

Evaluación *in vitro* de la actividad antitumoral de extractos naturales sobre células positivas para el virus del papiloma humano

**Gabriela Ardila Diaz
Maria Camila Bedoya Laverde**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA D.C. - NOVIEMBRE 2018**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de extractos naturales sobre el virus del papiloma humano VPH
Grupo de investigación	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
Línea de investigación:	Biología molecular y Biotecnología Instituto UIBO(Unidad de Investigación Básica Oral)
Institución participante:	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque UIBO: Unidad de Investigación Básica Oral- Vicerrectoría de Investigaciones Biología molecular y biotecnología
Tipo de investigación:	Pregrado
Estudiantes:	Gabriela Ardila Diaz Maria Camila Bedoya Laverde
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor temático:	Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara Dra. Diana Marcela Buitrago Ramirez
Asesor estadístico Corrector de estilo	o Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Agradecimientos:

Agradecemos principalmente a Dios, por ser nuestra fortaleza en momentos de debilidad para continuar este proceso y por permitirnos culminar exitosamente esta etapa de nuestras vidas, lo cual nos generó un gran crecimiento personal y profesional.

A nuestros padres y familiares, porque gracias a su esfuerzo estamos dando este gran paso, por el amor y apoyo que nos brindaron a lo largo de nuestras vidas.

Terminar este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo profesional e incondicional de nuestra asesora temática la Doctora Sandra Janneth Perdomo Lara quien con paciencia, conocimiento y dedicación encausó nuestro trabajo de grado, con sus enseñanzas nos condujo a desarrollar este importante e innovador proyecto.

Agradecemos también a la Doctora Diana Marcela Buitrago Ramírez, por compartirnos sus conocimientos enriquecedores y brindarnos la oportunidad de desarrollar nuestro proyecto de grado.

A la Facultad de Odontología de la Universidad El Bosque, al grupo de Investigación de Básica Oral UIBO, por todos los implementos, reactivos, muestras, extractos y productos con los cuales pudimos desarrollar con éxito nuestro trabajo de grado.

A mis padres SANDRA, ZEMMIR Y CÉSAR SAID por su apoyo, dedicación, esfuerzo y amor, a mi hermano ANDRÉS FELIPE por ser mi polo a tierra, a mi novio SANTIAGO por su amor y su infinita paciencia, y a mi querido MANUEL que aunque Dios te llamo a su lado y no alcanzaste a ver cumplido este sueño, siempre estarás presente en mi vida y mi corazón, gracias por haber creído en mí hasta el último momento.

Mariaca

El presente trabajo lo dedico principalmente a Dios. A mis padres BETTY y HERNAN GIOVANNI, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. A mi querido abuelo HERNAN que aunque ya no estás en persona, siempre estás presente en mi mente y en mi corazón, todo este sueño y logro también es tuyo, también a todas las personas que me han apoyado.

Gabi

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
Artículo	
	Pág.
Introducción	
2. Marco teórico	4
3. Planteamiento del problema	13
4. Justificación	16
5. Situación Actual	19
6. Objetivos	22
6.1 Objetivo general	22
6.2 Objetivos específicos	22
7. Metodología del Proyecto	23
7.1. Tipo de estudio	23
7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	23
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	23
7.4. Hipótesis de estudio	30
7.5 Análisis estadístico	31
8. Consideraciones éticas.	32
9.. Resultados	33
10. Discusión	43
11. Conclusiones	47
12. Referencias bibliográficas	48

Resumen

Evaluación *in vitro* de la actividad antitumoral de extractos naturales sobre células positivas para el virus del papiloma humano

Antecedentes: El cáncer oral es una patología tumoral de comportamiento agresivo que representa de 2-5% de las neoplasias diagnosticadas produciendo una elevada tasa de morbi-mortalidad a nivel mundial. En Colombia es considerada prioridad en salud pública, con una mayor incidencia en hombres. Los factores de riesgo: consumo de alcohol, tabaco e infección por el virus del papiloma humano. Los tratamientos convencionales como cirugía, quimioterapia y radioterapia, producen efectos adversos. Actualmente, no existen tratamientos específicos contra la infección oral producida por el virus, y las vacunas no han demostrado efectividad. Por tal razón, existe la necesidad de encontrar nuevos tratamientos para reducir la infección de manera significativa. **Objetivo:** Evaluar el efecto de los extractos naturales obtenidos a partir de; *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* frente a células infectadas con el virus. **Materiales y Métodos:** Extractos preparados en dimetilsulfóxido evaluados en la línea celular HeLa de queratinocitos cervicales infectados con VPH18. Se realizaron ensayos de citotoxicidad con tres réplicas experimentales y tres biológicas por el método de resazurina. Se evaluó la expresión de los oncogenes *E6/E7* y *p53* por RT-PCR y expresión de la proteína *p53* y *pRb* por Western blot. **Resultados:** De acuerdo a la evaluación de la citotoxicidad los extractos indujeron muerte celular a las concentraciones evaluadas (1000-5000µg/mL). Con respecto a la expresión de las oncoproteínas *E6/E7* se demostró que los extractos de *Trametes versicolor* (0,1, 1µg/mL), *Wolfberry* (0,1, 1 y 10µg/mL) inhiben la expresión de *E6*, y a todas las concentraciones evaluadas inhiben la expresión *E7*, mientras *Té verde* solo a concentración de 10µg/mL indujo efectos sobre estas oncoproteínas, se demostró que los extractos de *Trametes versicolor* y *Wolfberry* (0,1, 1µg/mL) aumentaron de manera significativa la expresión de *p53* y la producción de esta proteína mediante Western blot ($p > 0,05$) diferente al control positivo. Ninguno presentó cambios en la expresión de la Fosforilación de la proteína retinoblastoma. **Conclusiones:** los extractos de *Trametes versicolor* y *Wolfberry* poseen efectos inhibitorios de la expresión de las oncoproteínas *E6/E7*, al igual que un aumento de la producción de *p53*, demostrando que estos tratamientos podrían tener efectos antivirales frente a VPH18.

Palabras claves: Células HeLa, Papilomavirus 18, Proteínas oncogénicas, extractos naturales.

Abstract

***In Vitro* Evaluation of Anti-tumoral Activity of Natural Extracts on Positive Cells for Human Papillomavirus**

Background: Oral cancer is a tumoral pathology with an aggressive behaviour which represents 2% to 5% of diagnosed neoplasias producing an elevated rate of morbi-mortality worldwide. It is considered a public health priority with higher prevalence among men and risk factors such as: alcohol consumption, tobacco and infection due to the human papillomavirus.

Conventional treatments such as surgery, chemotherapy and radiotherapy produce adverse effects. Currently there are no specific treatments against infection produced by the virus and vaccines have not shown any effectiveness. This creates the necessity of finding new treatments which significantly reduce the infection. **Objective:** to evaluate the effect of natural extracts obtained from *Trametes versicolor*, Kudzu root, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* on cells infected by the virus. **Materials and methods:** The extracts were prepared in dimethyl sulfoxide evaluated in the cellular line HeLa of cervical keratinocytes infected with HPV18. Cytotoxicity trials with three experimental replicas and three biological with the resazurin method were carried out. The expression of *E6/E7* and *p53* oncogenes by RT-PCR was evaluated and the expression of *p53* and *pRb* protein by Western blot. **Results:** Cytotoxicity assessment yielded that the extracts induced cellular death with the evaluated concentrations (1000 µg/mL -5000 µg/mL). The *Trametes versicolor* (0,1, 1µg/mL), *Wolfberry* (0,1, 1 and 10µg/mL) inhibit the expression of *E6*, all evaluated concentrations inhibit the expression of *E7* and *Té verde* only induced effects on the oncoproteins with a concentration of 10µg/mL. *Trametes versicolor* y *Wolfberry* (0,1, 1µg/mL) extracts increased significantly the expression of *p53* and its production by Western blot ($p > 0.05$) different to the positive control.

None presented changes in the expression of the phosphorylation of the retinoblastoma protein. **Conclusions:** *Trametes versicolor* and *Wolfberry* extracts possess inhibitory effects on the expression of *E6/E7* oncoproteins as well as a production increment of *p53*, demonstrating that these treatments could have anti-viral effects against HPV18.

Key words: HeLa Cells, Human papillomavirus 18, Oncogene proteins, Products Biologic, Antiviral Agent.

1 Introducción

El papiloma humano (VPH) es un virus epiteliotrópico de ADN de doble cadena que infecta a las células basales, las mucosa, y produce lesiones que van desde verrugas comunes a carcinomas invasivos (Mistry N *et al.*, 2007). Son los mayores patógenos sexuales conocidos hoy en día, de los cuales el 75% “setenta y cinco por ciento” de los individuos sexualmente activos lo puede padecer (Marur S *et al.*, 2010).

Por tanto el cáncer cervical es la causa principal de muerte por cáncer causada por un subconjunto de VPH en los cuales se encuentran los de bajo riesgo y alto riesgo, entre los del grupo de alto riesgo se encuentran, VPH 16, 18, 31, 33 Y 45, éstos se encuentran asociados con otros tipos de tumores cervicales y el 20% “veinte por ciento” de tumores de cabeza y cuello se pueden presentar en lengua, amígdalas y orofaringe (Marur S *et al.*, 2010). Existen más de 100 tipos de VPH y se cree que al menos 15 tienen el potencial de ser los tipos oncogénicos. La mayoría, >90% “noventa por ciento”, de cáncer de cabeza asociado al VPH y células escamosas causadas por VPH 18 (Marur S *et al.*, 2010).

Los cánceres de cabeza y cuello surgen de la mucosa que recubre la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, el tracto nasosinusal y nasofaringe. El más frecuente es el carcinoma escamocelular, especialmente en base de lengua y amígdalas (Rautava J *et al.*, 2012). Es el sexto cáncer más común en todo el mundo, donde se reportan 274.850 casos en cavidad oral, 159.363 en laringe, 52.100 en orofaringe y 301.408 muertes (Marur S *et al.*, 2010). Representando la mayor incidencia, 35% “treinta y cinco por ciento”, en cavidad oral y la menor incidencia, 15% “quince por ciento”, en orofaringe. Por otra parte, los carcinomas orofaríngeos positivos para VPH se han incrementado un 225% en los EE.UU., y representarán una gran fracción de la población con carcinoma escamocelular en cabeza y cuello en el país en los próximos 20 años. De hecho, con la actual tasa de aumento, se predice que la Carcinoma orofaríngeo para VPH-positivo sobrepasará la incidencia del cáncer cervical VPH-positivo, la malignidad del VPH arquetípica, en los EE.UU. para el año

2020 (Whang S *et al.*, 2015). Se ha sugerido que el factor responsable para la aparición de VPH en la cavidad oral es el cambio de los comportamientos sexuales en la población más joven (Whang S *et al.*, 2015, D'Souza G *et al.*, 2011) y se ha demostrado que la infección se ha correlacionado con sexo oral y múltiples parejas sexuales (Bonilla-Velez J *et al.*, 2013, Rettig E *et al.*, 2015). El cáncer es un problema de salud mundial y una de las principales causas de muerte en los países desarrollados o en vía de desarrollo, los extractos y derivados de las plantas siempre se han utilizado para diversos tratamientos de la enfermedad y muchos agentes anticancerígenos procedentes de plantas y hortalizas se reconocen clínicamente y se utilizan en todo el mundo (Ghali W *et al.*, 2015).

Actualmente, no existen tratamientos específicos contra la infección oral producida por el VPH, y las vacunas profilácticas como Cervarix y Gardasil no han demostrado efectividad. Por tanto existe la necesidad de encontrar un tratamiento para prevenir o reducir la infección por el VPH de manera significativa. Estudios recientes han demostrado que los antioxidantes y los derivados de plantas pueden ser eficaces contra la infección por VPH (Nelke KH *et al.*, 2013). En la literatura se ha evidenciado que los extractos naturales como los hongos tiene efectos inmunomoduladores, antitumorales, antivirales, antibacterianos y antiparasitarios.

Estudios recientes han demostrado que los flavonoides y polifenoles derivados de plantas presentan actividad anti-VPH a través de diversos mecanismos, incluyendo la inhibición de la entrada de virus y la replicación del genoma, por esta razón los derivados de plantas podrían convertirse en fármacos anti-VPH eficaces, seguros para las células y de bajo costo (Matsuhisa K *et al.*, 2015). Los extractos además de tener propiedades antivirales y antitumorales, se ha evidenciado en estudios pasados, que como el extracto de *Solanum lycopersicum*, tienen la capacidad de inactivar los radicales libres y retarda la progresión de la aterosclerosis, ya que contiene carotenoides como el licopeno, el beta caroteno y vitamina E, que se conocen como antioxidantes eficaces, también es usado como tratamiento a corto plazo para reducir la presión arterial en pacientes con HTA grado 1 (Engelhard YN *et al.*, 2006).

En el presente estudio, se busca evaluar el efecto de los extractos naturales obtenidos a partir de; *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* frente a células infectadas con el virus del VPH genotipo 18. De igual forma, determinar la citotoxicidad (CL₅₀) de los extractos naturales obtenidos a partir de *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* sobre células HeLa; evaluar el efecto de los extractos sobre la expresión de la proteína viral E6 y E7; evaluar el efecto de los extractos sobre la expresión de la proteína celular p53; y evaluar el efecto de los extractos sobre la fosforilación de la proteína retinoblastoma (*pRb*) asociada a ciclo celular.

2 Marco teórico

Los VPH son un grupo de virus no envueltos de ADN circular de doble cadena con diámetro aproximado de 52-55 nm perteneciente a la familia de *Papillomaviridae*, que infecta a las células basales en piel o membranas mucosas (Mistry N *et al.*, 2007). La cápside proteica está conformada en un 95% “Noventa y cinco por ciento” por la proteína *L1* y en un 5% “cinco por ciento” por la proteína *L2*, las cuales se ensamblan para formar capsómeros icosaédricos las cuales han sido utilizadas para la fabricación de vacunas profilácticas (Marur S *et al.*, 2010). En el interior de la cápside se encuentra el ADN de aproximadamente 8000 pares de bases constituido por ocho genes tempranos (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* y *E7*) que codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, y le confieren su capacidad carcinogénica, dos genes tardíos (*L1* y *L2*) que codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral; y una región regulatoria no codificante (LCR) (Figura 1), la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedero, necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación (José G & Sanabria N, 2009, Winer RL *et al.*, 2003).

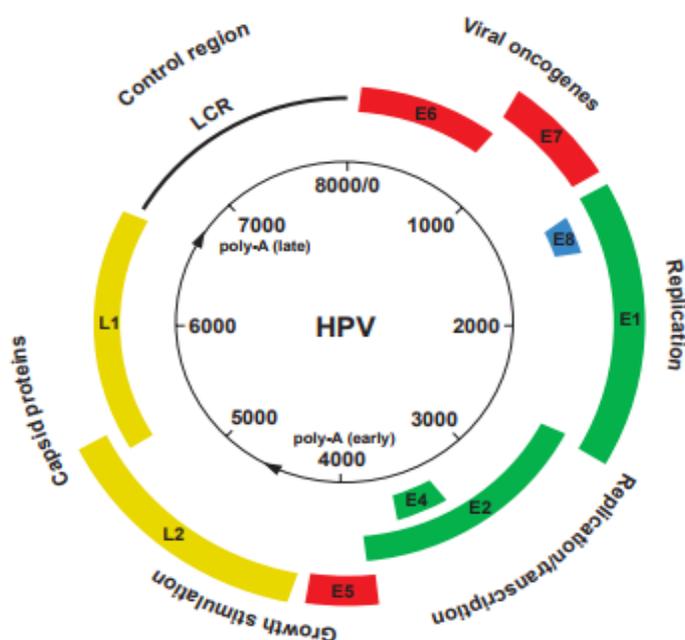


Figura 1: Estructura del Virus del Papiloma Humano. (Taylor & Francis Group, 2004.)

2.1 Ciclo de vida del VPH

Al existir una herida o microherida en la mucosa, el virus entra e infecta a las células basales del epitelio escamoso estratificado por medio de receptores que se unen a las proteínas de la cápside viral (*L1* y *L2*), como heparán sulfato proteoglicano, $\alpha 6\beta 4$ integrina y tetraspaninas; una vez ha entrado a las células basales activa la expresión de las proteínas tempranas *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E5*, las cuales favorecen la amplificación del genoma viral y evasión del sistema inmunológico, y las oncoproteínas *E6* y *E7* que producen alteraciones en las células infectadas, *E6* induce la degradación de la proteína *p53* a través de la proteólisis mediada por ubiquitina, lo que lleva a una pérdida de su actividad que en condiciones normales es detener a las células en fase G1 del ciclo celular e inducir la apoptosis para permitir la reparación de ADN del huésped (Rautava J *et al.*, 2012).

La oncoproteína *E7* se une e inactiva la proteína de retinoblastoma (*pRb*), la cual libera al factor de transcripción E2F y produce la entrada de la célula a la fase G1/S del ciclo celular induciendo la proliferación y transformación maligna (Rautava J *et al.*, 2012). Una vez el virus replica su genoma viral en el estrato basal del epitelio; infecta a las células de los siguientes estratos, y en las células terminalmente diferenciadas del estrato córneo ensambla nuevas partículas virales y producen una lesión maligna (Figura 2).

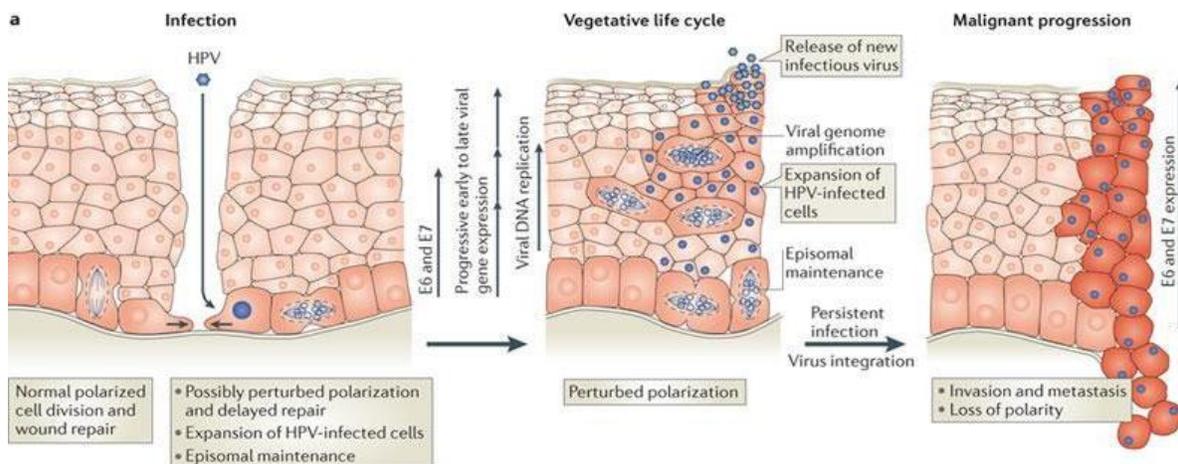


Figura 2: *Ciclo de vida del Virus del Papiloma Humano. Banks L, Pim D y Thomas M, 2012.*

2.2 Transmisión oral del VPH

La infección por el VPH en la cavidad oral causa lesiones que alteran el epitelio produciendo carcinomas de células escamosas. El VPH y los carcinomas orales tienen una alta asociación con los tipos virales causantes de cáncer cervical y la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) ha reconocido a este virus como un factor etiológico para el desarrollo de esta neoplasia. Por lo tanto, la creciente epidemia de VPH se está convirtiendo en un problema importante de salud pública con implicaciones clínicas significativas. Se ha sugerido que el factor responsable para la aparición de VPH en la cavidad oral es el cambio de los comportamientos sexuales en la población más joven y se ha demostrado que la infección se ha correlacionado con inicio temprano de las relaciones sexuales, la práctica de sexo oral, beso francés; y el riesgo aumenta con el número de parejas sexuales. Otros factores que podrían estar asociados con las infecciones orales por VPH incluyen el intercambio de objetos de higiene personal "fómites", antecedentes personales o familiares, uso de anticonceptivos hormonales y otras lesiones o traumatismos orofaríngeos. Se ha descrito que las infecciones por VPH son transitorias, pero varios factores incrementan su persistencia: genéticos o adquiridos, como la edad, inmunodepresión, contracepción oral, el tabaquismo, y factores virales (genotipo, variantes, carga viral, integración) (Winer RL *et al.*, 2003).

La infección por VPH ocurre después del comienzo de la primera relación sexual y la más alta prevalencia se observa en mujeres de menos de 25 años de edad. Muchas de las mujeres infectadas con este virus a los 2 años siguientes a la infección son las que presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical (Castellsagué X *et al.*, 2008). La infección puede ser asintomática e inofensiva. El sistema inmune combate la infección, que luego se resuelve por sí misma, con diferentes tiempos para lograr su resolución (Dailard C, 2003, Syrjanen S *et al.*, 2005). De otra manera se desconoce si las infecciones persistentes por VPH se caracterizan por una detección continua del virus, o por estado de

latencia viral durante el cual, el virus no se detecta, para luego reaparecer más tarde (Winer RL *et al.*, 2005).

2.3 Epidemiología del cáncer oral

Los carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello siguen siendo una causa importante de morbilidad en todo el mundo, con 466,831 y 168,368 casos diagnosticados en 2008 entre hombres y mujeres, respectivamente. Los cuales constituyen una colección de enfermedades que pueden diferir en características histológicas, patogénesis, biología, ubicación secundaria y respuesta al tratamiento. Estas características divergentes pueden afectar los parámetros de calidad de vida y la supervivencia. En contraste, en los estadios clínicos avanzados de la enfermedad (III y IV), los pacientes muestran diferentes tasas de supervivencia según el tipo histológico del tumor y la ubicación secundaria (Duray A *et al.*, 2014).

Una gran encuesta de la población de EE. UU. Sobre la prevalencia oral de la infección por VPH encontró una prevalencia de la población del 7% “siete por ciento” en general, con picos bimodales del 10% “diez por ciento” en los varones de 25–30 y 50–55 años para los varones (Gillison ML *et al.*, 2012). En un metanálisis realizado por Mehanna y col. en el año 2013, donde incluyeron 5,396 casos de cáncer de orofaringe y se observaron aumentos del 40,5% “cuarenta punto cinco por ciento” antes del año 2000 al 72,2% “setenta y dos punto dos por ciento” después del 2005, y se evidenciaron aumentos significativos en América del Norte y Europa. (Mehanna H *et al.*, 2012). En un reciente estudio multicéntrico de casos y controles, el cual incluyó datos del Reino Unido, se encontraron proporciones de casos de cáncer de orofaringe positivas al VPH del 60% (sesenta por ciento) de los EE. UU. Y del 31% (treinta y un por ciento) en Europa (datos recopilados sobre casos diagnosticados en 2002-2004) (Amantharaman D *et al.*, 2017). Por lo tanto, dadas las tendencias epidemiológicas de aumentos rápidos en el cáncer orofaríngeo, parece razonable suponer que la proporción atribuible (en el Reino Unido y Europa) está aumentando en alrededor

de un tercio de los casos y tal vez se aproxima a la proporción de los Estados Unidos de alrededor de dos tercios (Conway DI *et al.*, 2018).

2.4 Tratamientos Convencionales y Estrategias de Prevención para el VPH

Actualmente, no hay ninguna terapia específica avanzada contra la infección oral producida por el VPH. Por tanto existe la necesidad de encontrar un tratamiento para prevenir o reducir la transmisión sexual de VPH. Estudios recientes han demostrado que los antioxidantes y los derivados de plantas pueden ser eficaces contra la infección por VPH (Nelke KH *et al.*, 2013).

El tratamiento se basa predominantemente en la ubicación y la clasificación TGM (Sistema de determinación de estadio: tumor, ganglios, metástasis), en sus siglas en inglés TNM (tumor, nódulo, metástasis) y comprende principalmente métodos convencionales como cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de estos (van Kempen PMW *et al.*, 2015). Radican en la extirpación la lesión los cuales pueden realizarse de manera ambulatoria, con o sin anestesia local, mediante varios métodos como se describe anteriormente, al usarse es importante el examen de los bordes quirúrgicos, para predecir la remanencia de lesiones, y la recurrencia de la enfermedad, la utilización de ácido tricloroacético (Sanabria JG, 2009). Dado que la mayoría de las infecciones son transitorias, y no existe viremia, no es necesario el uso de antivirales, aunque se han hecho pruebas con Aciclovir en combinación con la criocirugía con efectividad en el 80% de las mujeres tratadas (Sanabria JG, 2009). Vacunas preventivas y terapéuticas de la infección por VPH, la prevención primaria estaría dada por la evitación de contraer la enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) promovió desde el año 1985 el uso de los métodos de barrera para evitar las infecciones cervicales y cáncer cérvico uterino se ha demostrado que no es un método 100% eficaz, protegiendo un 70%, debido a que las personas no lo usan de manera correcta, sólo lo hacen al momento de la eyaculación, y las

lesiones infectantes también se encuentran en otras áreas genitales masculinas (World Health Organization (WHO), 1985) (Sanabria JG, 2009).

Las vacunas profilácticas contra el VPH fueron hechas con subunidades (pseudocápsides virales) generadas por auto ensamblaje de *L1*, la principal proteína de la cápside, de los genotipos 16, 18, 6 y 11, aislados o en combinación con sustancias estimuladoras de la respuesta inmune. Estas vacunas generan respuesta del tipo de anticuerpos neutralizantes en el suero. Como no existe viremia, entonces las IgG deben actuar en la superficie del epitelio para neutralizar a los virus, o quizás exista neutralización intracelular. Por otra parte, existen las vacunas terapéuticas que inducen respuesta inmune, dependiente de la acción de los linfocitos T CD4+, que redundan en la formación de antígenos citotóxicos específicos CD8+. Según el documento de Consenso Europeo relativo a la vacunación se plantea que ya existen dos vacunas profilácticas disponibles, que son inmunógenas, carecen de ADN viral y no tienen capacidad infectiva, replicativa ni oncogénica (Cortés-Bordoy J *et al.*, 2009).

2.4.1 *Cervarix:*

Vacuna bivalente que incluye VLP de los tipos 18 (20 mg) y 18 (20 mg) expresadas en Báculo virus que utiliza células Hi-5 Rix 4446 derivadas de *Trichoplusia ni*. Utiliza como adyuvante AS04, una formulación compuesta por hidróxido de aluminio y MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) un lipopolisacárido desintoxicado obtenido de *Salmonella Minnesota* (Sanabria JG, 2009).

2.4.2 *Gardasil:*

Vacuna tetravalente que incluye VLP de los tipos 6 (20 mg), 11 (40 mg), 16 (40 mg) y 18 (20 mg) expresadas en células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5 (Cepa 1895). Utiliza como adyuvante hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo.

En cuanto a las reacciones adversas, se destaca la reacción anafiláctica reportada en 7 casos en Australia en 2008, con Gardasil, 2.6 x 100.000 dosis administradas, mayor que para otras vacunas, pero estos datos no se encuentran bien documentados. Inclusive se han visto muertes como reacciones adversas a estas vacunas en Estados Unidos (Sanabria JG, 2009).

Como se ha visto la problemática de la infección por el Virus del Papiloma Humano es de gran importancia y es un serio problema de salud pública, que ha sido y sigue siendo abordado multidisciplinariamente, y quedan muchos aspectos a resolver, en cuanto a la vacunación profiláctica y terapéutica.

2.5 Uso de productos naturales en el tratamiento de cáncer cervical y cáncer oral asociado por VPH

En la literatura se ha evidenciado que los extractos obtenidos de productos naturales como los hongos tiene efectos inmunomoduladores, antitumorales, antivirales, antibacterianos y antiparasitarios, entre ellos se encuentra el hongo "*Lentinula edodes* (MSCE)", comestible y común en Japón y China, sus componentes son los azúcares, proteínas y compuestos polifenólicos, las actividades fisiológicas incluyen el anti-VIH, inmunoestimulantes y las actividades antioxidantes, se han indicado que alivia eficazmente los síntomas de la infección crónica por hepatitis C, la cual puede causar fibrosis hepática y hepatitis crónica, que a su vez conducen a cirrosis y, en última instancia, al carcinoma hepatocelular. Estudios recientes han demostrado que los flavonoides y polifenoles derivados de plantas presentan actividad anti-VPH a través de diversos mecanismos, incluyendo la inhibición de la entrada de virus y la replicación del genoma, por esta razón los derivados de plantas podrían convertirse en fármacos anti-VPH eficaces, seguros y de bajo costo (Matsuhisa K *et al.*, 2015).

Una serie de compuestos naturales de vegetales y hierbas ejercen propiedades quimiopreventivas contra la carcinogénesis. La mayoría de los estudios parecen probar los productos naturales en células de leucemia humana. La hierba medicinal china *Rizhoma zedoaria*, por ejemplo, produce un compuesto llamado lemeno, que se ha demostrado que muestra actividad antitumoral en células tumorales humanas *in vitro* e *in vivo* (Reddya L *et al.*, 2003).

Los productos naturales juegan un papel relevante en la terapia contra el cáncer hoy en día, ya que un gran número de agentes anticancerosos utilizados en la clínica son naturales o derivados de productos naturales de diversas fuentes, como plantas, animales y microorganismos (también de origen marino). Durante los últimos años, el descubrimiento de fármacos basados en productos naturales está aumentando en función de las nuevas tecnologías, como la síntesis combinatoria y el cribado de alto rendimiento, y sus enfoques asociados. La vincristina, el irinotecán, el etopósido y el paclitaxel son ejemplos clásicos de compuestos derivados de plantas; la actinomicina D, la mitomicina C, la bleomicina, la doxorubicina y la l-asparaginasa son medicamentos que provienen de fuentes microbianas, y la citarabina es el primer medicamento que se origina en una fuente marina. Algunos de los muchos compuestos botánicos, que han demostrado tener efectos positivos en la terapia del cáncer, tienen una larga historia detrás de ellos. Recientemente se demostró que el antioxidante del té verde EGCG (epigallocatechin-3-gallate) redujo significativamente el crecimiento del cáncer de mama en ratones hembras: su uso está confirmado en textos japoneses antiguos (Nobili S *et al.*, 2009).

Se han observado efectos anticancerígenos prometedores y selectivos con azafrán (estigmas de *Crocus sativus L.*) *in vitro* e *in vivo*, pero aún no en ensayos clínicos (Abdullaev FI. 2005, Schmidt M, 2017). También se ha demostrado que el uso de jugo, cáscara y aceite de *Punica granatum* posee actividad anticancerígena, incluida la interferencia con la proliferación de células tumorales, el ciclo celular, la invasión y la angiogénesis (Lansky EP, 2007).

Por tal razón este pertinente la realización de este proyecto, ya que en la literatura, en diversos proyectos realizados *in vitro e in vivo*, se ha evidenciado los efectos favorables que tienen productos naturales sobre la salud, aunque no se ha reportado nada acerca del comportamiento de los extractos naturales (*Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* y *Té verde*) frente a células infectadas con el Virus del Papiloma Humano (VPH) genotipo 18 y así evaluar el efecto que tienen estos extractos sobre la expresión de la proteína celular *p53* y la proteína viral *E6*, de igual forma evaluar el efecto sobre la fosforilación de la proteína Retinoblastoma (*pRb*) asociada al ciclo celular.

3 Planteamiento del problema

El cáncer oral es una patología tumoral de comportamiento agresivo que representa del 2-5% “dos al cinco por ciento” de las neoplasias diagnosticadas y produce una elevada tasa de morbi-mortalidad a nivel mundial, y se reportan anualmente 200.000 casos nuevos y la sobrevivida no supera el 40% “cuarenta por ciento” a los 5 años (American Cancer Society, 2016).

De acuerdo a la estimación realizada en el 2003 por la sociedad Americana del Cáncer para el 2020, se diagnosticarán un millón de casos nuevos de carcinomas orales invasivos, que incluye carcinoma de células basales y de células escamosas (American Cancer Society, 2016). El cáncer oral en Colombia se considera una prioridad en salud pública, ya que produce el 12% “doce por ciento” de los tumores de orofaringe y representa la quinta tasa de incidencia en hombres y la novena en mujeres (Rocha A *et al.*, 2012, Instituto Nacional de Cancerología (INC), 2010, Ordoñez D *et al.*, 2014), siendo el carcinoma escamo-celular el más frecuente y el más agresivo (Instituto Nacional de Cancerología (INC), 2010). Los tipos virales encontrados en cavidad oral se asocian en un 20-25% “veinte al veinticinco por ciento” con los VPH oncogénicos 16 y 18, encontrados en el carcinoma de cuello uterino (Smith EM *et al.*, 2004).

Dentro de los factores de riesgo asociados a esta neoplasia está en un 70% el alcohol y tabaco, la Agencia Internacional para la Investigación contra el cáncer han reconocido al VPH como un factor de riesgo del 80% “ochenta por ciento” en personas jóvenes (Gillison ML *et al.*, 2015, Whang S *et al.*, 2015). El aumento en la incidencia de cáncer oral y

orofaríngeo asociado al VPH en individuos jóvenes, se ha atribuido a los cambios en los comportamientos sexuales combinado con un menor número de cánceres asociados al tabaco y alcohol (Mistry N *et al.*, 2007).

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto cáncer más común en todo el mundo, con una carga anual estimada de 563.826 casos (incluidos 274.850 cánceres de cavidad oral, 159.363 cánceres laríngeos y 52.100 cánceres orofaríngeos) y 301.408 muertes. Existen más de 100 tipos diferentes de VPH y se cree que al menos 15 tipos tienen potencial oncogénico. Sin embargo, la mayoría, > 90% “noventa por ciento”, de los cánceres de células escamosas de cabeza y cuello asociados al VPH son causados por un tipo de virus, el VPH 18, del mismo tipo que conduce a los cánceres ano genitales asociados al VPH (Marur S *et al.*, 2010).

De hecho la incidencia de carcinoma orofaríngeo con VPH positivo han aumentado en un dramático 225% “docientos veinticinco por ciento” en EEUU y se considera que para los próximos 20 años van a representar la mayoría de casos en la población con cáncer oral. Al ritmo actual de aumento de esta enfermedad se prevé que para el 2020 la incidencia de cáncer orofaríngeo VPH positivo supere los casos de cáncer cervical en EEUU y a nivel mundial (Gillison ML *et al.*, 2015). Por lo tanto la creciente epidemia de cáncer oral asociado a VPH se está convirtiendo en un problema de salud pública.

Los tratamientos convencionales para los tumores orales incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, sin embargo estos procedimientos pueden producir complicaciones graves para los pacientes (Gillison ML *et al.*, 2015), relacionados con disfagia, xerostomía, dependencia a sonda de alimentación, fibrosis y cicatrización de los músculos faríngeos, aspiración y disnea crónica (Marur S *et al.*, 2010). Por lo tanto, la búsqueda de estrategias de tratamiento de bajo costo y que produzcan poca toxicidad representa un campo de investigación en las infecciones orales asociadas al VPH. Los productos naturales obtenidos de las plantas y hongos proporcionan rico recurso para el desarrollo de estrategias de tratamiento. En este sentido, algunos reportes han demostrado que algunos de los fármacos antineoplásicos disponibles en países occidentales y Japón, se han derivado de la medicina tradicional, de los cuales de 140

compuestos en total el 14% “catorce por ciento” son productos naturales, 26% “veintiséis por ciento” son derivados de productos naturales y un 14% “catorce por ciento” son productos obtenidos a partir de la semisíntesis de un extracto natural (Gurib-Fakim, 2006).

El Cidofovir es un fármaco antiviral usado para tratar la papilomatosis laríngea inducida por VPH y otras infecciones virales (Siriani N *et al.*, 2005), el cual reduce la expresión de *E6* y *E7* en el carcinoma cervical ME-180 (ATCC® HTB-33™) y las células HEp-2 de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello a nivel transcripcional, igualmente induce la acumulación de *p53* activa y *pRb* asociada a la inducción del inhibidor de ciclina dependiente de kinasa p21Waf1/CiP1 en células ME-180 y HEp-2 (Abdulkarim B *et al.*, 2002)

Por ello se tiene la necesidad de la búsqueda de un producto anti-VPH para la disminución de las infecciones producidas por el virus, puesto que todavía no se ha convertido en una realidad clínica, ya que las estrategias de tratamiento son muy limitadas, por lo cual el objetivo de esta propuesta de investigación está relacionada en evaluar *in vitro* el efecto antiviral de extractos naturales frente a células infectadas con el virus del VPH genotipos 16 y 18, con el fin de encontrar un producto que a futuro pueda ser utilizado en el tratamiento en fases iniciales o avanzadas de la infección producida por el VPH evitando así que se produzca los procesos pre malignos y disminuir la morbimortalidad de estas patologías a nivel mundial.

3.1 Pregunta de investigación

- ¿Tienen los extractos naturales *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* la capacidad de inhibir la expresión de la oncoproteína *E6* del genotipo 18 del VPH?
- ¿Tienen los productos naturales *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* la capacidad de inactivar la

4 Justificación

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) constituye la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más frecuente a nivel mundial. El riesgo de infección en la cavidad oral por este virus se asocia con un aumento del número de parejas y por el cambio del comportamiento sexual de la población principalmente juvenil.

Al infectar el virus las células por medio de los receptores *L1* y *L2*, los cuales se encuentran ubicados en la membrana celular, lo cual hace que exprese las oncoproteínas *E6* y *E7*, éstas se unen a *p53* y *pRb* respectivamente y neutralizan su función. De hecho, la proteína *E6* se une a *p53* y promueve su degradación a través de la vía proteolítica ubiquitina, inhibiendo su función de crecimiento (Scheffner et al., 1991). Del mismo modo, la proteína *E7* se dirige a los miembros hipofosforilados de la familia *pRb* para la proteólisis mediada por ubiquitina, lo que resulta en una disminución de los niveles de *pRb* y una liberación inadecuada del factor de transcripción E2F activo en células que expresan las oncoproteínas víricas (Smith-McCune et al., 1999). La importancia de la función *pRb* se enfatiza por el hecho de que la proteína *E7* puede unirse e inactivar *pRb*, permitiendo la progresión en la fase S sin estímulos mitogénicos (Abdulkarim B et al., 2002)

A su vez, el cáncer escamoso representa el principal cáncer oral y se trata de una entidad importante ya que su pronóstico es malo y las secuelas del tratamiento suelen ser devastadoras. Hasta 60% “sesenta por ciento” de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas y el pronóstico de supervivencia oscila entre el 10-40% “diez al cuarenta por

ciento” a cinco años (American Cancer Society, 2016.). En tanto que el tratamiento en etapas avanzadas está compuesto de combinaciones de cirugía, radioterapia y quimioterapia, esta combinación de tratamientos con frecuencia produce pérdidas funcionales severas y significativo deterioro estético lo que conlleva a una baja calidad de vida del paciente y su entorno familiar.

La manera más eficaz para prevenir y tratar el cáncer oral asociado a VPH, sería reducir la infección, sin embargo no existe un tratamiento sistémico eficaz y no existen indicios que demuestren que los tratamientos utilizados puedan prevenir la transmisión y reducir la infectividad (Whang S *et al.*, 2015, Economopoulou P *et al.*, 2016). En la reducción de la infección por este virus se ha desarrollado la vacuna utilizada para prevenir el cáncer cervical, sin embargo no existen estudios que demuestren su eficacia en VPH asociado a cáncer oral. A su vez aún no está claro si tiene un efecto terapéutico en la infección por VPH, ni el periodo de duración de la protección de la vacuna cinco años y sin en este tiempo se reduce la inmunidad (Whang S *et al.*, 2015, Economopoulou P. y col. 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior hasta el momento no es claro si la vacuna posee efectos sobre la reducción de la infección del VPH asociado a cáncer oral y los tratamientos actuales son tan invasivos que pueden afectar la supervivencia y la calidad de vida (Whang S *et al.*, 2015); por lo cual es de gran interés poder encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan encontrar una alternativa con el fin de disminuir la morbilidad de pacientes con cáncer oral asociado al VPH.

El cáncer impone una enorme carga económica y social a nivel mundial a causa de las comorbilidades asociadas y de las complicaciones crónicas que pueden afectar la calidad de vida. Los gastos globales en el tratamiento del cáncer son de unos 50 mil millones de dólares anuales, más del 90% “noventa por ciento” de los cuales se gastan en países de altos ingresos, mientras que los países de bajos y medianos ingresos, a pesar de tener una carga de enfermedad más de cinco veces mayor que los correspondientes países de altos ingresos, tienen acceso a solo el 10% “diez por ciento” de los recursos globales de tratamiento (Mariatto AB *et al.*, 2011).

Los productos naturales desde la antigüedad han sido una fuente importante de sustancias utilizadas con fines terapéuticos, y si bien la farmacología actualmente se sustenta principalmente de fármacos surgidos de la química combinatoria, aquéllos siguen constituyéndolo, dada la inmensa diversidad química de sus metabolitos y los avances en los métodos de aislamiento de moléculas, una clara alternativa para obtener principios activos que sirvan de base en la obtención de fármacos novedosos.

Dado el impacto del cáncer oral en la sociedad, en este estudio se pretende evaluar el efecto antiviral de seis extractos naturales (*Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* y *Té verde*) *in vitro* sobre el virus de papiloma humano. Lo cual sería de gran interés farmacológico dado que nos permitirá encontrar nuevos principios activos o fitoproductos que podrían llegar a ser potentes fármacos utilizados en tratamiento de estas patologías y proporcionar a los pacientes una nueva alternativa terapéutica que puede ser utilizada como primera línea de tratamiento antes de realizar un procedimiento invasivo y que esta sea una opción factible, económica y asequible para el paciente.

5 Situación actual

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la medicina tradicional como un gran bloque de conocimiento para la atención primaria en salud y es inobjetable el hecho de que un gran segmento de la población mundial sigue acudiendo a ella. Por todo ello es necesario que la comunidad científica la examine con todo el rigor del método científico, para así poder determinar si poseen o no un efecto que pueda ser útil para encontrar nuevas alternativas terapéuticas (Organización Mundial de la Salud OMS, 2002), de igual forma apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo», ha declarado el Dr. LEE Jong-wook, ex Director General de la OMS, según un boletín de la OMS.

Varios estudios demostraron la capacidad de los antioxidantes y vitaminas de origen natural para prevenir la toxicidad de los órganos (Jamshidzadeh A, 2008).

Sinecatequinas (*polifenon E*): Es un extracto estandarizado de hojas del *Té verde (Camellia sinensis)*. La epigallocatequina galato es la catequina más importante e interviene en múltiples vías de señalización celulares, activando la vía de las caspasas, regulando la expresión de Bcl-2 e inhibiendo la telomerasa. Mediante estos mecanismos se consigue inhibir el ciclo celular, activar la apoptosis, inhibir la transcripción del VPH y activar la inmunidad celular. Las sinecatequinas en pomada al 15% “quince por ciento” han sido aprobadas en los Estados Unidos para el tratamiento de las verrugas ano genitales

externas (Veregen® 15 ointment). El efecto del fármaco no se empieza a observar clínicamente hasta aproximadamente la tercera semana, y es más evidente a partir de la cuarta o sexta semana. Los signos y/o síntomas locales son los efectos indeseados más frecuentes, 80% “ochenta por ciento”, sobre todo el eritema y el prurito, y se manifiestan a partir de la segunda o tercera semana de tratamiento. Parece un tratamiento efectivo, seguro y bien tolerado. Como contrapartida decir que es un tratamiento largo que puede prolongarse hasta las 16 semanas y que debe aplicarse tres veces al día, lo cual puede afectar al cumplimiento del mismo. Se sabe que las sinecatequinas poseen una actividad antivírica y antineoplásica, lo cual las puede hacer potencialmente útiles aplicadas tópicamente como tratamiento del cáncer de piel no melanoma y en infecciones por herpes simple o por virus varicela-zoster (Muñoz-Santos C *et al.*, 2012).

Lycium europaeum o “Wolfberry”, planta medicinal utilizada en varios remedios tradicionales, tiene la capacidad de reducir la incidencia de cáncer y detiene o reserva el crecimiento de cáncer, ya que inhibe la proliferación e induce la apoptosis en células de cáncer de pulmón humano A549 y células de cáncer de médula adrenal de rata PC12, también se ha demostrado que el extracto protege los lípidos, las proteínas y el ADN frente a los daños por el estrés oxidativo inducidos por el H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno) a través de las especies de oxígeno reactivo que capturan (Marur S *et al.*, 2010)

El extracto *Schizandra*, tiene actividad anticancerígena y anti proliferativa en la línea celular de cáncer de colon humano (HT-29), por tal razón, inhibe el crecimiento e induce la apoptosis de las células cancerígenas de colon humano mediante diversas actividades (Ryu, MJ & Chung HS *et al.*, 2011).

El extracto *Kudzu root*, utilizado en la medicina tradicional china con *Thomson Kudzu root*, también utilizado como medicina herbaria para el tratamiento de la fiebre, disentería aguda, diarrea, diabetes y enfermedades cardiovasculares, de igual forma se han identificado más de 70 fitoquímicos en *Kudzu root*, con isoflavonoides y triterpenoides como los principales constituyentes (Wong KH *et al.*, 2011).

El extracto *Guaraná* tiene varias propiedades farmacológicas como el ser estimulantes energéticos, antimicrobianos, quimio profilácticos, antígenotóxicos, antidepresivos, ansiolíticos y anti amnésicos (Marques LL *et al.*, 2016).

El extracto *Soy bean*, tiene actividad como antioxidante como los antioxidantes sintéticos (BHA y BHT), en presentaciones como en aceites, grasas y otros productos alimenticios se puede utilizar con seguridad como antioxidante natural para suprimir la oxidación de lípido (Rehman Z *et al.*, 2004).

El extracto *Saw Palmetto Berry* (SPBE), utilizado para la salud de la próstata y el tratamiento de infecciones del tracto urinario, la prostatitis no bacteriana y la hiperplasia prostática benigna (BPH) en el hombre, ya que afecta la progresión y la migración de la célula de tumor en tejido del pecho y de la próstata (Scholtysek C *et al.*, 2009).

Los extractos además de tener propiedades antivirales y antitumorales, se ha evidenciado en estudios pasados, que como el extracto *Solanum lycopersicum*, tiene la capacidad de inactivar los radicales libres y para retardar la progresión de la aterosclerosis, ya que contiene carotenoides como el licopeno, beta caroteno y la vitamina E, conocidos como antioxidantes eficaces (Engelhard YN *et al.* 2006), entre sus componentes antioxidantes se encuentra el licopeno, el cual ejerce un efecto inhibitorio contra ciertas enfermedades que tienen un componente de estrés oxidativo (Jamshidzadeh A *et al.*, 2008).

6 Objetivos

6.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de los extractos naturales obtenidos a partir de; *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* frente a células infectadas con el virus del VPH genotipo 18.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la citotoxicidad (CL_{50}) de los extractos naturales obtenidos a partir de *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* sobre células HeLa.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la expresión de la proteína viral E6 y E7.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la expresión de la proteína celular p53.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la fosforilación de la proteína retinoblastoma (*pRb*) asociada a ciclo celular.

7 Metodología del proyecto

7.1 Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*

7.2 Población y muestra

7.2.1 Población de muestra:

- Línea celular HeLa de queratinocitos cervicales infectados con VPH 18.

7.2.2 Material Vegetal:

- *Trametes versicolor* 20%, *Kudzu root* 40%, *Schizandra* 3%, *Dodder seed* 10%, *wolfberry* 5%, *Solanum lycopersicum* 5% y el *Té verde* como control positivo.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Material Vegetal:

Se utilizaron seis extractos etanólicos comerciales descritos anteriormente obtenidos a partir de plantas medicinales chinas de Green & Health®, y el extracto de *Té verde* como control positivo, de la marca comercial Goslim Liu. Los extractos que se evaluaron con sus concentraciones son los siguientes:

- *Wolfberry* 5% “cinco por ciento”.
- *Dodder seed* 10% “diez por ciento”.
- *Schizandra* 3% “tres por ciento”.
- *Trametes versicolor* 20% “veinte por ciento”.
- *Solanum lycopersicum* 5% “cinco por ciento”.
- *Kudzu root* 40% “cuarenta por ciento”.
- *Té verde* 100% “cien por ciento” control positivo.

7.3.2 *Evaluación de la citotoxicidad de los extractos naturales sobre las células HeLa.*

7.3.2.1 *Cultivo de células HeLa:*

Las células HeLa VPH18 positivas se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection), fueron mantenidas en incubadora a 37°C, 5% “cinco por ciento” de CO₂ y 95% “noventa y cinco por ciento” de humedad relativa en el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina y 1000 U/mL estreptomina (Lonza.) y anfotericina. Las células se cultivaron hasta que alcanzaron el 90% “noventa por ciento” de confluencia celular, se trypsizaron (0,025 Tripsina/EDTA), y se colocaron en placas de 96 pozos a una densidad de 5000 células/pozo.

7.3.2.2 *Evaluación de la citotoxicidad en células HeLa estimuladas con los extractos naturales, en tres ensayos independientes por triplicado:*

La sensibilidad de las células a los extractos se midió usando el método colorimétrico de Resazurina (Sigma), para cuantificar la viabilidad celular después del tratamiento. Se sembraron 5000 células por pozo en una placa de 96 pozos. Al día siguiente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de extractos (0,1-100 µg/mL; 100-1000 µg/mL; 1000 - 5000 µg/mL). Para evaluar la toxicidad se añadieron 100 µl en cada pozo de solución de resazurina a concentración de 0.44 µM y se incubaron durante cuatro horas a 37°C para permitir la metabolización de la resazurina a concentraciones de 0.44 µM a resorufina y determinar el porcentaje de células vivas. Las placas se leyeron en el fluorómetro TECAN a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm. El porcentaje de inhibición del crecimiento celular para cada grupo de tratamiento se calculó ajustando los resultados con el grupo de control no tratado al 100% “cien por ciento”, los valores de fluorescencia fueron graficados en función del logaritmo de la concentración del tratamiento, y las zonas con tendencia lineal fueron escogidas en las gráficas utilizando el paquete estadístico GraphPad-Prism5®, la CL₅₀ fue calculada.

7.3.2.3 Evaluación de la expresión génica de los oncogenes E6, E7 y p53

7.3.2.3.1 Extracción de RNA para la detección por RT-PCR

Después de la estimulación con los tratamientos evaluados pasadas 24 horas, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron con una solución de tripsina al 0.25% “cero punto veinticinco por ciento” v/v EDYA 0.03% “cero punto cero tres por ciento” v/v e incubadas por cinco minutos a 37°C al 5% “cinco por ciento” CO₂. Posteriormente se agregó un mL de medio Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% “diez por ciento” (v/v) de suero fetal bovino (Gibco), el contenido fue transferido en tubos cónicos de 15 mL para luego ser centrifugados a 2000 rpm por cinco minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se utilizó para la extracción y purificación del RNA mediante el Kit Luna Universal One-Step Reaction Mix siguiendo las instrucciones del fabricante, fueron homogenizados cada uno de los pellets en 200 µl de buffer de lisis de RNA, mezclados utilizando vortex y centrifugados durante 1 minuto a 10.000rpm. El sobrenadante fue recolectado y transferido a los tubos libres de RNAsas donde se adicionaron 200 µl de Isopropanol al 95% (noventa y cinco por ciento) en una proporción de 1:1 (Isopropanol y buffer de lisis de RNA). Las muestras fueron transferidas a las columnas junto con el tubo colector y posteriormente fueron centrifugadas por 30 segundos a 10.000rpm.

En la columna se adicionaron 400 µl de la solución de lavado a cada una de las muestras, se centrifugaron durante 30 segundos a 10.000rpm. El líquido obtenido en el tubo colector fue descartado. Posteriormente y directamente en la columna y para cada una de las muestras se adicionaron 50µl de buffer de la mezcla de reacción DNAasa para eliminar el ADN presente en la muestra y se incubaron por 15 minutos como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Condiciones de reacción para el tratamiento del RNA con la enzima DNAasa.

DNAasa I	5UI (1U/µl)
Buffer de reacción 10X DNAasa I	5 µl
Buffer de lavado de RNA	40 µl

Finalmente el RNA se lavó con 400µl de buffer RNA-prep se centrifugó por 30 segundos/10.000rpm. A cada muestra se le adicionaron 700µl de buffer de lavado de RNA y se centrifugaron durante dos minutos a 10.000rpm. Las columnas fueron transferidas a tubos de 1,5 mL libres de RNAsas y se adicionaron 10µl de agua libre de RNAsas provista por el kit. Todas las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm/30 segundos. El RNA se cuantificó en nanodrop marca Thermo Fisher Scientific, y fue almacenado a -20°C para su posterior análisis mediante RT-PCR.

7.3.2.3.2 Detección de los genes mediante RT-PCR:

La expresión de los genes *E6*, *E7* y *p53* se realizó por RT-PCR utilizando el kit Luna universal PCR One-Step Master Mix en tiempo real (New England Biolabs, NEB) y el termociclador en tiempo real CFX-96 BIORAD.

Los cambios en la expresión génica se calcularon utilizando el método de cuantificación relativa de doble delta de CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) reportado por *Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl Acids Res 2001, 29(9):e45.*

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Método $\Delta\Delta Ct$

1. $\Delta Ct = Ct_{\text{Gen Int}} - Ct_{\text{Housekeeping}}$.
2. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra tratada}} - \Delta Ct_{\text{control sin tratamiento}}$.
3. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{muestra tratada}} - \Delta Ct_{\text{control sin tratamiento}})}$.

Todas las reacciones se realizaron en un volumen de reacción de 20 µL por triplicado utilizando los primers dirigidos a los genes *E6*, *E7* y *p53* utilizando como control positivo “housekeeping” *GAPDH* (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa).

La eficiencia de las reacciones tanto para el gen control positivo para PCR en tiempo real se utilizó el gen “housekeeping” *GAPDH* (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) donde se detectó la amplificación de los genes *E6*, *E7* y *p53*. Se utilizó el gen *GAPDH* para determinar de manera indirecta la cantidad de RNA en el estudio; se calculó con el programa LinReg el cual calcula la eficiencia de las reacciones de PCR utilizando la fórmula: **Eficiencia** = $10^{-(1/\text{slope})} - 1$.

La amplificación por PCR consistió en una etapa de inicial de retrotranscripción a 50°C por 10 min, seguido de una desnaturalización a 95°C por 10 minutos, sucesivo por 40 ciclos de amplificación a 95°C para 15 segundos, 60°C durante 60 segundos (Tabla 2). Las concentraciones y volumen de los reactivos utilizados en la PCR se muestran en la Tabla 3. Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado.

Tabla 2: Preparación de la reacción.

COMPONENTES	REACCIÓN 20 µl	CONCENTRACIÓN FINAL
Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	10 µl	1X
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20)	1 µl	1X
Forward primer (10µM)	0.8 µl	0.4 µM
Reverse primer (10µM)	0.8 µl	0.4 µM
RNA	Variable	≤ 1 µg (total RNA)
Nuclease-free Water	20 µl	

Tabla 3: Preparación de la reacción, teniendo en cuenta la temperatura, tiempo y el paso de cada ciclo.

PASO DE CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLO
Reverse Transcription	55°C	10 minutos	1
Initial Desnaturation	95°C	1 minuto	1
Desnaturation	95°C	10 segundos	<u>1</u>
Extension	60°C	30 segundos (+plate read)	40-45
Melt Curva	60-95°C	various	1

7.3.2.3.3 Identificación de p53 y pRb mediante Western blot

7.3.2.3.3.1 Modelo de estimulación de HeLa con los extractos naturales y obtención de lisado celular total.

Para la determinación la activación de p53 y fosforilación de pRb, se utilizaron frascos T25, por cada frasco se sembraron 5000 HeLa (ATCC, USA), después del periodo de establecimiento (20 horas) las células fueron estimuladas durante treinta minutos con cada uno de los extractos naturales a las concentraciones de 0,1 y 10 µg/mL, como control negativo se usó células sin estimular y como control positivo se utilizó *Té verde* a las misma concentraciones de los tratamientos, cada uno de los tratamientos se evaluó en dos experimentos independientes.

Pasado el tiempo de estimulación se eliminó los sobrenadantes de cada pozo, se lavó con PBS y con el fin de tener un valor aproximado de la cantidad de proteína obtenida, se obtuvieron lisados de los frascos bajo las mismas condiciones de cultivo, con buffer RIPA (1% “un por ciento” Nonidet P-40, 0,5% “cero punto cinco por ciento” deoxicolato de sodio, 0,1% “cero punto un por ciento” SDS en PBS 1X) con inhibidores y proteasas y fosfatasa

(SIGMA Aldrich); con el fin de liberar las proteínas celulares de manera mecánica se deja en agitación a temperatura ambiente durante un tiempo de 15 minutos. Los lisados obtenidos se almacenaron a -20°C y posteriormente se cuantificaron con el método de ácido bicinconínico.

7.3.2.3.3.2 *SDS-PAGE y transferencia.*

Con los lisados celulares obtenidos se adición buffer laemmli 6X, se realizó electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida; gel de concentración (acrilamida-bisacrilamida 4% “cuatro por ciento”, Tris-HCl 0,025M pH 6,8, SDS 0,1% “cero punto un por ciento”, persulfato de amonio 0,025% “cero punto cero veinticinco por ciento” y TEMED 0,025% “cero punto cero veinticinco por ciento”) y un gel de separación (acrilamida-bisacrilamida 12% “doce por ciento”, Tris-HCl 0,025M pH 8,8, SDS 0,1% “cero punto un por ciento”, persulfato de amonio 0,025% “cero punto cero veinticinco por ciento” y TEMED 0,025% “cero punto cero veinticinco por ciento”). Para estimar el tamaño aproximado de las proteínas de la muestra, se utilizó un marcador de peso molecular preteñido (Spectra Prestained Protein Ladder de Thermo), compuesto por una mezcla de diez (10) proteínas entre diez (10) a 170kDa La separación de las proteínas se realizó con las siguientes condiciones de corrido electroforético: 40 minutos a 80 V el gel de concentración y una hora 30 minutos a 100V en el equipo Mini protean II (Bio Rad).

Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF (Thermo) activada por 30 segundos en metanol y equilibrada por 10 minutos junto con el gel de poliacrilamida en buffer de transferencia Semi-dry (Thermo). La transferencia se realizó en el buffer Semi-dry a 30V por 1h en el equipo Semi-dry (Thermo). La transferencia se confirmó incubando la membrana por cinco minutos con rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau S 0,1% “cero punto un por ciento” en ácido acético 5% “cinco por ciento”), tras dos lavados con agua destilada.

7.3.2.3.3.3 *Western blot.*

Con el fin de inactivar las proteínas inespecíficas presentes en las muestras lisadas, la membrana se incubó en la solución de bloqueo correspondiente para cada anticuerpo primario por una hora a temperatura ambiente. A continuación se incubó la membrana en el anticuerpo primario, en el buffer de bloqueo indicado a continuación: anti-*p53* (Sigma Aldrich P899) dilución 1:1000 en buffer de bloqueo con albúmina sérica bovina 4% “cuatro por ciento” (Sigma Aldrich), y Tween 20 0,1% “cero punto un por ciento” en TBS 1X pH ocho (8.0). AKT Total (cell signaling 4060), P-AKT (cell signaling 9272), anti-*pRb* (Sigma Aldrich SAB300109) (en buffer de bloqueo con albúmina 4% “cuatro por ciento”, Tween 20 0,1% “cero punto un por ciento” en TBS 1X pH ocho (8.0). Los anticuerpos primarios se incubaron over night a cuatro (4) °C.

Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween 20 0,1% “cero punto un por ciento” durante diez minutos. Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado acoplado a peroxidasa (Vector labs), o con anti-conejo-biotinilado acoplado a peroxidasa (cell signaling) a una dilución de 1:500 por una hora a temperatura ambiente en el mismo buffer de bloqueo empleado para el anticuerpo primario.

Para la determinación de las bandas de cada proteína presente en la muestra, se realizó el revelado con luminol. Utilizando solución A (luminol 0.1% en tris HCl 0.1M pH de siete punto dos (7.2)) y Solución B (solución de H₂O₂ al 0.02% “cero punto cero dos por ciento” en agua destilada). Finalmente las membranas reveladas fueron escaneadas en un transiluminador BIORAD y analizadas por densitometría utilizando el programa de análisis de imágenes Software ImageJ. Los datos de cada proteína fueron normalizados con los datos de β -actina del carril correspondiente. Adicionalmente se determinó la intensidad de la banda de la proteína para cada condición. Como controles de activación de *p53* se utilizó células A549 (carcinoma de pulmón) (ATCC® CCL-185™) y de *pRb* células Hek-293 (ATCC® CRL-1573™)

7.4 Hipótesis de estudio

- Los extractos naturales *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* y *Té verde* como control, tratados *in vitro* tiene la capacidad de inhibir la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo VPH 18.
- Los extractos naturales como *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum* y *Té verde* como control, tienen la capacidad de restablecer la función de *p53* y actuar sobre la fosforilación de la proteína *pRb* del VPH18.

7.5 Análisis estadístico

Todos los datos de CL₅₀ y CE₅₀ se indicaron como la media más o menos la desviación estándar. Los datos se analizaron por el test de ANOVA para comparar células tratadas con los extractos con respecto al grupo control sin estímulo. Al no presentarse una distribución normal son analizados por el estadístico no paramétrico de Kuskral-Wallis. El análisis estadístico se realizó con el programa informativo SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). La probabilidad tenida en cuenta es de $p < 0.05$ como significativo.

No de Réplicas: El estudio se realizó en tres ensayos independientes, cada uno con tres réplicas. (Coeficiente de variación <20% “veinte por ciento”). Se usará como control negativo DMSO (dimetilsulfóxido) al 0,1% “cero punto un por ciento” y células sin estimular y como control positivo el extracto de *Té verde*.

8 Consideraciones éticas.

De acuerdo a las guías de buenas prácticas clínicas del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque y la resolución 008430 de 1993, este estudio se considera sin riesgo, por lo que no requiere aval ético.

8.1 Impacto ambiental:

Durante la ejecución de este proyecto, el material contaminado con los extractos, células, sus componentes y los reactivos de desecho fueron manipulados y desechados de forma adecuada. Por lo que todo material contaminado con reactivos no biodegradables, y tóxicos que pudieran generar un desequilibrio al medio ambiente y a la salud de las personas fueron almacenados y descartados según los protocolos de manipulación indicados por los fabricantes o procesados por entidades especializadas que contrata la institución para estos fines. El material de riesgo biológico o químico fue manipulado por personal calificado y con los implementos y equipos necesarios para la seguridad de los investigadores y del medioambiente.

9 Resultados

9.1 Fase cuantitativa

9.1.1 Efecto de los extractos naturales sobre la viabilidad celular y cálculo de la concentración letal cincuenta (CL_{50})

En este estudio se utilizaron células tumorales HeLa las cuáles poseen de diez a 50 copias del VPH y tienen integrado en su genoma los oncogenes virales *E6* y *E7* del genotipo VPH 18. El efecto de los seis extractos frente a las línea celular tumoral HeLa y los fibroblastos gingivales sanos (FGH) se determinó a través del ensayo colorimétrico de resazurina. Todos los extractos afectaron la viabilidad celular de la línea FGH al rango de concentración de 1000-5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, el extracto de *Trametes versicolor* y *Kudzu Root* no disminuyeron la viabilidad de las células HeLa a este rango de concentración. Los valores de las concentraciones inhibitorias medias (CL_{50}) mostraron que solo para el extracto *Solanum lycopersicum* a concentraciones de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la mínima concentración de tratamiento utilizada, se observa una viabilidad celular del 100% “cien por ciento”, a diferencia de la concentración mayor (3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en donde se evidencia la muerte celular de todas las células sugiriendo que es muy citotóxico (figura 3B). Estos valores de toxicidad para las células tumorales HeLa resultaron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a la CL_{50} obtenida de este extracto en las células normales FGH (figura 3).

Se evidenció que las células al ser estimuladas con el extracto de *Wolfberry*, (figura 3A) a concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una viabilidad celular del 90% “noventa por ciento”, aumentando la toxicidad celular a concentraciones inhibitorias de 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, llegando a una viabilidad celular del 20% “veinte por ciento”.

En relación al extracto *Schizandra* (figura 3D) obtuvo mayores porcentajes de viabilidad celular del 100% “cien por ciento” en cuanto a la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aumentando la toxicidad celular a concentraciones de 3000, 4000 y 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde se evidencia la disminución del crecimiento celular, llegando a una viabilidad del 8.7% “ocho punto siete por ciento”.

El control positivo de *Té verde* (figura 3E) se evidenció un porcentaje de viabilidad del 100% a la más baja concentración (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aumentando la toxicidad celular a medida que aumenta las concentraciones del extracto, obteniendo una CL_{50} de 1837 $\mu\text{g}/\text{mL}$, llegando a presentar una muerte celular del 5% “cinco por ciento” a la concentración de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para el extracto *Dodder Seed* y *Wolfberry* a las máximas concentraciones evaluadas no se presentó ninguna muerte celular, en cambio para los extractos *Schizandra*, *Solanum lycopersicum* y el control *Te verde*, se logró presentar muerte celular a la más altas concentraciones. En general los extractos *Dodder Seed*, *Wolfberry*, *Schizandra* y *Solanum lycopersicum* presentaron una viabilidad celular que se comportó de manera dosis dependiente, es decir que la disminución en la viabilidad es directamente proporcional a las concentraciones de cada extracto utilizadas para el cálculo de la CL_{50} .

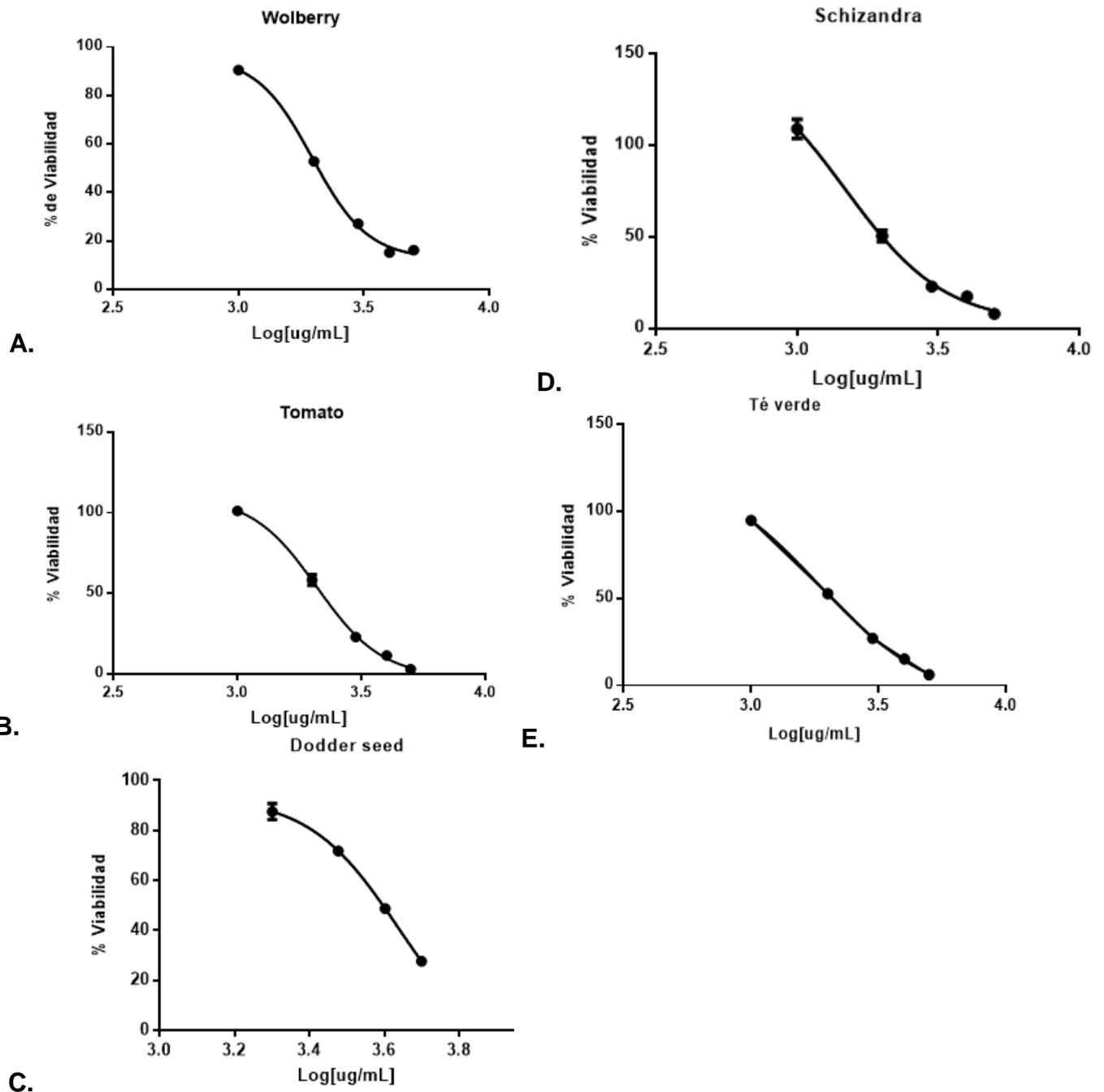


Figura 3: ($P < 0,05$). Viabilidad y toxicidad porcentual de células HeLa cultivadas sobre placas de 96 pozos, expuestas a concentraciones (1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 $\mu\text{g/mL}$) de extractos (A) Wolfberry (B) *Solanum lycopersicum* (C) Dodder Seed (D) Schizandra y (E) Té verde como control positivo durante 24 horas de incubación a 37 °C

De acuerdo a la Tabla 3 se puede evidenciar que la CL_{50} (concentración letal 50) es 1969 para el extracto *Wolfberry*, ocurre para el extracto *Solanum lycopersicum* al presentar un

CL₅₀ de 2088, mientras que para el extracto *Dodder seed* representa un rango amplio en cuanto a CL₅₀ siendo de 2706 a 6968 siendo el CL₅₀ de 4342 igualmente ocurre con el extracto *Schizandra* en donde se tiene el CL₅₀ de 1479; esto hace referencia que a la concentración en que se encuentra el extracto es lo necesario para reducir el crecimiento de la población de las células infectadas en un 50%, es decir en cuanto a los extractos estudiados, el extracto *Dodder seed* representa con mayor probabilidad de reducir la población celular infectada. De igual forma se logra evidenciar en la Tabla 3 que la variable (R-square) varía entre 0,99 y 0,98, esto quiere decir que por estar por debajo de 1 se considera que no existe una gran variable en el momento de tomar cada muestra y en el uso de pipeta y pipeta.

Tabla 4 Concentración letal 50 de extractos *Wolfberry*, *Solanum lycopersicum*, *Dodder Seed* y *Schizandra*.

Extracto	Rango CL₅₀	CL₅₀	R square
<i>Wolfberry</i>	1854 - 2092	1969	0,9948
<i>Solanum lycopersicum</i>	1956 - 2230	2088	0,9950
<i>Dodder seed</i>	2706 - 6968	4342	0,9870
<i>Schizandra</i>	746,2 - 292	1479	0,9860

9.1.2 Efecto de los extractos sobre la expresión génica de los oncogenes *E6*, *E7* y *p53* en células *HeLa*.

En los ensayos de PCR en tiempo real de transcripción inversa se evidenció la expresión del RNAm que tienen las oncoproteínas *E6* y *E7* y su interacción con los extractos de *Trametes versicolor*, *Wolfberry* y *Té verde* utilizando como control positivo, comparados con células sin estimular utilizadas como control negativo, (figura 4A), teniendo en cuenta la concentración letal 50 (CL₅₀), donde se observa que la expresión de la oncoproteína *E6* (figura 4A) para el extracto *Trametes versicolor* a la concentración más alta (10µg/mL) se sobreexpresa, lo cual indica que la interacción con éste oncogén podrían tener un efecto de proliferación celular, obteniendo así un efecto no deseado ya que al presentarse la

oncoproteína *E6* a estos valores hace que se induzca a la degradación de la proteína *p53* no deteniendo el ciclo celular y la célula entrar a apoptosis.

Por el contrario, el extracto de *Trametes versicolor* a las bajas concentraciones utilizadas (0,1µg/mL y 1µg/mL) y el extracto de *Wolfberry* a todas las concentraciones inducen la expresión a la baja de la oncoproteína *E6*, comparados con el control sin estímulo, obteniendo un efecto muy interesante ya que podrían estar regulando la expresión de la proteína *p53* induciendo a las células a muerte celular o apoptosis.

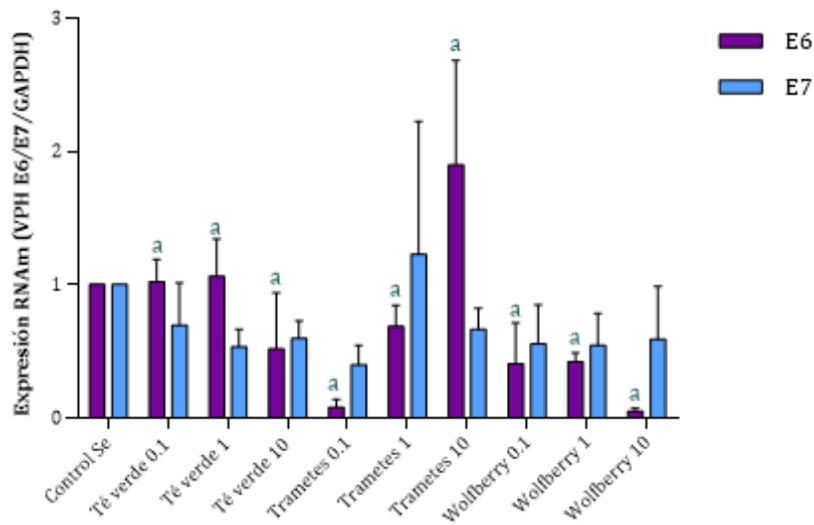
En la figura 4A se muestra el efecto que presentan los extractos de *Trametes versicolor*, *Wolfberry* y *Té verde* frente a la oncoproteína *E7*, ya que todas las concentraciones inducen la disminución en la expresión de este oncogén viral, excepto para el extracto de *Trametes versicolor* que a la concentración de 1 µg/mL produjo la sobreexpresión de la proteína, lo que sugiere que posiblemente puede inactivar a la proteína de retinoblastoma (*pRb*), siendo ésta la que induce a la célula a continuar el ciclo celular provocando la proliferación celular y la transformación maligna.

Por esta razón, se puede observar que el extracto de *Trametes versicolor* es el más seguro ya que no produce toxicidad a las células HeLa, y a concentraciones bajas tiene la capacidad de inhibir la expresión de los oncogenes virales de VPH18 y presenta efectos antitumorales actuando sobre la proteína *p53*, sin embargo, a altas concentraciones evidencia efectos no deseados para las células ya que estaría favoreciendo el comportamiento tumoral y/o cancerígenos de las células HeLa.

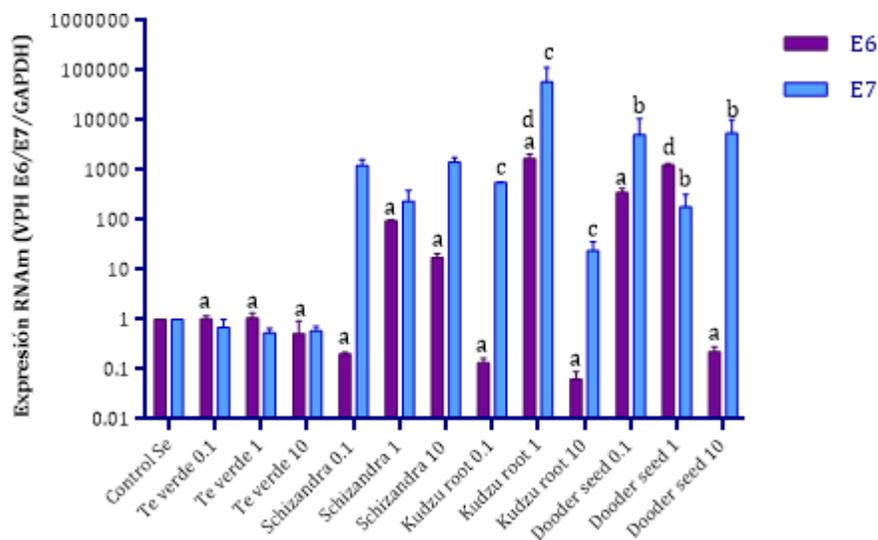
En la figura 4B se evidencia la expresión de las oncoproteínas *E6* y *E7* frente a los extractos de *Schizandra*, *Kudzu root*, *Dodder seed* y *Té verde*, control positivo, a diferentes concentraciones de 0.1µg/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL, y las células sin estímulo utilizadas como control negativo. Se observa que la oncoproteína *E7* se sobreexpresa frente a los

extractos *Dodder seed* a la más baja y alta concentración, de igual forma también se observa al extracto *Kudzu root* a la concentración de 1 µg/mL se encuentra sobreexpresado, lo cual indica que podría inducir proliferación celular.

Mientras que frente a la expresión de la oncoproteína *E6* al encontrarse expresada a la baja o al estar en condiciones similares a las células sin el estímulo, se puede interpretar que todos estos extractos a todas las concentraciones (0.1µg/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL) inducen a apoptosis celular al no degradar a la proteína *p53*.



A.

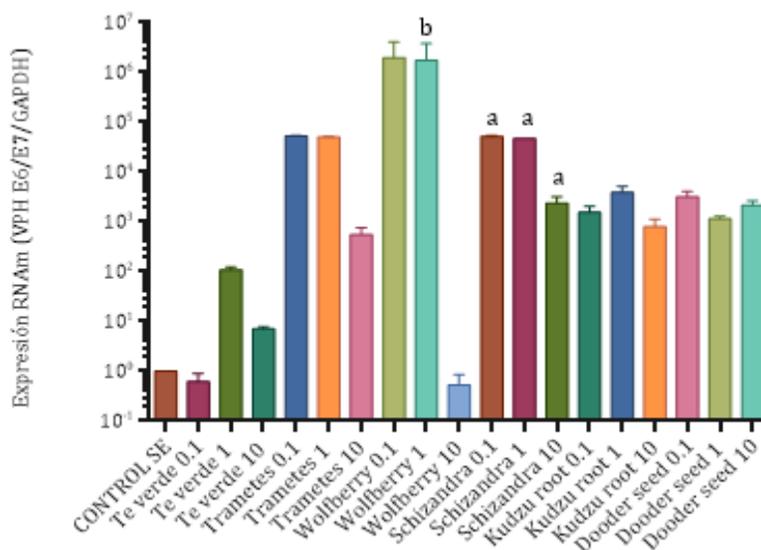


B.

- Diferencias significativas en la Expresión del oncogén E6 para todos los extractos contra el control negativo (células sin estímulo). Diferencias dadas por el tipo de extracto y por concentraciones 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Diferencias significativas en la expresión del oncogén E6 frente al control negativo (células sin estímulo) para el extracto Dodder seed independientemente de las concentraciones.
- Diferencias significativas del oncogén E7 frente al control positivo (extracto de Té verde) para el extracto Kudzu root a todas las concentraciones.
- Diferencias significativas del oncogén E6 frente al control positivo (extracto de Té verde) para el extracto Kudzu root y Dodder seed a concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 4: Expresión génica las oncoproteínas E6 y E7 frente a los extractos tratados a concentraciones de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (A) Extractos Trametes versicolor, Wolfberry, control positivo el Té verde y control negativo, las células sin estímulo. (B) Extractos Schizandra, Kudzu root y Dodder seed, control positivo el Té verde y control negativo las células sin estímulo.

La expresión del gen p53 (figura 5) frente a los extractos *Trametes versicolor*, *Wolfberry*, *Schizandra*, *Kudzu root*, *Dodder seed* y *Té verde* a diferentes concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y células sin estímulo, se evidencia que los extractos de *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Dodder seed* y *Schizandra* a todas las concentraciones inducen al aumento de la expresión del gen p53. Finalmente se observa que el extracto de *Wolfberry* podría no tener el efecto sobre la detención del ciclo celular a ninguna de sus concentraciones.



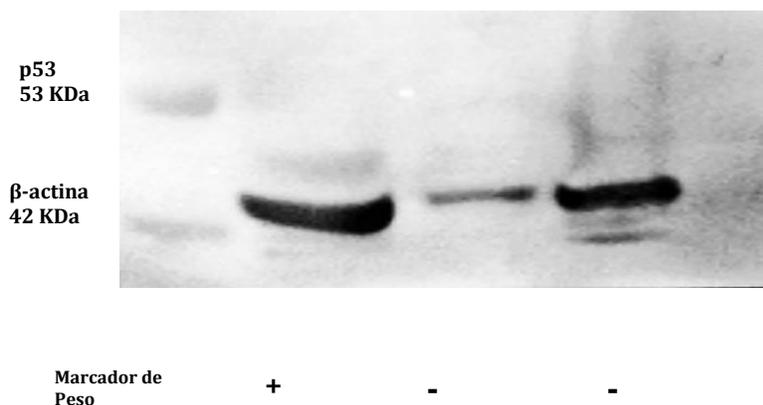
- Existen diferencias significativas en la expresión de la proteína p53 para el extracto *Schizandra* contra el control negativo (células sin estímulo): Las diferencias son dadas por el tipo de extracto y por la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Diferencias significativas en la expresión de la proteína p53 frente al control positivo (extracto *Té verde*) para el extracto *Wolfberry* a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Gráfica 5: Expresión de RNAm frente a la proteína p53 a concentraciones de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL, frente a células sin estímulo, control positivo Té verde y los extractos *Trametes versicolor*, *Wolfberry*, *Schizandra*, *Kudzu root* y *Dodder seed*.

9.1.3 Efecto de los extractos naturales sobre la activación de las proteínas p53 y pRb en células HeLa.

Para la identificación de las células control de activación de p53 y pRb se evaluaron las células A549 (línea celular inmortalizada derivada del Adenocarcinoma humano, células epiteliales basales alveolares), células Jurkat (Línea celular derivada de la Leucemia de célula T humana) y células HeLa (línea celular usada en la investigación científica, siendo la más antigua y derivadas de unas células de cáncer cervical obtenidas en 1951), en donde se puede demostrar que las células A549 inducen una activación de la fosforilación de p53 la cual se evidencia en la banda que de acuerdo al marcador de peso molecular es de 53 KDa; en relación a las células Jurkat no se presentó ningún bandeo para p53 ni pRb al igual que nuestras células de interés (HeLa), como control de proteína se utilizó β-actina que en todos los extractos celulares se expresó con una banda de peso moléculas de 42 KDa (Figura 6). En otro grupo de experimentos se demostró que las células Hek (Células embrionarias de riñón humano) era control positivo de la fosforilación de pRb (datos no presentados).

Después de identificar que las células A549 era control positivo para p53 y Hek para pRb, se continuó evaluado el efecto de los extractos que presentaron mayor interés por sus resultados sobre la expresión de los oncogenes E6, E7 y P53.



Celulas A549	-	+	-	-
Celulas Yuckat	-	-	+	-
Celulas HeLa	-	-	-	+

Figura 6: Estandarización de western Blot para la identificación de P53 en células A549, Jurkat, HeLa. Se utilizó 1µg/µL de proteína celular por cada carril. Cada banda representa la expresión de 2 experimentos independientes.

Nuestros resultados permiten observar que los extractos de *Shizandra* y *Wolfberry* a concentraciones de 0,1, 1,0 µg/mL inducen una activación de la fosforilación de p53, lo que nos sugiere que estos tratamientos pueden conllevar a un proceso de apoptosis de las células HeLa; con respecto al extracto de *Trametes versicolor* a las concentraciones de 0,1, 1.0 µg/mL no indujo activación de p53, al igual que nuestro control (*Té verde*, 10 µg/mL), por lo que se requiere continuar evaluado su posible mecanismo de acción, teniendo en cuenta sus efectos sobre los oncogenes evaluados (Figura 7).

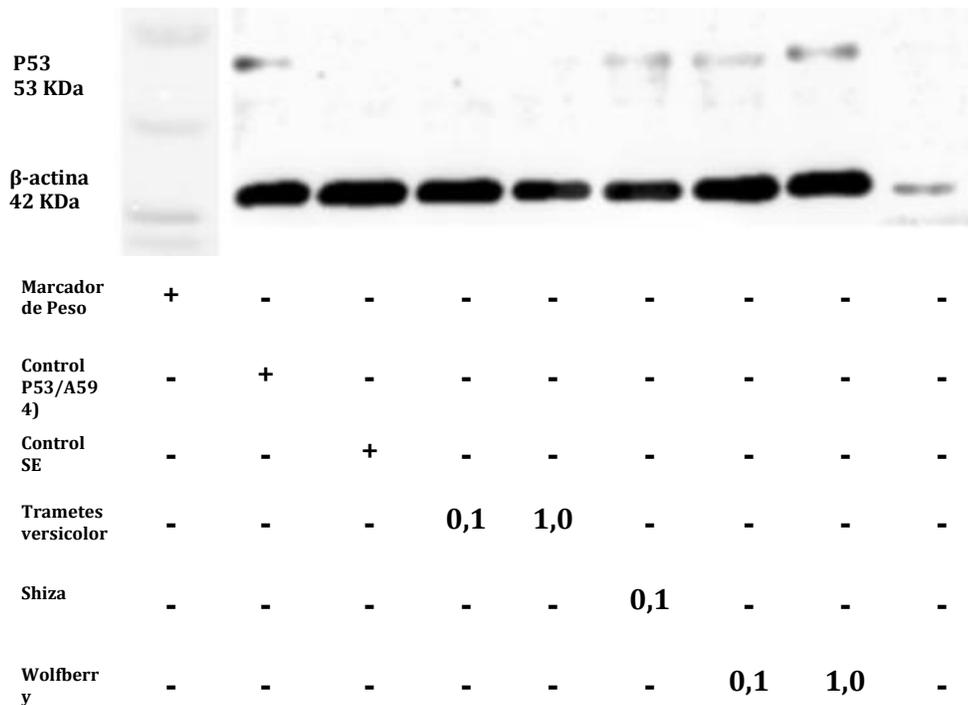


Figura 7: Efecto de los extractos de *Trametes versicolor*, *Shizandra* y *Wolfberry* a concentraciones de 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la fosforilación de p53 en células HeLa durante 30 minutos de tratamiento. Se utilizó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína celular por cada carril, se utilizó como control positivo de activación de p53 fosforilado células A549 y como control negativo células HeLa sin estimular. Cada banda representa la expresión de dos experimentos independientes.

En relación a los resultados sobre la fosforilación de *pRb*, ninguno de los extractos presento activación de esta proteína, sin embargo se requiere de próximos estudios en los que se aumente las concentraciones de proteína o confirmar que no sea por degradación de proteína por lo que no se puede evidenciar (Figura 8).



Marcador de Peso	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control Rb (HEK)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Control SE	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trametes versicolor</i>	-	-	-	0,1	1,0	-	-	-	-
<i>Shizandra</i>	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
<i>Wolfberry</i>	-	-	-	-	-	-	0,1	1,0	-

Figura 8: Efecto de los extractos de *Trametes versicolor*, *Shizandra*, *Wolfberry* a concentraciones de 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la fosforilación de pRb en células HeLa durante 30 minutos de tratamiento. Se utilizó $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína celular por cada carril, se utilizó como control positivo de activación de Rb fosforilado células HEK y como control negativo células Hela sin estimular. Cada banda representa la expresión de 2 experimentos independientes.

10 Discusión

El cáncer oral en Colombia se considera una prioridad en salud pública, que produce el 12% de los tumores de orofaringe y representa la quinta tasa de incidencia en hombres y la novena en mujeres (Rocha A. y col. 2010; INC 2010, Ordoñez D. y col. 2014), siendo el carcinoma escamo-celular el más frecuente y el más agresivo (Instituto Nacional de Cancerología, INC, 2010). ¿Por qué el aumento de la incidencia de cáncer orofaríngeo asociado al VPH es más pronunciado en individuos jóvenes? este efecto podría atribuirse a los cambios en las normas sexuales (es decir, más parejas sexuales orales o sexo oral a una edad más temprana en generaciones recientes que las pasadas) combinado con un menor número de cánceres asociados al tabaco en cohortes jóvenes (Marur S *et al.* 2010).

Actualmente, no hay ninguna terapia no invasiva específica avanzada contra la infección oral producida por el VPH. Por consiguiente, estudios recientes han demostrado que los antioxidantes y los derivados de plantas pueden ser eficaces contra la infección por VPH (Shlaepfer L & Mendoza JA, 2010). Las plantas tradicionales chinas, con propiedades anticancerígenas, han atraído mucha atención en los últimos años. Las investigaciones han revelado que las actividades anticancerosas de estas hierbas son parcialmente debido a su capacidad para inducir la apoptosis en las células cancerosas.

En nuestro estudio *in vitro* se demostró que el extracto *Trametes versicolor*, se puede considerar como el más seguro, además de ser no tóxico presentando una alta viabilidad celular para las células infectadas con el VPH18 y células sanas; a bajas concentraciones se observó que el extracto podría modular la expresión de los oncogenes *E6* y *E7*, por el contrario, a altas concentraciones se demostró el posible efecto citotóxico para las células HeLa. De acuerdo a lo anterior, los oncogenes *E6* y *E7* inactivan genes supresores de tumores, como *p53* y *pRb*, respectivamente, conduciendo al descontrol en importantes puntos del ciclo celular y de esta manera, favorecen la progresión de lesiones pre invasivas y el mantenimiento del fenotipo maligno (Retting E *et al.*, 2015). Por tanto, el evento de integración del virus en el genoma del huésped ha sido propuesto como potencial marcador de la progresión de neoplasias cervicales (Daniel B *et al.*, 1995).

En un estudio realizado por el Instituto de Investigación de Productos Naturales de Davis, California en Estados Unidos, realizado por Christopher R. Hobbs, demostró que el extracto *Trametes versicolor* muestra efectos anticancerígenos, antitumorales y antiproliferativos. Estos efectos pueden explicarse, por una serie de efectos biológicos específicos, como la inhibición de las metaloproteinasas y otras enzimas relacionadas con la actividad metastásica y su capacidad para suprimir el crecimiento de células cancerosas y aumentar la expresión de antígenos de superficie de células tumorales como como antígenos asociados a leucocitos humanos (HLA), que pueden mejorar el reconocimiento y, por lo tanto, la eliminación de la célula cancerígena por parte del sistema inmunitario del huésped (Iguchi *et al.*, 2001). La respuesta de las células T CD4 + antitumoral deteriorada en el

intestino asociado el tejido linfoide (GALT) de ratones libres de patógenos se mejoró con una dosis oral de polisacárido péptido (PSK), que suprimió el crecimiento del carcinoma de colon inoculado en el ciego, aumentó la actividad neutralizadora de tumores de las células de los ganglios linfáticos mesentéricos y disminuyó los niveles de inmunosupresores factores tales como el factor de crecimiento transformante (TGF) β (Harada et al., 1997).(63)

No existe reportes en la literatura ni estudios in vitro donde demuestre el efecto citotóxico a las célula del extracto *Trametes versicolor* a altas concentraciones.

El *Té verde* ha mostrado una potente actividad contra células de carcinoma cervicales y orales positivas para VPH16 y VPH18, también inhibe proliferación de forma dosis-dependiente y directamente inhibe al oncogén E6, induciendo apoptosis a través de la vía de las caspasas (Piao L et al., 2017).

El *galato de epigalocatequina* (EGCG) es uno de los principales componentes polifenólicos del *Té verde* (*Camellia sinensis*) que pertenece a la clase de los polifenoles naturales catequinas (Ahn WS et al., 2003). Se ha descrito que el EGCG y otras catequinas del *Té verde* son eficaces contra la infección mediada por VPH en lesiones cervicales y posee actividades antiproliferativas, antiangiogénicas, antimetastáticas y proapoptóticas. EGCG muestra efectos antiproliferativos tales como la detención del ciclo celular en la fase G1 que precede a la muerte celular programada a través de la apoptosis (Dalianis T, 2014), investigaron la eficacia del extracto de té verde aplicado tópica y oralmente para aliviar las lesiones cervicales en pacientes infectados con VPH (Bosch FX et al., 2013). Los pacientes recibieron dos veces a la semana pomada tópica o cápsulas de polifenón oral E diario (200 mg), o una combinación de ambos durante el período de 8-12 semanas. El estudio concluyó que el 69% (Bosch FX et al., 2013) de los pacientes tratados con el extracto de *Té verde* (ungüento o cápsula o ambos) mostraron ausencia de ADN del VPH y mejoría de la displasia en comparación con el 10% (Matsushia K et al., 2015, Xia G, et al., 2014) de pacientes controles no tratados.

El extracto **Wolfberry** pertenece a la familia de *Solanaceae*, y su fruta o extracto ha sido considerado en la farmacopeia china como un medicamento de grado superior para la modulación de la inmunidad corporal (Scholtysek C *et al.*, 2009), la cual induce apoptosis en las células cancerosas (Hobbs CR *et al.*, 2004), los efectos se atribuyen a los polisacáridos (LBPs) que contiene y pueden aumentar las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas, por otra parte se sabe que el gen supresor de tumores *p53* desempeña un papel importante en la inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis, donde se encontró en otros estudios que las LBP estimulan la proliferación de células MCF-7 a través de la vía ERK, que puede estar asociada con la vía *p53* (Scholtysek C *et al.*, 2009).

El extracto **Saw Palmetto Berry** En un estudio realizado en el 2009 Scholtysek C y Col. Usaron células DU-145 demostrar que SPBE y sus componentes de esterol, β -sitosterol y estigmasterol, inhiben el crecimiento del cáncer de próstata aumentando la expresión de proteína *p53* y también inhiben el desarrollo de carcinoma al disminuir la expresión de proteína *p21* y *p27* (van Kempen PMW *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, nuestros hallazgos proporcionan evidencia inicial de que los extractos *Trametes versicolor* y *Wolfberry* podría, ser utilizados como una alternativa para inhibir la expresión de los oncogenes virales *E6* y *E7* del genotipo VPH 18. Sin embargo, se requieren más estudios, para determinar sus mecanismos de acción.

11 Conclusiones

- La infección por VPH es la principal enfermedad de transmisión sexual en el mundo. La identificación de lesiones intraepiteliales y tumorales asociadas a tipos con diferente potencial oncogénico han demostrado que este virus participa en un número creciente de lesiones, en cavidad oral.
- Para todos los extractos se observa un efecto dosis dependiente a una relación directamente proporcional de concentración versus porcentaje de viabilidad celular.
- Los efectos de los extractos naturales obtenidos a partir de *Trametes versicolor*, *Kudzu root*, *Schizandra*, *Dodder seed*, *Wolfberry* y *Solanum lycopersicum* frente a células HeLa infectadas, son favorables e inhiben el crecimiento celular, manteniendo un porcentaje mínimo de viabilidad y toxicidad celular.
- Nuestros resultados demuestran que el extracto natural de *Trametes versicolor* es un potente agente antiviral para VPH 18. Se justifica el desarrollo adicional de *Trametes versicolor* como agente terapéutico contra el cáncer para controlar la población con VPH18 ya que según nuestra investigación a bajas concentraciones se evidencia que es seguro para la célula.

12 Referencias bibliográficas

1. Abdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, Chagraoui H, Maggiorella L, Thierry J et al, Antiviral agent Cidofovir restores *p53* function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers, Francia, *Oncogene*, 2002, 21: 2334 – 2346. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948417>
2. Abdullaev FI, Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.), *Exp Biol Med* 2005; 227: 20–5. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788779>
3. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, Lee IP, Lee JM, Namkoong SE, et al. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G (1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol.* 2003; 22(3):217-24. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12804120>
4. Ahn WS, Yoo J, Huh SW, Kim CK, Lee JM, Namkoong SE, et al. Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions, *Eur J Cancer Prev.* 2003; 12(5): 383-90. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512803>.
5. Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Gheit T, Olshan AF, Wisniewski K, et al., Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer, *International Journal of Cancer* 2017, 140(9):1968-1975. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108990>
6. American Cancer Society, 2016. Disponible en URL: <https://www.cancer.org/es.html>
7. Bonilla-Velez J, Mroz EA, Hammon RJ, Rocco JW, Impact of human papillomavirus on oropharyngeal cancer biology and response to therapy: Implications for treatment. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* 2013; 46:521–543. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Impact+of+human+papillomavirus+on+oropharyngeal+cancer+biology+and+response+to+therapy%3A+Implications+for+treatment>.
8. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases.

- Vaccine. 2013; 31 Suppl 8:11-31. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332295>
9. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110(3 Suppl 2):S4-7. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Natural+history+and+epidemiology+of+HPV+infection+and+cervical+cancer.+Gynecol+Oncol.+2008>.
 10. Conway DI, Purkayastha M Chestnutt IG, The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors, *British dental journal* (2018) 225 (9) 867-873). Disponible en URL: <https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2018.922>.
 11. Cortés J, García de Paredes M, Muñoz E, Martínón F, Torné A, et al. Vacunas profilácticas frente al virus del papiloma humano: Documento de consenso 2008. *SEMERGEN.* 2009; 35(1):20-8. Disponible en URL: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-articulo-vacunas-profilacticas-frente-al-virus-13132462>.
 12. Dailard C. HPV in the United States and Developing Nations: A Problem of Public Health or Politics? *The Guttmacher Report on public policy*, 2003; 6(3):[3 pantallas]. Disponible en URL: https://www.guttmacher.org/sites/default/files/article_files/gr060304.pdf.
 13. Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2014; 44 (6):1799-805. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676623>.
 14. Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad, Krishna S, Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR, *Journal of General Virology* (1995), 76, 2589-2593. Disponible en URL: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/76/10/JV0760102589.pdf?expires=1543457618&id=id&accname=guest&checksum=DD3C343C63DCC4669EB03B4B83D36B1C>.
 15. D'Souza G., Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev. Med.* 2011; 53(Suppl. 1):S5-S11. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3287051/>

- 16.** Engelhard YN, Gazer B, Paran E., Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: a double-blind, placebo-controlled pilot study, *Am Heart J.* 2006;151(1):100. Disponible en URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000287030500503X?via%3Dihub>
- 17.** Ghali W, Vaudry D, Jouenne T, Marzouki MN, Lycium europaeum fruit extract: antiproliferative activity on A549 human lung carcinoma cells and PC12 rat adrenal medulla cancer cells and assessment of its cytotoxicity on cerebellum granule cells, *Nutr Cancer.* 2015; 67(4):637-46. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825796>
- 18.** Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z, Xiao W, Kahle L, et al., Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010, *JAMA.* 2012; 307(7): 693-703. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790188/>
- 19.** Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF and Fakhry C, Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *J Clin Oncol*, 2015, 33(29): 3235-3242. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4979086/>
- 20.** Gurib-Fakim A, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Mol Aspects Med.* 2006;27(1):1-93 Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105678>.
- 21.** Hobbs CR, Medicinal Value of Turkey Tail Fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát (Aphyllphoromycetidae). A Literature Review, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2004, 6, 195-218. Disponible en URL: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52.1b1b20957ef5c8f4.210d57c00e88b78c.html>.
- 22.** Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18, *EMBO J.* 1991, 10(13):4129-4135. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC453163/>
- 23.** Instituto Nacional de Cancerología (INC), 2010. Disponible en URL: <http://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/incidencia1.pdf>

24. Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Bardbori AM, Niknahad H, Effects of *Solanum lycopersicum* extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats, *Food and Chemical Toxicology*, 2008; 46(12) 3612–15. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834914>
25. Kempen PMW, Noorlag R, Braunius WW, Moelans CB, Widad Rifi W, Savola S, et al., Clinical relevance of copy number profiling in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Cancer Medicine* 2015; 4(10):1525–1535. Disponible en URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.499>
26. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(2):177–206. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157465>
27. Mao F, Xiao BX, Jiang Z, Zhao J, Huang X, Guo J. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med Oncol* 2011; 28(1): 121-6. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066520>
28. Matsuhisa K, Yamane S, Okamoto T, Watari A, Kondoh M, Matsuura Y, et. al, Anti-HCV effect of *Lentinula edodes* mycelia solid culture extracts and low-molecular-weight lignin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 462(1):52-7. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25935479>
29. Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML, Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(2):117-28. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228314>
30. Marur S., D'Souza G., Westra W.H., Forastiere A.A, HPV-associated Head and Neck Cancer: A Virus-related Cancer Epidemic – A Review of Epidemiology, Biology, Virus Detection and Issues in Management, *Lancet Oncol.* 2010; 11(8): 781–789. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5242182/>
31. Marques LL, Panizzon GP, Aguiar BA, Simionato AS, Cardozo-Filho L, Andrade G, et al, Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds, *Food Chem.* 2016;212:703-11. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27374587>

32. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S, Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region, *Head & Neck* 2013, 35(5), 747–755. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267298>
33. Mistry N, Drobni P, Näslund J, Sunkari VG, Jenssen H, Evander M, The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin, *Antiviral Res.* 2007, 75(3)258–65. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17481742>
34. Muñoz-Santos C, Pigem R, Alsina M, New Treatments for Human Papillomavirus Infection, *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104(10):883-9. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706272>
35. Nelke K.H, Lysenko L, Leszczyszyn J, Gerber H, Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2013; 67:610-6. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Human+papillomavirus+and+its+influence+on+head+and+neck+cancer+predisposition.+Postepy+higieny+i+medycyny+doswiadczalnej>
36. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S, Natural compounds for cancer treatment and prevention, *Pharmacol Res.* 2009; 59(6):365–78. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429468>
37. Organización Mundial de la Salud, 2002. Disponible en URL: <https://www.who.int/whr/2002/es/>
38. Ordóñez D, Aragón N, García LE, Collazos P, Bravo LE. Cáncer oral en Santiago de Cali, Colombia: análisis poblacional de la tendencia de incidencia y mortalidad. *Salud Pública Mex* 2014; 56(5):465-472. Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342014000500014
39. Rautava J, Willberg J, Louvanto K, Wideman L, Syrjänen K, Grénman S, et al., Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study, *PLoS One.* 2012; 7(8): e42171. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952591>

- 40.** Reddya L, Odhava B, Bhoola KD, Natural products for cancer prevention: a global perspective, *Pharmacol Ther* 2003; 99(1):1-13. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12804695>
- 41.** Rehman Z, Habib F, Shah WH, Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil, *Food Chemistry*, 2004, 85(2): 215–220. Disponible en URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603003467>
- 42.** Rettig E., Kiess A.P., Fakhry C. The role of sexual behavior in head and neck cancer: Implications for prevention and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015; 15(1):35–49. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4385715/>
- 43.** Reygaert WC. The antimicrobial possibilities of green tea. *Front Microbiol.* 2014;5:434. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138486/>
- 44.** Rocha A, Bologna R, Rocha C. Virus del papiloma humano y el cáncer de cabeza y cuello: revisión de la literatura desde México y Colombia. *Univ Odontol.* 2012; 31(67): 149-157. Disponible en URL: http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=91756&id_seccion=4887&id_ejemplar=8998&id_revista=322
- 45.** Ryu MJ, Chung HS, Effects on Hot Water Extract of *Schizandra chinensis* on Colon Cancer Cell Line [2011], Food and Agriculture Organization of the United Nations 2011. Disponible en URL: http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=CE10AC7CE4751E628C95EA2E4AB363A6?request_locale=ru&recordID=KR2012001470&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=
- 46.** Sanabria JG, Virus del Papiloma humano, Human Papilloma virus (HPV) *Rev Ciencias Médicas*, 2009, 13(4):[23 pantallas]. Disponible en URL: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942009000400019.
- 47.** Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical use. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2007; 157:315. Disponible en URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10354-007-0428-4>
- 48.** Scholtyssek C, Krukiewicz AA, Alonso JL, Sharma KP, Sharma PC, Goldmann WH, Characterizing components of the Saw Palmetto Berry Extract (SPBE) on prostate cancer cell growth and traction, *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications. 2009, 379(3):795–8. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059205>
- 49.** Sirianni N, Wang J, Ferris RL, Antiviral activity of Cidofovir on a naturally human papillomavirus-16 infected squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell line improves radiation sensitivity, *Oral Oncology* 2005; 41(4): 423-8. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15792615>
- 50.** Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, WANG D, Haugen TH and Turek LP, Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers, *Int J Cancer* 2004; 108(5), 766–72. Disponible en URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.11633>.
- 51.** Smith-McCune K, Kalma D, Robbins C, Shivakumar S, Yuschenkoff L, Bishop M, Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130, *Proc. Natl. Acad. Sci., Microbiology* 1999; 96(12):6999–7004. Disponible en URL: <http://www.pnas.org/content/96/12/6999>
- 52.** Syrjanen S, Shabalova I, Petrovichev N, Podistov J, Ivanchenko O, Zakharenko S, Nerovjna R, et al. Age-specific incidence and clearance of high-risk human papillomavirus infections in women in the former Soviet Union. *Int J STD AIDS*. 2005; 16(3):217-23. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Age-specific+incidence+and+clearance+of+high-risk+human+papillomavirus+infections+in+women+in+the+former+Soviet+Union>.
- 53.** Taylor & Francis Group. The health professional's HPV HANDBOOK. 1: Human papillomavirus and cervical cancer. 2004. The European Consortium for Cervical Cancer education. Disponible en URL: https://www.zervita.de/gfx_content/Dokumente/HPVHandbook1-1.pdf
- 54.** Xia G, Xin N, Liu W, Yao H, Hou Y, Inhibitory effect of Lycium barbarum polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway, *Mol Med Rep*. 2014; 9(4), 1237-41. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549741>
- 55.** Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA, Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University

- Students, *Am J Epidemiol* 2003; 157(3):218-26. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543621>
- 56.** Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection, *J Infect Dis.* 2005; 191(5):731-8. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688287>
- 57.** Whang S, Filippova M, Duerksen-Hughes P, Recent Progress in Therapeutic Treatments and Screening Strategies for the Prevention and Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer, *Viruses* 2015; 7(9):5040–5065. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4584304/> Wong KH, Li GQ, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Kudzu root: Traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases, *J Ethnopharmacol.* 2011; 134(3):584-607. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315814>
- 58.** World Health Organization (WHO). Primary Prevention of Cervical Cancer. CAN/85.1. Geneva: WHO (October 3-November 2, 1985). Disponible en URL: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/59555>
- 59.** Zhao Y, Jiang F, Liu P, Chen W, Yi K. Catechins containing a galloyl moiety as potential anti-HIV-1 compounds. *Drug Discov Today.* 2012, 17(11-12):630-5. Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414543>