Ferner, R. E. (2017). Biomarkers - A general review. *Current Protocols in Pharmacology*, 23(3), 1–17. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>.
- Ayers, S., Graf, T. N., Adcock, A. F., Kroll, D. J., Matthew, S., Blanco, E. J., y Oberlies, N. H. (2011). Resorcylic acid lactones with cytotoxic and NF- K B inhibitory activities and their structure a activity relationships. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1126–1131. <https://dx.doi.org/10.1021/np200062x>.

- Balko, J. M., Giltane, J. M., Wang, K., Schwarz, L. J., Christian, D., Cook, R. S., y Cronin, M. (2014). Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discovery*, 4(2), 232–245. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0286>.
- Barranco, C. R., Pérez, L. A., Alfaro, N. P., y Escorcía, J. Y. (2018). Evaluación de medios de cultivo naturales para el mantenimiento de *Colletotrichum* sp ., y *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientia et Technica Año XXIII*, 23(03), 397–404. <https://www.researchgate.net/publication/331635470>
- Beltrán, N. E. y González, C. H. (2016). Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. México. <http://www.cua.uam.mx>
- Bergin, A., y Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000 Faculty Reviews*, 8(1342), 1–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270831>.
- Borrego, S. (2012). *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. *Boletín Del Archivo Nacional*, 6(January), 104–118. <https://www.researchgate.net/publication/307577878>.
- Califf, R. M. (2018). Minireview Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243, 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>.
- Calvillo-Medina, R., Escudero, E., Barba, L., e Irma, E. (2020). Richness and metallo-tolerance of cultivable fungi recovered from three high altitude glaciers from Citlaltépetl and Iztaccíhuatl volcanoes (Mexico). *Extremophiles*, 24(4), 625–636. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01182-0>.

- Colonia, A., Rivera, J., Orozco, J., y Marín, D. (2015). HER-2: Un marcador molecular usado en el diagnóstico , pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. *Revista Médica Risaralda*, 21(1), 31–37. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v21n1/v21n1a07.pdf>.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Christensen, M. E., y Waterhouse, N. J. (2018). Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7, 643–647. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087155>.
- D´Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis , necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- De Villiers, A., Venter, P. y Pasch, H. (2016). Recent advances and trends in the liquid-chromatography – mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography*, 1430, 16–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.077>.
- Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, R. A., Wray, V., Müller, W. E. G., Totzke, F., y Ebel, R. (2009). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *Journal of Natural Products*, 72(4), 626–631. <https://doi.org/10.1021/np8004997>.
- Dewapriya, P., Li, Y., Himaya, S. W. A., y Kim, S. (2014). Isolation and characterization of marine-derived *Mucor* sp. for the fermentative production of tyrosol. *Process Biochemistry*, 49(9), 1402–1408. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.004>.
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B.M., Cech, N.B., Pearce, C.J., y Oberlies, N. (2013). A high-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of Natural Products*, 76(9), 1–16. <https://doi.org/10.1021/np4004307>.

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903.pdf/nihms33547.pdf>
- Fernández, K. S. (2012). Los sistemas de cultivo *in vitro* aplicados al estudio de los hongos micorrizicos arbusculares (HMA). *Cultivos Tropicales*, 33(2), 33–43.
- Foulkes, W. D., y Shuen, A. Y. (2013). In brief: BRCA1 and BRCA2. *The Journal of Pathology*, 230(4), 347–349. <https://doi.org/10.1002/path.4205>.
- Frisvad, J. C. (2014). Taxonomy, chemodiversity and chemoconsistency of *aspergillus*, *penicillium* and *talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00773>.
- Hautbergue, T., Jamin, E. L., Debrauwer, L., y Puel, O. (2018). From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. *Natural Product Reports*, 35, 147–173. <https://doi.org/10.1039/C7NP00032D>.
- Hernández-Dimas, E. (2016). Biología del cáncer de mama. *Revista Venezolana de Oncología*, 28(3), 1–21. <http://www.redalyc.org/jatsRepo/3756/375645930010/html/index.html>.
- Hernández, C., Romo, C. y Ortiz, C. (2017). Cáncer de mama triple negativo: frecuencia y características en el Hospital Ángeles Pedregal. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 15(4), 4–5. <https://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2017/am174e.pdf>.
- Hernández, A. L. (2016). Nuevos retos en el tratamiento y la investigación del cáncer de mama. *Medicina y Seguridad Del Trabajo*, 62, 113–115. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0465-546X2016000400012&lng=es&tlng=es.

- Herrera, I., y Laurentin, H. (2012). Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. sesami en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*). *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(3), 639–643. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4689960>.
- Huh, S. J., Oh, H., Peterson, M. A., Almendro, V., Bowden, M., y Lis, R. L. (2017). The proliferative activity of mammary epithelial cells in normal tissue predicts breast cancer risk in premenopausal women. *Cancer Research*, 76(7), 1926–1934. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
- Imigo G.F., Mansilla S.E., Delama G.I., y Poblete S.M. (2011). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuadernos de Cirugía (Valdivia)*, 25, 67–74. <http://mingaonline.uach.cl/pdf/cuadcir/v25n1/art10.pdf>.
- Jang, J.P., Jung, H.J., Han, J.M., Jung, N., Kim, Y., Kwon, H.J., y Ahn, J.S. (2017). Two cyclic hexapeptides from *Penicillium* sp. FN070315 with antiangiogenic activities. *PloS One*, 12(9), e0184339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184339>.
- Junco, D.R., y Rodríguez, P.C. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. *Microbiología y Parasitología Médica*, 1(January), 45–54. <https://www.researchgate.net/publication/288670374>.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y., Girard, L., Gandhi, J., y Pollack, J. R. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS One*, 4(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006146>.
- Kavanagh, K. (2017). Fungi biology and applications. *Wiley- Blackwell, Tercera Ed*(October), 1–263. <https://www.researchgate.net/publication/320491342>.

- Kim, H. Y., Park, H. M., y Lee, C. H. (2012). Mass spectrometry - based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum* , *P. expansum* , *P. solitum* , and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity. *Journal of Microbiological Methods*, 90(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.006>.
- Kladniew, R. B., Villegas, M. S., García, P. M., y Bravo, de M. (2016). Evaluación de la actividad antiproliferativa y citotóxica de monoterpenos en células tumorales y normales, 6(2), 1–2. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/55686.pdf>.
- Klitgaard, A., Iversen, A., Andersen, M. R., Larsen, T. O., y Frisvad, J. C. (2014). Aggressive dereplication using UHPLC - DAD - QTOF : screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7582-x>.
- Kumar, P., Nagarajan, A., y Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 469–472. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.
- Kusari, S., Hertweck, C., y Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*, 19(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>.
- Lehmann, B. D., Jovanovi, B., Chen, X., Estrada, M. V, Johnson, N., Shyr, Y., y Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes : Implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PloS One*, 11(6), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>.
- Liu, A., Chen, H., Wei, W., Ye, S., Liao, W., Gong, J., y Lin, S. (2011). Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic

- cancer. *Oncology Reports*, 26(1), 81–89. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1257>.
- Lucentini, C. et al. (2017). Pigmentos oscuros de *Cladosporium fulvum*, agente causal del moho de la hoja de tomate. *IX Congreso Latinoamericano de Micología*, 100. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66663>.
- Oropesa, A. M., y Alcázar, J. (2015). Vida tras la muerte celular. *Investigación y Ciencia*, 3(Marzo), 50–57. <https://www.researchgate.net/publication/271835858>
- Martín, M. T., y Civetta, J. D. (2011). Carcinogenesis. *Salud Pública de México*, 53(5), 405–414. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342011000500008>.
- Mendez, F. O. (2002). Inhibición de la apoptosis y acúmulo de alteraciones genéticas en la progresión metastática del cáncer de mama: variabilidad genética y selección poblacional. *Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona, España*. 3–32. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3738/omf1de1.pdf>.
- Moreira, M. P., Brayner, F. A., Alves, L. C., Cassali, G. D., Silva, L. M., y Silva, L. M. (2019). Phenotypic, structural, and ultrastructural analysis of triple negative breast cancer cell lines and breast cancer stem cell subpopulation. *European Biophysics Journal*, 48(7), 673–684. <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01393-0>.
- Muñoz, P. B., Fonseca, L. R., Robles, J., Fiorentino, S., Hernández, J., Orduz-Díaz, L. L., y Ospina, L. M. (2016). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de las especies *Conyza trihecatactis* y *Ageratina vacciniaefolia*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 212–227. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2029>
- Nielsen, K. F., Ma, M., Rank, C., Frisvad, J. C., y Larsen, T. O. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products*, 74, 2338–2348. <https://www.researchgate.net/>

publication/51744445.

- Nile, S. H., Nile, A. S., y Keum, Y. S. (2017). Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*, 7(1), 76. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0706-9>.
- O'Toole, S. A., Beith, J. M., Millar, E. K. A., West, R., Mclean, A., Cazet, A., y Oakes, S. R. (2013). Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 66(6), 1–13. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201361>
- Partida-Martinez, L. P., y Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 437(7060), 884–888. <https://doi.org/10.1038/nature03997>.
- Pinzón, C. E., Serrano, M. L., y Sanabria, M. C. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K / Akt) en humanos. *Revista Ciencias de La Salud Bogotá, Colombia.*, 7(2), 47–66. <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v7n2/v7n2a7.pdf>.
- Rabha, J., y Jha, D. K. (2018). Metabolic diversity of *Penicillium*. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00012-0>.
- Ramírez D., Ninfa; Serrano R., José Antonio; y Sandoval T., H. (2006). Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56–71.
- Rand, T.G., Giles, S., Flemming, J., Miller, J.D., y Puniani, E. (2005). Inflammatory and cytotoxic responses in mouse lungs exposed to purified toxins from building isolated *Penicillium brevicompactum* Dierckx and *P. chrysogenum* Thom. *Toxicological Sciences*, 87(1), 213–222.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi223>.

- Reilly, E. A. O., Gubbins, L., Sharma, S., Tully, R., Ho, M., Guang, Z., y Mccann, A. (2015). The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clinical*, 3, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbaci.2015.03.003>.
- Risinger, A. L., Dybdal-Hargreaves, N. F. y Mooberry, S. (2016). Breast cancer cell lines exhibit differential sensitivities to microtubule-targeting drugs independent of doubling time. *Anticancer Research*, 35(11), 5845–5850. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4812601>.
- Salazar, M. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XI(2), 152–166. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a16.pdf>.
- Sánchez, C. N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X).
- Sánchez-Pérez, C., Barranco-Florido, E. J., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, F. J., y Ramos-López, M. (2014). Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights solid state fermentation is a bioprocess that would produce at great scale enzymes and some other metabolites in grade of increasing the entomopathogenic fungi virulence, in the control of insects. *Advances in Enzyme Research*, 2(June), 65–76. <https://doi.org/10.4236/aer.2014.22007>.
- Sanchez, C. M. (2007). Aplicación de arrays de anticuerpos en el estudio del cáncer vesical. *Actas Urológicas Españolas*, 31(9), 1082–1088. <http://scielo.isciii.es/pdf/aue/v31n9/v31n9a14.pdf>.

- Santamarina, M., Barceló, S. y Marín, S. (2003). Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(January), 154–159. <https://www.researchgate.net/publication/237210722>.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K. y Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996–1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>.
- Sica, V. P., Raja, H. A., El-elimat, T., Kertesz, V., Berkel, G. J. Van, Pearce, C. J. y Oberlies, N. H. (2015). Dereplicating and spatial mapping of secondary metabolites from fungal cultures *in Situ*. *Journal of Natural Products*, 78, 1926–1936. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00268>.
- Sierra, M.; Barros, R.; Gómez, D.; Mejía, A. y Suarez, D. (2018). Productos naturales : Metabolitos secundarios y aceites esenciales. (Primera Edición). Bogotá, Colombia.: Fundación Universitaria Agraria de Colombia. <https://www.researchgate.net/publication/329197168>.
- Sohn, J., Do, K. A., Liu, S., Chen, H., Mills, G. B., y Hortobagyi, G. N. (2013). Functional proteomics characterization of residual triple-negative breast cancer after standard neoadjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology*, 24(10), 2522–2526. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt248>.
- Soto, M. y Rosales, M. (2016). Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxylla* bark. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>.
- Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Drug Design and Discovery*, 157–168.

<https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6>.

- Téllez-Jurado, A., Cruz Ramirez, M. G., Mercado Florez, Y., Asaff Torres, A. y Arana-Cuenca, A. (1985). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 73–80. <https://doi.org/10.1063/1.1405428>.
- Velázquez, F. A., y Vaca, F. P. (2010). Conceptos y definiciones de la vida y la muerte celular, 20(473), 9–15. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41618860001>.
- Villas, S. G., Smedsgaard, J., y Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(5), 613–646. <https://doi.org/10.1002/mas.20032>.
- Wang, M., Carver, JJ, Phelan, VV, Sánchez, LM, Garg, N., Peng, Y., Nguyen, DD, Watrous, J., Kapon, CA, Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, AV, Meehan, MJ, Liu, WT, Crüsemann, M., Boudreau, PD, Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Ker, N. (2017). Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS. *Natural Biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- Wang, J. M., Wang, J., Zhao, H. G., Liu, T. T., y Wang, F. Y. (2020). Clinical study reproductive risk factors associated with breast cancer molecular subtypes among young women in northern China. *BioMed Research International*, 2020(5931529), 1–9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166267>.
- Weaver, O., y Leung, J. W. T. (2018). Biomarkers and imaging of breast cancer. *American Journal of Roentgenology*, 210(2), 271–278. <https://doi.org/10.2214/AJR.17.18708>.
- Wijeratne, K., Paranagama, P., Marron, M., Gunatilaka, M., Arnold, E. y Gunatilaka, L. (2008). Sesquiterpene quinones and related metabolites from

Phyllosticta spinarum, a fungal strain endophytic in *Platycladus orientalis* of the Sonoran Desert. *Journal of Natural Products*, 1(71), 218–222. <https://doi.org/10.1021/np070600c>.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ