

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE *Pueraria lobata* Y *Schisandra chinensis* EN
QUERATINOCITOS TUMORALES TRANSFORMADOS POR VPH-18**

**Guillermo Antonio Cardona Montes
Valentina De Los Ángeles Hernández Vilachá**

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

BOGOTÁ DC.- 11 DE DICIEMBRE DE 2020

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad:	El Bosque
Facultad:	Odontología
Programa:	Odontología
Título:	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE <i>Pueraria lobata</i> Y <i>Schisandra chinensis</i> EN QUERATINOCITOS TUMORALES TRANSFORMADOS POR VPH-18
Grupo de Investigación:	Grupo de Inmunología Celular y Molecular Universidad El Bosque (INMUBO) Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)
Línea de investigación:	Inmunología celular y molecular del cáncer
Tipo de investigación:	Pregrado / Grupo
Estudiantes:	Guillermo Antonio Cardona Montes Valentina De Los Ángeles Hernández Vilachá
Director:	Dr. Andrés Felipe Cardona Mendoza
Codirector/ Asesor metodológico:	Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara/Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor y análisis estadístico:	Dra. Gloria Ines Lafaurie Villamil

“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”.

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

TIANA CIAN LEAL	Presidente del Claustro
CAMILO ALBERTO ESCOBAR JIMÉNEZ	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
FRANCISCO PEREIRA MANRIQUE	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
	Pág.
Introducción	
2. Marco teórico	5
3. Justificación	18
4. Situación Actual	20
5. Objetivos	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. Hipótesis del estudio	25
7. Metodología del Proyecto	26
7.1. Tipo de estudio	26
7.2. Métodos y técnicas para la recolección de la información (Materiales y métodos)	26
7.3. Plan de tabulación y análisis.	29
8. Consideraciones éticas.	30
9. Resultados	31
10. Discusión	36
11. Conclusiones	40
12. Referencias bibliográficas	41

LISTADO DE TABLAS

		Págs.
Tabla 1	Componentes para preparación de extracción de RNA por medio del kit "RT Luna Universal Master Mix"	28

LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
Figura 1	Viabilidad de células no tumorales (fibroblastos gingivales humanos) y células HeLa tratadas con los extractos de <i>S. chinensis</i> y <i>P. lobata</i> . Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.	31
Figura 2	Actividad transcripcional de oncogenes E6 y E7 en células HeLa estimuladas con los extractos de <i>S. chinensis</i> y <i>P. lobata</i> a concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/mL por un periodo de 24 horas. Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.	33
Figura 3	Evaluación de la distribución del ciclo celular de células HeLa estimuladas los extractos de <i>S. chinensis</i> y <i>P. lobata</i> . Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.	34
Figura 4	Expresión génica de BCL-2, E2F-1 y p53 de células HeLa tratadas con los extractos <i>S. chinensis</i> y <i>P. lobata</i> . Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.	35

RESUMEN

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE *Pueraria lobata* Y *Schisandra chinensis* EN QUERATINOCITOS TUMORALES TRANSFORMADOS POR VPH-18

Antecedentes: La infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV) es un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias malignas como el cáncer oral (CO). *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis* son plantas utilizadas en la medicina tradicional china, las cuales han demostrado poseer efectos antitumorales en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, no se ha evaluado su efecto sobre la expresión de los oncogenes del VPH y su impacto sobre queratinocitos transformados.

Objetivo: Evaluar el efecto citotóxico y anti-proliferativo de *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis* sobre queratinocitos tumorales transformados por VPH-18. **Materiales y métodos:**

Se evaluó la citotoxicidad de ambos extractos sobre células HeLa tratadas en un rango de concentraciones entre 0 – 5000 ug/mL. Se evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo de resazurina. Se determinaron cambios en la expresión génica de las oncoproteínas E6 y E7 y de los genes Bcl-1, E2F-1 y p53 sobre células HeLa al ser estimuladas por ambos extractos a concentraciones de 0.1, 1 y 10 ug/mL durante 24 y 48 horas por medio de PCR en tiempo real (q-PCR). Se evaluó la distribución en el ciclo celular de células HeLa tratadas con ambos extractos a concentraciones de 0.1, 1 y 10 ug/mL durante 24 y 48 horas por medio de citometría de flujo. **Resultados:** Los extractos de *P. lobata* y *S. chinensis* no poseen efecto citotóxico sobre células HeLa a las concentraciones evaluadas. Las concentraciones inhibitorias 50 (IC50) estuvieron para *P. lobata* en 3294 ug/ml y *S. chinensis* en 1478 ug/ml. El extracto de *P. lobata* inhibe la expresión génica de E6 a 0.1 y 10 ug/ml a 24 horas de estímulo.

El extracto de *S. chinensis* inhibe la expresión génica de E6 a 1 ug/ml a 48 horas de estímulo. Ambos extractos aumentan la expresión de Bcl-2, E2F-1 y p53 a 0.1 y 10 ug/ml. El extracto de *P. lobata* a 0,1 y 10 µg/mL a 24 horas de estímulo y de *S. chinensis* a 0,1 µg/mL a 48 horas poseen un efecto antiproliferativo mediante la detención del ciclo celular en las fases G0/G1 y S respectivamente sobre células HeLa.

Conclusión: Los extractos *P. lobata* y *S. chinensis* poseen efecto antiproliferativo sobre células HeLa. Investigaciones futuras son necesarias para determinar a qué compuesto de los extractos evaluados se le atribuyen estos efectos.

Palabras claves: Células HeLa, Cáncer oral, Pueraria, Schisandra.

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF THE EFFECT OF *Pueraria lobata* AND *Schisandra chinensis* ON TUMOUR KERATINOCYTES TRANSFORMED BY HPV-18

Background: The infection due to human papilloma virus is of high risk (HR-HPV) for the development of malign oral neoplasia (OC). *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis* are plants used in traditional Chinese medicine which have shown anti-tumour effects in different types of cancer. However, their effect has not been evaluated on the expression of HPV oncogenes and their impact on transformed keratinocytes. **Objective:** to evaluate the cytotoxic and anti-proliferative effect of *Pueraria lobata* and *Schisandra chinensis* on transformed tumour keratinocytes by HPV-18. **Materials and methods:** The cytotoxicity of both extracts on HeLa cells treated with a range of concentrations from 0 ug/mL. to 5000 ug/mL. was evaluated. Viability was assessed by means of the resazurin trial. Gene expression changes of the E6 and E7 oncoproteins and Bcl-1, E2F-1 and p53 genes were determined on HeLa cells stimulated by both extracts with concentrations of 0.1 ug/mL and 10 ug/mL during 24 hours and 48 hours by means of real-time PCR (q-PCR). Distribution of the HeLa cellular cycle treated with both extracts with concentrations of 0.1 ug/mL and 10 ug/mL during 24 hours and 48 hours by means flow cytometry. **Results:** The extracts of *P. lobata* y *S. chinensis* with the evaluated concentrations do not present a cytotoxic effect on HeLa cells. Inhibiting concentrations 50 (IC50) for *P. lobata* were 3294 ug/ml and *S. chinensis* were 1478 ug/ml. The *P. lobata* extract inhibits gene expression of E6 at 0.1 ug/ml and 10 ug/ml 24 hours after stimulation. *S. chinensis* inhibits gene expression of E6 with 1 ug/ml 48 hours after

stimulus. Both extracts increase the expression of Bcl-2, E2F-1 and p53 with 0.1 ug/ml and 10 ug/ml. The *P. lobata* with 0.1 ug/ml and 10 µg/mL 24 hours after stimulus and *S. chinensis* with 0.1 µg/mL 48 hours after present an anti-proliferative effect by means of cellular cycle detection in the G0/G1 and S phases respectively. **Conclusion:** The *P. lobata* y *S. chinensis* possess an anti-proliferative effect over HeLa cells. Future research is necessary in order to determine which compound has the mentioned effects.

Key words: HeLa cells, oral cancer, *Pueraria*, *Schisandra*.

1. Introducción

El virus del papiloma humano (VPH) perteneciente a la familia Papillomaviridae (Chan et al., 2019) es un virus de ADN de doble cadena, epiteliotrópico, que infecta la piel, el tracto anogenital, y/o la mucosa oral, con un diámetro de 52-55 nm y un genoma de 8000 pb de tamaño que codifica aproximadamente ocho o nueve marcos de lectura abiertos (ORF) (Tumban, 2019). Cada ORF se divide en tres partes funcionales: la región temprana (E), la región tardía (L) y la región de control larga (LCR). Las proteínas del VPH E6 y E7 se consideran sus principales oncoproteínas (de Sanjosé et al., 2018(Yakin et al., 2019); Lafaurie et al., 2018), ya que, desempeñan su papel principal en el proceso carcinogénico a través de la inhibición del supresor de tumores p53 y la proteína del retinoblastoma (pRB) respectivamente (Yeo-Teh et al., 2018).

La unión de E7 a pRB induce la degradación de esta última, dando como resultado la liberación y activación del factor de transcripción E2F-1, el cual promueve el ciclo celular llevando a la célula de la fase G1 a la fase S (Pal & Kundu, 2020). Por otro lado, la oncoproteína E6 induce la degradación de p53 evitando así la apoptosis del queratinocito infectado, y en conjunto con E7, sometiendo a la célula a la progresión constante y descontrolada del ciclo celular (Lafaurie et al., 2018; Pal & Kundu, 2020). De igual forma, en esta progresión del ciclo celular la expresión de reguladores anti-apoptóticos como BCL-2 que inhiben a reguladores pro-apoptóticos como BAX/BAD que son claves en la formación y supervivencia de células tumorales (Brahmbhatt et al., 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud el VPH constituye la infección de transmisión sexual más común en todo el mundo (You et al., 2019). Dependiendo de su potencial oncogénico los subtipos de VPH se han dividido en virus de alto riesgo (VPH-HR) y de bajo riesgo (VPH-LR). Los VPH-HR están asociados con el desarrollo de cáncer y se denominan tipos virales "oncogénicos", según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (de Sanjosé et al., 2018). Los subtipos de alto riesgo 16 (VPH-16) y 18 (VPH-18) se han asociado particularmente con carcinoma cervical, orofaríngeo y de cavidad oral (Lafaurie et al., 2018; Yakin et al., 2019).

Entre las diversas causas de neoplasias malignas del cuello uterino, se sabe que la infección persistente por algunos tipos de VPH oncogénico es el mayor factor de riesgo de cáncer cervical (Kim, 2016; Chan et al., 2019) y si bien la incidencia de este tipo de cáncer ha ido disminuyendo en los países industrializados, la incidencia del VPH en los cánceres de orofaringe y de cavidad oral ha aumentado en los últimos 20 años (Perdomo-Lara et al., 2020).

El cáncer oral (CO) es una neoplasia maligna que surge en el labio o en la cavidad oral que en el 90% de los casos es de origen epitelial definido como carcinoma escamocelular oral (OSCC) (Rivera, 2015). Con respecto a la distribución anatómica del CO, los 5 sitios más comunes son la lengua (25,4%), la mucosa labial / bucal (21,7%), la encía (14,0%), el paladar (9,9%) y Mucosa alveolar (7,9%), respectivamente (Dhanuthai et al., 2018). El CO se clasifica dentro de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) siendo el séptimo tipo de cáncer en causar más muertes a nivel mundial (Kim, 2016). El CO es más frecuente en hombres que en mujeres en la mayoría de los grupos étnicos (Singhvi et al., 2017). A nivel mundial el CO y de labio es el catorceavo tipo de cáncer más prevalente en el mundo (913,514 casos a 5 años). En el 2018 se reportó una incidencia de este tipo de cáncer 354 864 casos y una mortalidad de 177 384 casos (World Health Organization. Global Health Observatory, 2018). En Colombia se presenta el 5.5% de los casos de CO y de labio en América Latina (2,260 casos en 5 años), con una incidencia de 845 casos y un con un estimado número de muertes de 354 casos en el 2018 (World Health Organization. Global Health Observatory, 2018). Además, siguen siendo muy preocupante las cifras de sobrevivencia de un paciente con CO, ya que, un individuo bajo tratamiento tiene un 40% de sobrevivencia a 5 años, lo cual es una cifra muy baja y no ha mejorado a lo largo de los años (Singhvi et al., 2017).

En la actualidad las personas que sufren de CO reciben tratamientos convencionales que son la resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia (Wong, 2014). Sin embargo, las potenciales repercusiones funcionales, estéticas, emocionales y psicológicas resultantes de estos tratamientos impactan significativamente la calidad de vida de los pacientes (Rudat & Wannemacher, 2001), ya que, deben enfrentarse a complicaciones como la mucositis oral, hiposalivación, osteoradionecrosis, fibrosis tisular, morbilidad por resecciones mandibulares, desfiguración y pérdida de la función (Turner, 2013). Sin contar con el impacto emocional y psicológico que conllevan estas secuelas.

Por tanto, es necesario encontrar nuevas alternativas de tratamiento que funcionen como sinérgicas a los tratamientos actuales o idealmente como opción de reemplazo con menores efectos secundarios o que idealmente no los tengan. En este contexto, los productos naturales son candidatos ideales porque tienen un efecto promisorio en el tratamiento contra el cáncer debido a que poseen bajos efectos citotóxicos en las células sanas.

Pueraria lobata (*P. lobata*) también conocida como kudzu root, es una planta principalmente utilizada en la cultura oriental. Uno de sus compuestos, la puerarina se ha convertido en un agente oncoterapéutico, ya que, ha mostrado tener efectos apoptóticos dosis-dependiente en modelos de células HT-29 (cáncer de colon), presumiblemente por su efecto en la expresión de genes asociados a apoptosis, como lo son el incremento de BAX y la disminución de c-Myc y BCL-2. (Yu et al., 2004). La puerarina también ha mostrado tener un efecto inhibitor en la viabilidad celular en un modelo *in vitro* de células tumorales de riñón por medio del arresto en el ciclo celular en fases G0/G1 e induciendo apoptosis a causa de la regulación negativa de proteínas en la vía de señalización celular mTOR/p70S6K (Jiang et al., 2018), la cual involucra procesos como crecimiento y metabolismo celular, proliferación, motilidad, supervivencia celular, y síntesis de proteínas (Xiao et. Al., 2009). Igualmente se ha demostrado el efecto antitumoral de este compuesto por la supresión en la expresión de BCL-2 y p-AKT y el aumento en la expresión de BAX y caspasa-3 activada en células U251 (glioblastoma humano) (Yang et al., 2015).

Por otra parte, *Schisandra chinensis* (*S. chinensis*) es una planta reconocida en la medicina tradicional china y también en la medicina moderna oriental (Szopa et al., 2017). Dentro de sus lignanos más evaluados por su efecto antitumoral se encuentra la gomisina A, el cual ha demostrado generar arresto en el ciclo celular en células HeLa mediado por la sobreexpresión de TNF- α (Waiwut et al., 2012); la gomisina N, el cual ha mostrado inducir apoptosis en células de leucemia humana U973 en ensayos *in vitro* al igual que en células de hepatoma humano por medio del incremento en los niveles de expresión de las proteínas BAX y BCL-2 (Yim et al., 2009) y la deoxischizandrina cuyo efecto antitumoral se ha evaluado en líneas celulares de cáncer de ovario humano (A2780, SKOV3, and OVCAR3), en donde ha mostrado inducir arresto del ciclo celular en fase G0/G1 e inhibición de la expresión de ciclina E (Lee et al., 2018).

Tanto *P. lobata* como *S. chinensis* tienen potencial terapéutico en el tratamiento contra el cáncer, sin embargo, el efecto de estos extractos sobre los oncogenes del VPH y su impacto en queratinocitos transformados no se ha evaluado aún, por tanto, nos preguntamos ¿Cuál es el efecto de *P. lobata* y *S. chinensis* sobre queratinocitos tumorales transformados con VPH-18?. La finalidad de este trabajo es aportar en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para el cáncer inducido por VPH como el CO y cervical.

2. Marco teórico

2.1. Virus del papiloma humano (VPH)

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el causal de una de las infecciones de transmisión sexual con mayor distribución en el mundo. Es estrictamente epiteliotrópico e infecta las células del estrato basal de epitelios escamosos estratificados en la piel y las membranas mucosas, causando lesiones que incluyen verrugas comunes y neoplasia invasiva (Kreimer et al., 2005). La infección por VPH se considera una enfermedad de transmisión sexual y las prácticas sexuales en la población más joven podrían aumentar el riesgo de infecciones orales asociadas al VPH (Gayar et al., 2014).

En el último siglo se han identificado más de 200 genotipos de VPH y se han agrupado en diferentes géneros (papilomavirus Alfa, Nu / Mu, Beta y Gamma) según la estructura del genoma viral y el tropismo de los tejidos epiteliales humanos (Jeannot et al., 2019). El género Alpha incluye genotipos que se han descrito como causantes de cáncer, se sabe que son responsables del 5% de los casos de cáncer en todo el mundo (Pal & Kundu, 2020), mientras que los cursos de infección por el virus del papiloma Beta y Gamma son generalmente asintomáticos, pero los estados de inmunosupresión (es decir, injerto de órganos, infección por VIH, trastorno de la epidermodisplasia verruciforme, entre otros) pueden provocar que estos tipos produzcan papiloma cutáneo o aumentar la predisposición al cáncer de piel (de Sanjosé et al., 2018).

En función de su potencial actividad oncogénica, los subtipos de VPH se han dividido en virus de alto riesgo (HPV-HR) y de bajo riesgo (HPV-LR). HPV-HR están asociados con el desarrollo de cáncer y se denominan tipos virales "oncogénicos" según la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (de Sanjosé et al., 2018; Lafaurie et al., 2018). HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 son HPV-HR; los tipos 16 y 18 se han asociado particularmente con el carcinoma cervical, la neoplasia ano-genital y las lesiones orofaríngeas (Lafaurie et al., 2018). Los tipos de bajo riesgo, como el VPH 6, 11, 42, 43 y 44, se asocian con lesiones epiteliales benignas (de Sanjosé et al., 2018; Lafaurie et al., 2018).

El genoma del VPH se compone de un pequeño ADN de doble cadena con un diámetro de 52-55 nm y un genoma de 8000 pb que codifica aproximadamente ocho o nueve marcos de

lectura abiertos (ORF) (Tumban, 2019; Chan et al., 2019). Cada ORF se divide en tres partes funcionales: la región temprana (E), la región tardía (L) y la región de control larga (LCR) (de Sanjosé et al., 2018; Lafaurie et al., 2018). Hay seis proteínas tempranas, tres proteínas reguladoras (E1, E2 y E4) y tres oncoproteínas (E5, E6 y E7) codificadas en 4000 pares de bases (bp) que participan en la replicación viral y la transformación de la célula. Otra región de 3000 pb de la molécula de ADN codifica dos proteínas estructurales L1 y L2 que componen la cápside del virus. La replicación del ADN viral y los elementos reguladores de la transcripción están controlados por una región de control larga (LCR) que está codificada en una región de 1000 pb (Chan et al., 2019).

Las proteínas E6 y E7 se consideran oncoproteínas asociadas con carcinogénesis (de Sanjosé et al., 2018; Lafaurie et al., 2018), ya que desempeñan su papel a través de la inhibición del supresor de tumores p53 y la activación de pRB (Yeo-Teh et al., 2018), respectivamente. En la carcinogénesis la oncoproteína E7 se une a todos los miembros de la familia RB e induce su degradación dando como resultado la liberación y activación del factor de transcripción E2F-1 y la desregulación del ciclo celular en el punto de control G1/S, lo cual aumenta la proliferación celular (Pal & Kundu, 2020). La familia de factores de transcripción E2F juega un papel en la progresión del ciclo celular a la fase S, se dividen funcionalmente en represores (E2F-4 y E2F-5) y activadores transcripcionales (E2F-1, E2F-2 y E2F-3) (Ren et al., 2002). Por otro parte, E6 induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, evitando la regulación del ciclo celular, la apoptosis y reparación del ADN (Lafaurie et al., 2018; Pal & Kundu, 2020).

La familia BCL-2 que se divide en una subfamilia anti-apoptótica y pro-apoptótica, además de su función bien establecida en el control de la supervivencia celular BCL-2 puede, mediante un mecanismo indeterminado, retrasar la entrada en el ciclo celular (Vairo et al., 2000). BAX es un miembro pro-apoptótico de la familia de genes BCL-2 que regula la muerte celular programada, puede acelerar la entrada del ciclo celular en las células T y recientemente se ha demostrado que tiene una función supresora de tumores, así como portadoras de mutaciones en ciertos cánceres (Brahmbhatt et al., 2016).

La infección por VPH se considera una enfermedad de transmisión sexual, y algunas prácticas sexuales como el número de parejas sexuales por vida y el número de parejas sexuales orales

se han asociado con la transmisión del VPH a la mucosa oral y pueden aumentar el riesgo de infecciones orales por VPH y generar cambios importantes en el epitelio oral que aumentan el riesgo de carcinogénesis (Perdomo-Lara et al., 2020). Recientemente, se han informado o propuesto otras vías de transmisión oral no sexual (Tumban, 2019), se ha detectado el VPH en la mucosa oral de hombres y mujeres, sin antecedentes de sexo oral, que tuvieron ≥ 10 besos profundos en la vida o ≥ 5 besos profundos en un año. Por lo tanto, los besos profundos se asocian con la transmisión oral del VPH. Se ha estimado que el 80% de la población mundial se ha infectado con al menos un tipo de VPH en algún momento de su vida (Sher et al., 2020). Por otro lado, el número de infecciones asociadas a VPH se han incrementado en los últimos años en personas jóvenes (Gillison et al., 2015).

Se sabe que el VPH está asociado con varios tipos de cáncer contribuyendo aproximadamente en un 18-20%, incluidos los cánceres de cuello uterino, vulva, vagina, pene, ano y cabeza y cuello (You et al., 2019). La asociación entre la infección por VPH y el cáncer de cuello uterino se ha demostrado claramente, se ha informado sobre el VPH en el 78.1% -92.6% de las mujeres con cáncer cervical de alto grado lesiones, y 86.6% -98.2% de cánceres de cuello uterino están específicamente asociados con VPH 16/18 (Lafaurie et al., 2018). Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, los estudios más recientes muestran que la prevalencia del VPH genital en adultos de 18 a 59 años es aproximadamente del 45,2% en hombres y del 39,9% en mujeres (Dyne et al., 2018).

Si bien la incidencia del cáncer de cuello uterino ha ido disminuyendo en los países industrializados, la incidencia del VPH en los cánceres de orofaringe y de cavidad oral ha aumentado durante los últimos 20 años (Migueláñez-Medrán et al., 2019) de manera significativa (You et al., 2019). Se ha informado un aumento de los casos de cánceres asociados al VPH y un aumento sostenido de nuevos casos de carcinoma de células escamosas de orofaringe (OPSCC) y carcinoma de células escamosas de la boca (COCE) se asociará con el VPH en el futuro y será un problema importante de salud pública (Perdomo-Lara et al., 2020).

Los datos publicados en 1982-1997 y 94 estudios publicados en 2005 informaron la prevalencia de OSCC como 46.5%. El VPH tuvo 4,7 veces más probabilidades de ser detectado en el carcinoma oral que en la mucosa normal, y la probabilidad de detectar VPH de alto riesgo en OSCC fue 2.8 veces mayor que la del VPH de bajo riesgo (Lafaurie et al., 2018).

Un aumento en la transmisión oral del VPH conduce en última instancia a un aumento de la infección de la región de la cabeza y el cuello, se ha informado un alto número de infecciones por VPH en la región de la cabeza y el cuello en hombres en comparación con mujeres. Esto probablemente se deba a que un gran número de hombres que practican sexo oral a parejas infectadas con el VPH. Por lo tanto, el sexo oral se asocia con la mayoría de los casos de infección por VPH en la región de la cabeza y el cuello (Tumban, 2019).

2.2. *Cáncer oral (CO)*

El término CO se denomina un subgrupo de neoplasias malignas de cabeza y cuello que afectan a los labios, los dos tercios anteriores de la lengua, las glándulas salivales, la encía, el suelo de la boca, la superficie de la mucosa oral y el paladar, siendo la lengua la ubicación más común (Migueláñez-Medrán et al., 2019). Siendo el carcinoma de células escamosas el tipo histológico más prevalente en un 90%. Tiene diferentes niveles de diferenciación y una propensión a metástasis en los ganglios linfáticos (Rivera, 2015).

Con respecto a la distribución anatómica del CO, los 5 sitios más comunes en orden descendente de frecuencia, fueron; la lengua (25,4%), la mucosa labial/bucal (21,7%), la encía (14,0%), el paladar (9,9%) y mucosa alveolar (7,9%), respectivamente (Dhanuthai et al., 2018).

Los factores etiológicos más frecuentes para el desarrollo de esta neoplasia incluyen el consumo de tabaco, de hoja de betel, consumo de alcohol, una dieta pobre en frutas y verduras frescas, agentes infecciosos (Candida, virus, sífilis), deficiencia inmunológica y, exposición a la luz solar. Además, se ha relacionado el origen étnico, la predisposición familiar y genética, el uso de enjuagues bucales, (Kumar et al., 2016), traumatismos crónicos con dientes o dentaduras postizas e higiene bucal deficiente implicados en el desarrollo de este tipo de cáncer. Hasta hace poco, se pensaba que aproximadamente el 20% de los cánceres orales y el 60% al 80% de los cánceres de orofaringe eran atribuibles a la infección por VPH. En 2012, la IARC declaró que había suficiente evidencia para asociar un subtipo de VPH 16 con cánceres orales (Mandlik et al., 2018).

A nivel mundial el CO y de labio es el catorceavo tipo de cáncer más prevalente en el mundo (913,514 casos a 5 años). En el 2018 se reportó una incidencia de este tipo de cáncer 354 864 casos y una mortalidad de 177 384 casos (World Health Organization. Global Health

Observatory, 2018). En Colombia se presenta el 5.5% de los casos de CO y de labio en América Latina (2,260 casos en 5 años), con una incidencia de 845 casos y un con un estimado número de muertes de 354 casos en el 2018 (World Health Organization. Global Health Observatory, 2018).

El CO es dos o tres veces más frecuente en hombres que en mujeres en la mayoría de los grupos étnicos. En informes mundiales, los cánceres de todas las regiones de la cavidad oral y la faringe se agrupan y representan colectivamente el sexto cáncer más común en el mundo. Según los últimos informes de la IARC para el CO Código CIE-10 C00-08: Labio, Cavidad Oral) que incluye labios, lengua, encía, suelo de la boca, glándulas parótida y salival, la incidencia anual es más alta en todo el mundo, más de 300,000 casos diagnosticados, y la mortalidad anual es alrededor de 145,000 muertes. La supervivencia a cinco años de los pacientes con CO temprano está entre el 55% y el 60% y disminuye a 30% y 40% en los casos de CO avanzado (Singhvi et al., 2017).

2.3. Tratamientos convencionales para cáncer oral

Las modalidades de tratamiento contra el cáncer más comunes incluyen la resección quirúrgica, quimioterapia, radioterapia y trasplantes de células madres hematopoyéticas (HSCT), una forma de inmunoterapia, la cual se administra por sí sola o combinada con otras terapias (Wong, 2014). Para los estadios avanzados del cáncer (estadio III y IV) la terapia estándar consiste en cirugía y radioterapia postoperatoria, o únicamente radioterapia en el manejo de cánceres irresecables. Sin embargo, las potenciales repercusiones funcionales, estéticas y psicológicas resultantes de estos tratamientos impactan significativamente la calidad de vida de los pacientes (Rudat & Wannemacher, 2001). Los pacientes que logran sobrevivir al CO deben enfrentarse a complicaciones como la mucositis oral, hiposalivación, osteoradionecrosis, fibrosis tisular, morbilidad por resecciones mandibulares, desfiguración y pérdida de la función (Turner, 2013).

2.4. Productos naturales para tratamiento de cáncer oral

Las plantas se han utilizado para tratar diversas enfermedades desde tiempos inmemoriales. El Ayurveda, la Medicina Tradicional India y la Medicina Tradicional China siguen siendo las tradiciones más antiguas (4500 a. C.) que aún viven. El sistema de folclore ha documentado

todos los parámetros sobre los medicamentos y sus usos específicos en las condiciones de la enfermedad. Estos medicamentos se prepararon como tinturas, tés, polvos, cataplasmas, decocciones y otros tipos de formulaciones que fueron los métodos más comunes de preparación de medicamentos hasta el siglo XVIII. Durante muchos años, las plantas naturales se han utilizado en nutrición, producción de alimentos y medicina (Ogbonna et al., 2012; Fridlender et al., 2015).

Con los avances en la química orgánica y el análisis químico, a finales del siglo XVIII o principios del XIX se llevó a cabo una investigación analítica de componentes activos de plantas medicinales y remedios herbales, lo que abrió las puertas al aislamiento/purificación y caracterización de numerosos principios activos de plantas. Esto aumentó el ritmo del descubrimiento de fármacos y condujo a una innovación milagrosa en el campo médico. El primer avance que lanzó la primera generación de fármacos se produjo con el aislamiento de los fármacos analgésicos; la morfina de la planta *Papaver somniferum*. Más tarde, muchos fármacos bien definidos del siglo XX se derivaron de plantas, incluido el ácido salicílico, el precursor de la aspirina (*Salix sp.*), La cocaína (*Erythroxylum coca*), la quinina (*Cinchona officinalis*), la digitoxina (*Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*) y muchos otros con potencial farmacéutico y clínico. Esto en sí mismo demuestra el enorme potencial medicinal de las plantas que se conoce desde hace miles de años en la medicina tradicional (Newman et al., 2000; Butler, 2004; Ogbonna et al., 2012).

Muchos de estos productos naturales contienen una serie de compuestos con actividad antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativa y anticancerosa (Saleh et al., 2017), por lo que ha surgido un interés en el desarrollo de medicamentos que superen los problemas de los tratamientos convencionales para el cáncer mencionados anteriormente mediante el uso de compuestos naturales, que pueden afectar a múltiples objetivos con efectos secundarios reducidos. Los compuestos naturales de diversas fuentes, incluyendo plantas, animales y microorganismos, ofrecen una gran oportunidad para el descubrimiento de nuevos candidatos terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Aung et al., 2017), mediante la modulación de diferentes vías, incluido el estrés oxidativo, la apoptosis extrínseca e intrínseca, el ciclo celular, la inflamación (Choudhari et al., 2020) interrumpiendo la diferenciación, proliferación celular, angiogénesis y metástasis (Amin et al., 2009; Nobili et al., 2009; Huang et al., 2010). Por lo que se están volviendo importantes para el descubrimiento y la

investigación de nuevos fármacos y se ha descubierto que estos fitoquímicos son eficaces contra varios tipos de cáncer demostrando tal eficacia alternando el inicio, desarrollo y progresión del cáncer (Sadhukhan et al., 2018; Dutta et al., 2019). De hecho, muchos agentes quimioterapéuticos actualmente en uso, incluyendo topotecan, etopósido, tenipósido, docetaxel y paclitaxel, se derivan de orígenes herbales (Saleh et al., 2017).

El desarrollo de una terapia anticancerosa basada en fitoquímicos eficaz y libre de efectos secundarios comienza con la prueba de extractos naturales (de material vegetal seco/húmedo) para determinar la posible actividad biológica contra el cáncer, seguida de la purificación de fitoquímicos activos basada en el fraccionamiento guiado por bioensayo y la prueba in vitro. y efectos in vivo (Choudari et al., 2019).

Se ha informado que los compuestos naturales son capaces de matar no solo a las células cancerosas, sino también de restaurar la sensibilidad a los medicamentos. Además, existe evidencia de que los compuestos naturales pueden radiosensibilizar el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Wu et al., 2016), los mecanismos de los compuestos naturales que actúan como adyuvantes quimioterapéuticos podrían resumirse en tres enfoques: potenciar directamente el efecto tumoricida (sensibilizar a las células cancerosas para que respondan más a los fármacos quimioterapéuticos), revertir la quimiorresistencia (disminuir la salida del fármaco o superar otro mecanismo para aumentar la acumulación de fármacos quimioterapéuticos en células cancerosas), y reducir la toxicidad inducida por fármacos quimioterapéuticos (promover el mecanismo de reparación en las células normales contra el daño de los fármacos quimioterápicos) (Lin et al., 2020).

Después de demostrar actividad anticancerígena como monoterapia, los compuestos naturales podrían mejorar aún más su aplicación al ser adyuvantes quimioterapéuticos o fármacos cooperantes en la terapia de combinación. El uso de la medicina tradicional china o la medicina tradicional a base de hierbas como adyuvante quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas o el cáncer gástrico podría mejorar la calidad de vida de los pacientes, mejorar la mielosupresión y posiblemente reducir la mortalidad (Wu et al., 2016; Hou et al., 2017), tres metaanálisis que revisa la medicina tradicional a base de hierbas han encontrado productos que se utilizan como adyuvantes quimioterapéuticos en los tratamientos del cáncer de nasofaringe, mama y páncreas (Kim et

al., 2015a; Kim et al., 2015b; Kuo et al., 2018). Además, se ha postulado que las combinaciones de fármacos que incluyen suplementos dietéticos y productos naturales tienen efectos similares a los fármacos quimioterapéuticos convencionales, pero con menos efectos adversos (Lin et al., 2017).

Se han realizado varios ensayos clínicos para evaluar el efecto potenciador de productos naturales en la promoción de la quimioterapia convencional contra varios cánceres, incluido el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, y cáncer de colon y existen pruebas que sugieren que son eficaces contra la recurrencia del cáncer y la metástasis y pueden mejorar la calidad de vida y prolongar el tiempo de supervivencia (Lin et al., 2020).

Varios estudios preclínicos informaron que los compuestos fenólicos naturales además de tener actividad contra el cáncer tienen efecto contra el VPH. Los fenoles de las plantas juegan un papel importante en la prevención del cáncer. La curcumina es un polifenol extraído de la especia de la comida cúrcuma. Numerosos informes científicos han demostrado que la curcumina tiene actividad anticancerígena y se dirige a numerosas vías oncogénicas. La curcumina elimina varias líneas celulares de carcinoma cervical VPH positivo y no es tóxica para el tejido sano. El resveratrol es un polifenol que se encuentra en las uvas, también es un potente antioxidante con propiedades antiinflamatorias y preventivas del cáncer. Los estudios informaron que tanto la curcumina como el resveratrol mostraron efectos sinérgicos con la terapéutica del cáncer. El galato de epicatequina es una de las principales catequinas del té verde y también ha demostrado actividad contra el cáncer en una variedad de tipos de células. TriCurin, una combinación de triple polifenol que consiste en curcumina, galato de epicatequina y resveratrol en proporciones estequiométricas específicas, para maximizar la actividad antitumoral. Se ha demostrado en estudios que TriCurin puede ser un tratamiento terapéutico prometedor para los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello positivos para el VPH (Piao et al., 2017). Sin embargo, se necesita aumentar los esfuerzos en la búsqueda de más productos naturales.

Esto sugiere que los productos naturales son opciones prometedoras para mejorar la eficiencia del tratamiento en pacientes con cáncer y disminuir las reacciones adversas (Wu et al., 2016).

2.5. *Pueraria lobata* (*P. lobata*)

P. lobata (Willd), llamada también Kudzu root y Gegen (Yang et al., 2015, Wang et al., 2020) es una enredadera leguminosa perenne del género *Pueraria* nativa del sudeste asiático (Yang et al., 2015), se distribuye ampliamente en las regiones templadas del Lejano Oriente de Asia, incluyendo Corea, Japón, China e India, y es una de las primeras y más importantes hierbas crudas comestibles en la medicina oriental tradicional (Jin et al., 2012). Se ha utilizado en la cocina y en la práctica clínica en la medicina tradicional china durante más de dos mil años. Ha mostrado una amplia variedad de propiedades medicinales y ha sido utilizado como agente antipirético, antidiarrético, diaforético, antiemético (Yang et al., 2015), para resfriados y tos, (Wang et al., 2020), se ha usado principalmente para controlar la fiebre, la diarrea y la diabetes (Lin et al., 2013). Existen varias actividades farmacológicas para apoyar sus aplicaciones clínicas modernas en enfermedades cerebrovasculares, enfermedades cardiovasculares e hiperlipidemia. Toda la planta es comestible, sin embargo, los beneficios para la salud de *P. lobata* provienen de sus flores y raíces, que contienen muchos productos naturales, como isoflavonas y saponinas. En Asia, el extracto de raíz de *P. lobata* se encuentra a menudo en productos alimenticios, bebidas, así como en jabones y lociones como agente antimicrobiano. La composición química de *P. lobata* difiere según el origen geográfico y el método de extracción. El extracto de raíz de *P. lobata* también se ha relacionado con mejoras en el metabolismo de la glucosa, regeneración neuronal, prevención de accidentes cerebrovasculares, inflamación, reducción del estrés y daño oxidativo, migrañas y la osteonecrosis (Mediouni et al., 2018; Ahn et al., 2019). También se ha informado que el extracto tiene actividad antidipsotrópica (Jeon et al., 2005). Dados sus antioxidantes inherentes (Guerra et al., 2000), la hierba es popular para el consumo en el tratamiento de la hipertensión (Qicheng, 1980) y el alcoholismo (Lin & Li, 1998) y ha demostrado ser antiinflamatorio (Keung & Vallee, 1998). La raíz de *P. lobata* es una potente fuente de fitoestrógenos con actividad biológica similar al estrógeno, hay tres clases principales de fitoestrógenos en las plantas o en sus semillas: isoflavonas, cumestanos y lignanos. Una sola planta a menudo contiene más de una clase de fitoestrógeno. Se ha sugerido que los principales componentes estrogénicos de la raíz de *P. lobata* son: puerarina, daidzin (previene el desarrollo del cáncer), genistin (agente antibacteriano y antileucémico), daidzein (agente antimicrobiano y antiinflamatorio) (Yang et al., 2015; Zhang et al., 2018; Ahn et al., 2019). Los

isoflavonoides exhiben una amplia gama de actividades biológicas; tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antihipertensivas, antiarrítmicas, espasmolíticas y quimiopreventivas del cáncer (Jiang et al., 2018). Es bien sabido que los efectos beneficiosos sobre la salud de los isoflavonoides se deben a sus propiedades antioxidantes y fitoestrogénicas (Cos & Apers., 2003). Los efectos cardiovasculares de esta planta se ejercen en parte a través de sus propiedades antioxidantes y anti-peroxidación lipídica. Además, también se han aislado de sus raíces varias saponinas, triterpenoides y compuestos fenólicos (Hirakura et al., 1997). *P. lobata* se ha vuelto comercialmente disponible recientemente en suplementos dietéticos occidentales para los síntomas de la menopausia. Se ha informado que las isoflavonas en *P. lobata*, como puerarina, tienen actividades estrogénicas y anticancerígenas (Ahn et al., 2019). Puerarina es el principal ingrediente bioactivo derivado de la raíz de *P. lobata* (Yang et al., 2015). Puerarina se aisló de *P. lobata* a finales de la década de 1950, desde entonces, sus propiedades farmacológicas se han investigado ampliamente. Se ha utilizado ampliamente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, trastornos cerebrovasculares, cáncer, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, diabetes, osteoporosis y lesión hepática (Gan & Yin, 2014; Mediouni et al., 2018). Actualmente, existen tres formas de dosificación principales de puerarina para aplicaciones clínicas, es decir, inyección, tableta y cápsula (Fong et al., 2007). La forma de inyección ha sido aprobada por la Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China (Hou et al., 2017). Durante las últimas décadas, ha habido una gran cantidad de investigación sobre los efectos farmacológicos de puerarina (Mediouni et al., 2018), fue aprobado para el tratamiento clínico en 1993 por el Ministerio chino de Health, y se ha utilizado inicialmente para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, posteriormente se informó que tiene actividad anticancerígena (Gan & Yin, 2014). Se ha evidenciado su efecto en células de glioblastoma humano (Yang et al., 2015), actividad antitumoral de puerarina contra el linfoma de células del manto humano (Gan & Yin, 2014), en cáncer de vejiga (Jiang et al., 2018), en cáncer de colon (Yu & Li, 2006), y en cáncer de esófago (Wang et al., 2014).

2.6. *Schisandra chinensis* (*S. chinensis*)

S. chinensis (*Schisandra berries*) (Lee et al., 2018), es una planta cuyos frutos tienen un uso prolongado en la medicina tradicional china y también en la medicina china moderna (Szopa et al., 2017) como sustancia alimenticia y hierba medicinal (Lee et al., 2018). Chinese

Magnolia, como se le llama comúnmente, tiene muchas actividades biológicas beneficiosas (Nowak et al., 2019), se considera una medicina herbal tradicional para el tratamiento y alivio de una variedad de enfermedades (Jung et al., 2019). La primera descripción de las especies de *S. chinensis* se puede encontrar en un trabajo de 1596 sobre la antigua medicina china escrito por Li Shih-Chen: "Pên T'shao Kang Mu". El fruto de la vid de magnolia china se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal, insuficiencia respiratoria, enfermedades cardiovasculares, en los estados de fatiga, debilidad corporal, sudoración excesiva, insomnio y tos (Panossian & Wikman, 2008; Szopa et al., 2017). Las revisiones de los efectos favorables a la salud de *S. chinensis* se centran principalmente en su influencia en los sistemas nervioso central, simpático, cardiovascular, endocrino y respiratorio, así como en sus actividades adaptógenas, hepatoprotectoras, inmunoestimulantes, antioxidantes, ergogénicas y antiestrés (Zhang et al., 2018). En Corea y China, se llama omiza y wu-wei-zi, respectivamente, y se usa comúnmente en té, mermeladas, vino y muchos otros productos como suplemento nutricional (Panossian & Wikman, 2008). Tiene sus hábitats naturales en el noreste de China, Corea, Japón, en la parte oriental de Rusia, en Primorsk, en las islas Kuriles y en el sur de la isla Sakhalin (Szopa et al., 2017). La planta requiere condiciones de humedad moderada y luz, junto con un suelo húmedo y rico en humus, se encuentra en bosques mixtos, especialmente en la periferia, también junto a arroyos y riachuelos, generalmente en suelos arenosos (Gnabrea et al., 2010). La especie se cultiva principalmente en China, Corea, Rusia y también en América del Norte y en muchos países europeos, especialmente con fines ornamentales (Szopa et al., 2017).

La fruta de *S. chinensis* se caracteriza por una composición química rica, aún no completamente conocida. Sus componentes químicos incluyen triterpenos, ácidos fenólicos, flavonoides, aceites esenciales, polisacáridos y lignanos. Dentro de los lignanos de dibenzociclooctadieno, que se encuentran en las mayores cantidades en los frutos de *S. chinensis*, se encuentran la schisandrina (sin. Schisandrol A, wuweizisu A), la schisandrin B (sin. Gomisina N, wuweizisu B, γ -schisandrin), schisantherina A (sin. gomisina C, esquisandrina A), esquisantherina B (sin. gomisina B, esquisandro B), schisanhenol (sin. gomisina K3), deoxyschisandrina (sin. schisandrin A) y gomisina A (sin. schisandrol B) (Szopa et al., 2017; Jung et al., 2019), que han ganado gran atención por sus múltiples funciones celulares (Jang et al., 2016). Regulan múltiples vías de señalización implicadas en diversos procesos

biológicos, como contractilidad vascular, fibrosis, inflamación, estrés oxidativo, adipogénesis, antihepatotóxicos, desintoxicantes, inmunoestimulantes, antivirales, protectoras de la piel, obesidad y efectos anticancerígenos (Szopa et al., 2017). Los componentes más importantes de las bayas son dibenzociclooctadieno lignanos, son los principales responsables de las propiedades saludables de *S. chinensis*. Estos compuestos son predominantes en los frutos de *S. chinensis*, pero también se pueden encontrar en las hojas, brotes y semillas (Szopa et al., 2017). El contenido de lignanos individuales en las frutas *S. chinensis* depende de la ubicación del cultivo, el grado de madurez de la fruta y la temporada de cosecha (Wang et al., 2018).

En los últimos años, se han demostrado otras propiedades biológicas valiosas para algunos lignanos de dibenzociclooctadieno, tales como: inhibición de la agregación plaquetaria, la acción de inhibir la proliferación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Shi et al., 2014) y la acción adyuvante en el tratamiento del cáncer. inhibiendo la activación oncogénica temprana del virus de Epstein-Barr (EBV-EA) (Chen et al., 2002), invirtiendo la resistencia a múltiples fármacos dependiente de la glicoproteína (Pgp-MDR en las células tumorales (Fong et al., 2007) y la sensibilización de las células de cáncer de hígado a los efectos de la doxorubicina (Hou et al., 2015).

Se ha reportado la actividad citotóxica y antiproliferativa de los componentes principales de *S. chinensis*. Los investigadores han estado identificando los compuestos responsables de esta actividad y estudiando sus mecanismos (Szopa et al., 2017). La actividad anticancerígena de los polifenoles de extractos de plantas en las líneas celulares cancerosas incluye varios mecanismos: inhibición de la proliferación tumoral, inducción de la muerte celular (apoptótica, autofágica), inhibición de la migración e invasión tumoral, detención del ciclo celular, actividad prooxidante por estimulación de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en líneas celulares cancerosas, además de reducir el estrés oxidativo en células normales y la inhibición de la actividad carcinógena (Nowak et al., 2019).

Se ha demostrado que la gomisina A actúa inhibiendo la producción de la forma placentaria de glutatión S-transferasa (marcador tumoral) en los hepatocitos y aumentando la excreción del carcinógeno; también influye en la citocinesis y reduce el número de lesiones neoplásicas focales en el hígado (Hwang et al., 2011; Waiwut et al., 2012). También, se ha informado que la gomisina J tiene varias actividades, que incluyen efectos antihepáticos contra los síntomas

cardiovasculares, efecto preventivo sobre la hipertensión inducida por angiotensina II, relajación vascular, efectos antiinflamatorios, actividad antirretroviral y se ha evidenciado su potencial para ser utilizado contra una amplia gama de diferentes tipos de células cancerosas. (Jung et al., 2019).

Los efectos secundarios se mencionan a menudo como una de las principales ventajas del uso de *S. chinensis*. Se afirmó que los extractos de en etanol no son tóxicos para los animales de experimentación, incluso en dosis muy altas (Panossian & Wikman, 2008). Por ejemplo, Kee y colaboradores en el 2018, demostraron la actividad anticancerosa de la gomisina A, mediante la inhibición de la proliferación de varias líneas celulares de cáncer colorrectal, mientras que ese compuesto no cambió la proliferación de las células normales del colon (Kee et al., 2018).

3. Justificación

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las causas más prevalentes de mortalidad a nivel mundial, y se estima que alrededor del 15% al 20% de los cánceres están asociados a infecciones virales (McLaughlin-Drubin & Munger, 2008). La infección por VPH es una de las enfermedades de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial (De Schryver & Meheus, 1990). Los Centros de Control de Enfermedad y Prevención de los Estados Unidos estimaron en el año 1993 alrededor de 500 mil a 1 millón de casos nuevos de infección genital por VPH (Strauss et al., 1996). El VPH es considerado un virus oncogénico ya que facilita la oncogénesis por sus oncoproteínas E6 y E7, las cuales promueven una progresión descontrolada del ciclo celular. Se ha reportado que el ADN del VPH se ha aislado en un 99.7% de las muestras de tumores de cérvix (Walboomers et al., 1999).

Además de estar altamente relacionado con el cáncer de cuello uterino, el VPH también está asociado con otros tipos de cáncer en humanos como lo son el cáncer de vaginal, peneal, anal y cáncer de cabeza y cuello (Zur Hausen, 2002), donde el más prevalente es el OSCC. El cáncer de cabeza y cuello corresponde al sexto tipo de cáncer más prevalente a nivel mundial (Vigneswaran & Williams, 2014). Se ha reportado que en los últimos 20 años el porcentaje de OSCC VPH-positivos aumento de aproximadamente un 20% a un 70% en los Estados Unidos y algunos países de Europa (Sathish et al., 2014). En Estados Unidos se ha evidenciado un incremento en la prevalencia de VPH en muestras de cáncer orofaríngeo de 7.5% por año, así llevando a una prevalencia de OSCC VPH-positivo del 71% entre el año 2000 y 2004 (Chaturvedi et al., 2011). En Colombia, se ha identificado una prevalencia del VPH en la cavidad oral de hombres sanos/asintomáticos del 4.5% (H et al., 2015).

A pesar de que el cáncer de cabeza y cuello VPH-positivo presenta características clínicas diferentes a los VPH-negativos; en incluso un mejor pronóstico, no existen diferencias en el tratamiento indicadas entre ambas formas de este tipo de cáncer. Para paciente en estadios tempranos de cáncer de cabeza y cuello VPH-positivo, la excisión quirúrgica del tumor o la radiación tienden a ser suficientes, proveyendo a los pacientes un pronóstico favorable. Sin embargo, estos tratamiento conllevan a efectos adversos en la salud de los pacientes como lo son la mucositis, osteoradionecrosis, trismus, xerostomía, compromiso estético y pérdida de la función (Turner, 2013). Por esta razón es importante encontrar nuevas alternativas de

tratamiento contra el OSCC que minimicen, o en su defecto, eliminen completamente los efectos adversos al tratamiento convencional.

La finalidad del proyecto es aportar a la investigación científica del CO y la efectividad de terapia extractos de productos naturales con este tipo de cáncer. Ya que, este es el primer proyecto desarrollado por el grupo de investigación con productos naturales, se realizó en un modelo de células HeLa debido a que es una línea celular económica y de mayor disponibilidad en el laboratorio y que por ser queratinocitos transformados por VPH-18 representan un modelo similar al de CO.

4. Situación actual

Durante muchos años, las plantas naturales se han utilizado en nutrición y producción de alimentos y medicina. Muchos de ellos contienen una serie de compuestos con actividad antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativa y antitumoral, por lo tanto, son opciones prometedoras para mejorar la eficiencia del tratamiento en pacientes con cáncer y disminuir las reacciones adversas, lo que resulta en una extensión de la esperanza de vida y una mejora de su calidad. Varios de estos fitoquímicos son compuestos biológicamente activos de origen natural con un potencial antitumoral significativo, con los cuales se han hecho varios estudios (Lin et al., 2020).

En el esfuerzo por encontrar medicamentos contra el cáncer seguros y efectivos a partir de estos productos naturales, nos enfocamos en *S. chinensis* y *P. lobata* debido a los importantes efectos biológicos antivirales y antitumorales que se han reportado.

En cuanto a la actividad antiviral de *S. chinensis*, las últimas investigaciones han reportado que los lignanos de dibenzociclooctadieno tienen un papel importante. En el estudio realizado por Xu y colaboradores en el año 2015, demostraron que la schisandrina B y la desoxyschisandrina inhiben selectivamente la actividad del ADN polimerasa asociada a la transcriptasa inversa del VIH-1. Schisandrin B pudo alterar las primeras fases de la replicación del VIH-1 en ensayos basados en células. Además, la schisandrina B también fue capaz de alterar los mutantes resistentes al fármaco de transcriptasa inversa del VIH-1 y las primeras fases de la replicación viral (Xu et al., 2015). También ha demostrado una potente actividad anti-virus de la hepatitis B contra la replicación de su ADN (Xue et al., 2015).

Con respecto a su efecto antitumoral, se han reportado efectos importantes en diferentes tipos de cáncer. En los estudios preliminares, encontramos que la schisandrina B, un dibenzociclooctadieno lignano natural con muy baja toxicidad, podría suprimir la metástasis del cáncer (Liu et al., 2012). En el estudio de Liu y colaboradores en el año 2012, reportaron que la schisandrina B atenúa la invasión del cáncer y la metástasis pulmonar y ósea mediante la inhibición de la transición epitelio-mesenquimal en ratones BALB/C inoculados con células 4T1 de cáncer de mama murino, lo que sugiere su posible aplicación en el proceso de metástasis del cáncer (Liu et al., 2012). Lv y colaboradores en el año 2015, demostraron que

este mismo lignano inhibe la proliferación de células A549 de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano al inducir la detención del ciclo y la apoptosis, inhibiendo así la invasión y migración de la línea celular A549 regulando negativamente las expresiones del factor inducible por hipoxia (HIF-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y matriz metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) (Lv et al., 2015).

En un estudio más reciente de Dai y colaboradores en el 2018, demostraron que schisandrina B inhibe el crecimiento del cáncer de mama triple negativo induciendo la detención del ciclo celular y desencadenando la muerte apoptótica, también inhibió la migración (Dai et al., 2018).

Otro compuesto, la deoxischisandrina causa apoptosis en la línea celular de adenocarcinoma de colon (Casarin et al., 2014), induce la detención del ciclo celular en la fase G0 / G1, inhibe la expresión de ciclina E en una línea celular de cáncer de ovario humano. La sobreexpresión de ciclina E revirtió significativamente la inhibición del crecimiento celular, además reduce el fenotipo protumoral de los macrófagos estimulados por las células de cáncer de ovario según el estudio de Lee y colaboradores en el año 2018 (Lee et al., 2018).

Qu y colaboradores en el año 2014 demostraron la actividad antitumoral y antiangiogénica asociada con la regulación positiva de BAX y p53, la regulación negativa de BCL-2, así como la reducción de CD31 y CD34 de los polisacáridos de *S. chinensis* en ratones desnudos BALB/c inoculados con células de carcinoma renal (Qu et al., 2014); uno de estos polisacáridos el homogéneo 0-1, en el estudio de Chen y colaboradores en el año 2016, indujo inhibición del crecimiento de células de carcinoma de hígado hepatocelular humano (HepG2) mediante detención en G2/M y causó apoptosis (Chen et al., 2016).

Otro constituyente bioactivo de *S. chinensis* responsable de la actividad anticancerígena y que se ha estudiado es la gomisina N y A, en el estudio de Yim y colaboradores en el año 2009, demostraron que la gomisina N indujo altos niveles apoptóticos en el carcinoma hepático, además, los niveles de expresión de las proteínas BCL-2 y BAX (Yim et al., 2009), que están involucradas en la vía apoptótica, aumentaron notablemente, al igual que en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon y de ovario (Casarin et al., 2014). En cuanto a la gomisina A indujo apoptosis a través de la escisión de caspasa-7 en células de carcinoma de colon HCT-116 (Hwang et al. 2011). Waiwut y colaboradores en el año 2012 realizaron una

investigación en la que se evidencio que la gomisina A inhibió la proliferación celular en presencia de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), debido a la detención del ciclo celular en la fase G1 con la regulación a la baja de la expresión de ciclina D1 y la fosforilación de retinoblastoma (RB), en combinación con TNF- α suprimió fuertemente la expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) (Waiwut et al., 2012). Luego, la gomisina A en el estudio de Kee y colaboradores en el año 2018, redujo la invasión y migración de líneas celulares de cáncer colorrectal, así como la metástasis en pulmón de ratón BALB/c, al inducir la apoptosis mediada por AMPK/p38 en células de cáncer colorrectal y disminuyó las capacidades metastásicas reduciendo las expresiones y actividades de la metaloproteinasa de matriz (MMP) -2 y MMP-9) (Kee et al., 2018). En otras investigaciones más recientes como la de Jung y colaboradores en el 2019, encontraron que la gomisina J tiene un efecto citotóxico fuerte en las células cancerosas MCF7 y MDA-MB-231, suprimió la proliferación y disminuyó la viabilidad de las células MCF7 y MDA-MB-231 a concentraciones relativamente bajas (30 μ g / ml), respectivamente, también inducía necroptosis, así como apoptosis (Jung et al., 2019).

La puerarina, un compuesto de *P. lobata*, ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento clínico y la investigación experimental y se considera que ejerce un efecto contra el cáncer recientemente. Se ha evidenciado su efecto en las células de cáncer de colon HT-29 al reducir la viabilidad celular e inducir la apoptosis, aumentando significativamente la activación de caspasa-3 (Yu & Li, 2006). Según Gan y Yin en el año 2014, la puerarina puede inducir la detención del crecimiento y la apoptosis en las células del linfoma humano Z138 y que el mecanismo puede implicar la vía de señalización NF- κ B (Gan & Yin, 2014). El estudio in vivo de Chen y colaboradores en el año 2016, mostraron que puerarina inhibe significativamente el crecimiento tumoral en células de carcinoma de pulmón humano A549, sus mecanismos están relacionados con niveles elevados de caspasa-3, caspasa-7, caspasa-9 y BAX, y niveles reducidos de BCL-2 (Chen et al., 2016), también se reportó un efecto similar de puerarina en líneas celulares de glioblastoma humano U251 y U87 que inhibió la proliferación e indujo apoptosis disminuyendo la proporción en la fase G1 del ciclo celular acompañado de poblaciones aumentadas en las fases S y G2/M. Al mismo tiempo, suprimió la expresión de p-AKT y BCL-2 y promovió la expresión de BAX y escindió la caspasa-3 (Yang et al., 2015).

En las investigaciones más recientes puerarina ejerció actividad antitumoral contra líneas celulares de cáncer de colon (Zhang et al., 2018) y en las células cancerosas de la vejiga

humana (Jiang et al., 2018) al bloquear el ciclo celular en la fase G0/G1 e inducir la apoptosis debido a la regulación de proteínas en la vía de señalización mTOR/p70S6K. Otro compuesto de *P. lobata* que ha mostrado tener efecto antitumoral es el isoflavonoide genisteína, tuvo un efecto antiproliferativo en las células del carcinoma de mama humano MCF-7 según Ahn y colaboradores en el año 2019 (Ahn et al., 2019).

Por otro lado, Lin y colaboradores en el año 2013, reportaron que el extracto acuoso de *P. lobata* tiene actividad antiviral contra la formación de placa inducida por el virus sincitial respiratorio humano, principalmente al inhibir la unión e internalización viral en líneas celulares del tracto respiratorio superior (HEp-2) e inferior (A549) (Lin et al., 2013). Mediouni y colaboradores en el año 2018, demostraron que un extracto de raíz de *P. lobata* inhibe significativamente la entrada del VIH-1 en las líneas celulares, sin toxicidad asociada (Mediouni et al., 2018), también se ha reportado que tiene una utilidad potencial para el tratamiento de la infección por el virus de la influenza (Wang et al., 2020)

En la investigación más reciente de Wu y colaboradores en el 2020, se evidenció los efectos antivirales y antiinflamatorios de la puerarina en lechones infectados con el virus de la diarrea epidémica porcina, puerarina atenuó las reducciones en la proliferación celular in vitro, inhibió la replicación del virus, restauró la expresión de varios genes estimulados por interferón e inhibió la activación de NF- κ B inducida por el virus (Wu et al., 2020).

Estos resultados sugieren que *S. chinensis* y *P. lobata* son unos candidatos ideales contra el cáncer capaz de inhibir la proliferación e inducir la apoptosis en células tumorales, sin embargo, no se ha evaluado su efecto en CO VPH positivo, constituyendo así el primer trabajo de la Universidad El Bosque en evaluar el efecto de extractos naturales sobre oncoproteínas virales asociadas a cáncer.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto citotóxico y anti-proliferativo de *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis* sobre queratinocitos tumorales transformados por VPH-18.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad citotóxica de *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis* sobre queratinocitos tumorales transformados por VPH-18
- Evaluar la distribución en el ciclo celular de queratinocitos tumorales transformados por VPH-18 tratados con *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis*.
- Evaluar la actividad transcripcional de los oncogenes virales E6 y E7 en queratinocitos tumorales transformados por VPH-18 tratados con *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis*.
- Evaluar la expresión génica de BCL-2, E2F-1 y p53 en queratinocitos tumorales transformados por VPH-18 tratados con *Pueraria lobata* y *Schisandra chinensis*.

6. Hipótesis del estudio

Hipótesis alterna (H_1): Los extractos de *P. lobata* y *S. chinensis* tienen efecto inhibitorio sobre la expresión génica de las oncoproteínas E6 y E7, efecto citotóxico y antiproliferativo sobre queratinocitos tumorales transformados por VPH-18.

Hipótesis nula (H_0): Los extractos de *P. lobata* y *S. chinensis* no tienen efecto inhibitorio sobre la expresión génica de las oncoproteínas, efecto citotóxico y antiproliferativo sobre queratinocitos tumorales transformados por VPH-18.

7. Metodología del proyecto

7.1. Tipo de estudio

Experimental *in vitro*.

7.2. Métodos y técnicas para la recolección de información (materiales y métodos)

7.2.1. Material Vegetal

Los extractos naturales comerciales de plantas chinas fueron adquiridos de la empresa Green Health center® (China, www.Greena-Bio.com). Se utilizaron los siguientes extractos:

- *Pueraria lobata*, nombre popular: Kudzu root
- *Schisandra chinensis*, nombre popular: Schisandra Berry
- *Camellia sinensis*, nombre popular: Té verde

7.2.2. Evaluación de la citotoxicidad y determinación de IC50

Se empleó la línea celular HeLa de carcinoma cervical con copias integradas de VPH genotipo 18; las células fueron sembradas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (100 unidades/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina y 2.5µg/ml de anfotericina B) a una densidad de 5.000 células/pozo en placas de 96 (CytoOne, Japan) por 24 horas en condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂, 37°C y 98% de humedad relativa). Posteriormente las células fueron tratadas con los extractos de *S. chinensis*, *P. lobata* y *C. sinensis* a concentraciones de: 50, 100, 250, 350, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 5000 µg/mL por 48 horas. Como control sin estímulo se utilizaron células sin estimular y como control de comparación el extracto de *C. sinensis* (té verde). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Para evaluar el efecto citotóxico de los extractos sobre las líneas celulares se utilizó el método colorimétrico de resazurina, para cuantificar la viabilidad celular después del tratamiento, basándose en la alta correlación que existe entre la cantidad de resazurina metabolizada a resofurina y el número de células vivas y/o metabólicamente activas. Posterior a las 48 horas de tratamiento, los extractos se retiraron haciendo lavado con solución de buffer fosfato

salino (PBS) y se adiciono en cada pozo 100 μ L de solución de resazurina 0,44 μ M preparada en DMEM sin suplementar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas, la fluorescencia fue leída a 570 nm con filtro diferencial 630 nm en un lector de placas (TECAN). Los valores de fluorescencia, se llevaron a porcentajes de supervivencia y graficados en función del logaritmo de la concentración de tratamiento empleando el paquete estadístico GraphPad-Prism 6® la IC50 (concentración que causa inhibición al 50% de la población celular) se calculó con el método de regresión no lineal.

7.2.3. Evaluación del efecto de los extractos naturales sobre el ciclo celular

Para determinar el efecto de los extractos sobre el contenido de ADN de las células HeLa en las fases G0/G1, S y G2/M, se utilizó el colorante que se intercala en el ADN 7AAD (7-Amino Actinomicina D) y permite determinar por citometría de flujo el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases. Para este análisis se sembraron, 20.000 células por triplicado en cajas de 24 pozos, las cuales fueron pre incubadas por 24 horas para garantizar la adherencia. Pasado el tiempo de pre-incubación, el medio de cultivo se retiró y las células se trataron con las concentraciones seleccionadas de los extractos (0.1 1 y 10 μ g/mL) durante un periodo de incubación de 24 y 48 horas. Posteriormente se retiró el tratamiento, se lavaron las células con PBS, se desprendieron de los pozos con tripsina 0,25% y se centrifugaron a 1800 rpm por 3 minutos. Las células se fijaron en etanol al 80% frío incubando a -20 ° C durante 2 horas. Cumplido el tiempo de incubación, se lavaron con PB , se centrifugaron durante 10 minutos a 1.500 rpm, se retiró el sobrenadante y se tiñeron con 5 μ L de 7-AAD (25 mg/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente. . El contenido de ADN y el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo se evaluó por citometría de flujo en el equipo BD Accuri C6, los datos fueron adquiridos utilizando el láser de 488-647 nm. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software FCS Express 5 Plus Research Multicycle.

7.2.4 Evaluación de la expresión génica de los oncogenes E6, E7 y las proteínas p53, Bcl-2 Y E2F-1 por RT-PCR

La expresión de los oncogenes virales E6 y E7, al igual que los genes p53, Bcl-2 y EF2-1 se evaluó por PCR en tiempo real con el termociclador CFX96-BIORAD, utilizando SybrGreen utilizando el kit "RT Luna universal master mix" (New England Biolabs NEB) (tabla 1); para esto, se sembraron 500.000 células en cajas de 25 cm y se realizaron los tratamientos con los

extractos de *P. lobata*, *S. chinensis* y *C. sinensis* a las concentraciones previamente establecidas. Cumplido el tiempo de cada tratamiento se extrajo el RNA utilizando el kit Quick-RNA MicroPrep (Zymo Research). Los cambios en la expresión génica fueron calculados empleando el método de cuantificación relativa de doble delta de Ct (2- $\Delta\Delta$ Ct) utilizando la fórmula de Pfaffl (Pfaffl 2001); la eficiencia de las reacciones se estimó utilizando el programa LinReg.

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

Método $\Delta\Delta$ Ct

- Δ Ct = Ct *Gen Int* – Ct *Housekeeping*.
- $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct muestra tratada - Δ Ct control sin tratamiento.
- $2-\Delta\Delta$ Ct = $2-(\Delta$ Ct muestra tratada - Δ Ct control sin tratamiento).

Tabla 1: Componentes para preparación de extracción de RNA “RT Luna universal master mix”.

Componentes	Concentraciones 20 μ l	Concentración Final
Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	10 μ l	1X
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20)	1 μ l	1x
Forward primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
Reverse primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
RNA	Variable	\leq 1 μ g (total RNA)
Nuclease-free Water	20 μ l	

7.3 Plan de tabulación y análisis

7.3.1. Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos, cómo la distribución fue no normal se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el Post hoc U de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 12.0 software (Stata Corporation, College Station, TX, USA), se usaron 3 lecturas para cada condición con las medidas cuantitativas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

8. Consideraciones éticas

Las pruebas experimentales fueron realizadas teniendo en cuenta los principios éticos consignados en la Ley 84 de 1989 y en las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Proyecto experimental in vitro que no involucró experimentación en humanos ni modelos animales por tanto no requirió aval de comité ético, es clasificado como una investigación sin riesgo. Todas las células utilizadas fueron adquiridas comercialmente y cuentan con las certificaciones necesarias para su utilización. La utilización de estas células representa un riesgo mínimo para la salud humana.

9. Resultados

Efecto de los extractos comerciales Schisandra chinensis y Pueraria lobata sobre la viabilidad de células HeLa

La evaluación de la citotoxicidad es un aspecto clave en el tamizaje de compuestos con potencial antitumoral, por tanto, en primer lugar, se evaluó el efecto citotóxico de los extractos comerciales *S. chinensis* y *P. lobata* sobre la línea celular HeLa. Para esto las células fueron tratadas con los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata* en un rango de concentraciones entre 0 - 5000 ug/ml y se evaluó la viabilidad celular por el método de resazurina. Se observó que los extractos evaluados no indujeron efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas tanto en células HeLa como en las células no tumorales (fibroblastos gingivales humanos), la viabilidad se mantuvo entre el 98-100 %. (Figura 1A, B, C, D, E, F). Las concentraciones inhibitorias 50 (IC50) estuvieron para *C. sinensis* en 2542 ug/ml (Figura 1D), *S. chinensis* en 1478 ug/ml (Figura 1E), *P. lobata* en 3294 ug/ml (Figura 1F). En conjunto, estos resultados muestran que los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata* no tienen efecto citotóxico sobre las HeLa y fibroblastos gingivales, sugiriendo que son seguros en células no tumorales (sanas).

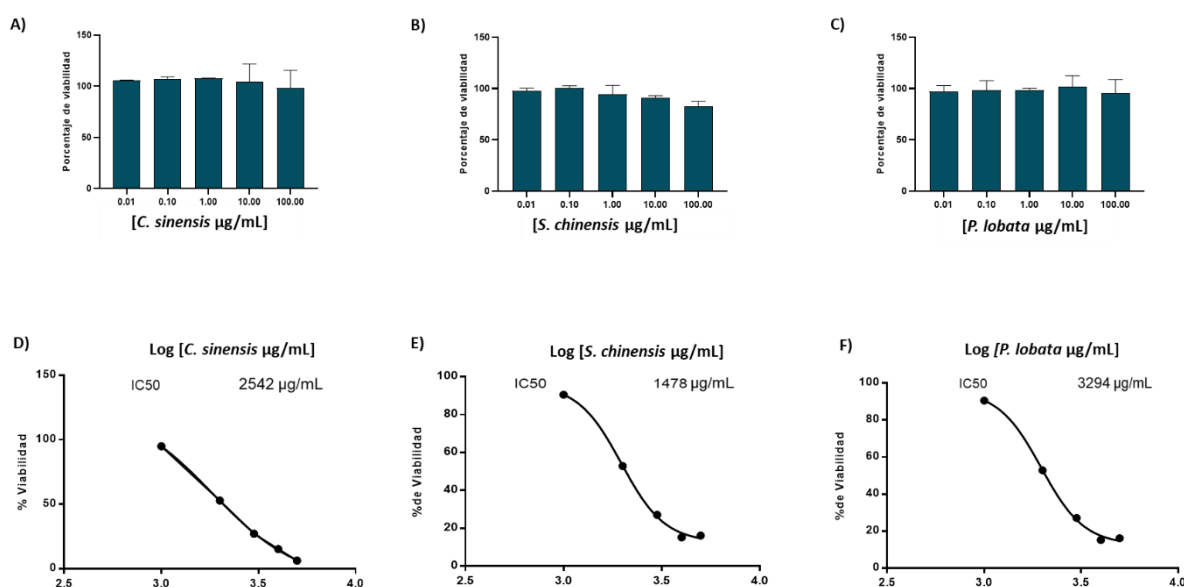


Figura 1. Viabilidad de células no tumorales (fibroblastos gingivales humanos) y células HeLa tratadas con los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata*. A) Viabilidad de células no tumorales tratadas con el control *C. sinensis*. B) Viabilidad de células no tumorales tratadas con *S.*

chinensis. C) Viabilidad de células no tumorales tratadas con *P. lobata*. D) Concentración inhibitoria 50 (IC50) en células HeLa tratadas con el control *C. sinensis*. E) Concentración inhibitoria 50 (IC50) en células HeLa tratadas con *S. chinensis*. F) Concentración inhibitoria 50 (IC50) en células HeLa tratadas con *P. lobata*. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el Post hoc U de Mann-Whitney. Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.

Efecto de los extractos de Schisandra chinensis y Pueraria lobata sobre la actividad transcripcional de los oncogenes virales E6 y E7 en células HeLa

A pesar que los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata* no mostraron tener efecto citotóxico sobre células HeLa a las concentraciones previamente establecidas, se decidió evaluar cambios en la expresión génica de los oncogenes virales E6 y E7 al ser estimuladas con ambos extractos a concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/mL, como lo es sugerido por el instituto nacional del cáncer (NCI-USA), por un periodo de 24 horas. Se observó que el extracto natural de *C. sinensis* disminuye la expresión de E6 a una concentración de 10 µg/mL ($p < 0.05$) con respecto al control sin estímulo. *S. chinensis* a las 24 horas de estimulación induce disminución de la expresión génica de E6 a 0,1 µg/mL ($p < 0.05$) con respecto al control sin estímulo y aumenta su expresión al ser estimuladas con el mismo extracto a concentraciones de 1 y 10 µg/mL. Adicionalmente, la expresión génica de E7 aumenta significativamente al estimular las células con este extracto a las concentraciones evaluadas con respecto al control sin estímulo (Figura 2A). De manera similar, el extracto natural de *P. lobata* disminuye la expresión génica de E6 a concentraciones de 0,1 µg/mL y 10 µg/mL ($p < 0.05$) y aumenta su expresión a 1 µg/mL con respecto al control sin estímulo. El RNAm de E7 aumenta en su expresión al estimular las células a las concentraciones evaluadas (Figura 2B). Por lo tanto, estos resultados indican que los extractos de *C. sinensis* a 10 µg/mL, *S. chinensis* a 0,1 µg/mL y *P. lobata* a 0,1 y 10 µg/mL logran disminuir la expresión génica del oncogén viral E6, mientras que la expresión de E7 aumenta al estimular las células con ambos extractos a las concentraciones evaluadas.

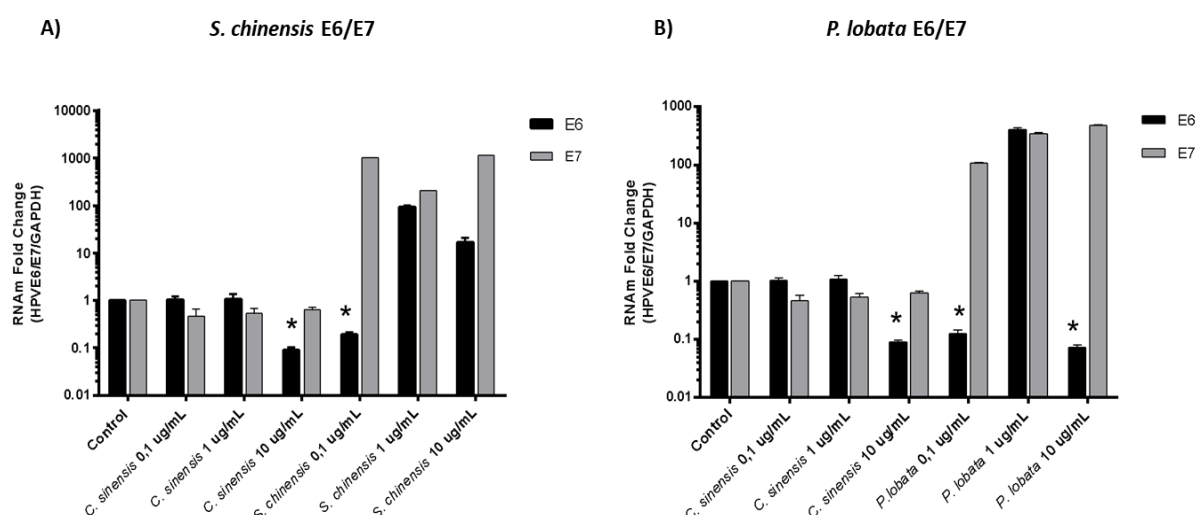


Figura 2. Actividad transcripcional de oncogenes E6 y E7 en células HeLa estimuladas con los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata* a concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/mL por un periodo de 24 horas. A) *S. chinensis*. B) *P. lobata*. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el Post hoc U de Mann-Whitney. * $p < 0.05$ respecto a control sin estímulo. Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.

Efecto de los extractos de *Schisandra chinensis* y *Pueraria lobata* sobre el ciclo celular en células HeLa

Las oncoproteínas virales E6 y E7 afectan el ciclo celular de los queratinocitos VPH-positivos por medio de la desregulación del ciclo celular, la apoptosis y reparación del ADN y por la liberación de factores de transcripción los cuales promueven la proliferación celular de manera descontrolada (Genther et al. 2003; Gage et al 1990). Por tanto, se evaluó el porcentaje de células en las fases del ciclo celular G0/G1, S y G2/M de HeLa al ser estimuladas con los extractos de *C. sinensis* a una concentración de 10 µg/mL, *S. chinensis* a 0.1 µg/mL y *P. lobata* a 1 y 10 µg/mL durante 24 y 48 horas respectivamente por medio de citometría de flujo. Se evaluó la distribución del ciclo celular únicamente a estas concentraciones ya que a estas se observó reducción en la expresión génica de E6 de acuerdo a los resultados obtenidos previamente (Figura 1). Células sin estímulo se tomaron como control sin estímulo (Figura 3A; 3D). Se evidenció que el extracto de *P. lobata* indujo detención en el ciclo celular en fase G0/G1 del 100% de las células a concentraciones de 0,1 y 10 µg/mL en un periodo de incubación de 24 horas con respecto al control sin estímulo (Figura 3B; 3C). El extracto de *C.*

sinensis induce la detención del ciclo celular en fase G0/G1 del 100% a 48 horas de estímulo (Figura 3E). El extracto de *S. chinensis* indujo la detención del ciclo celular en fase S a una concentración de 0,1 µg/mL a 48 horas de estímulo (Figura 3F). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que los extractos de *P. lobata* a 0,1 y 10 µg/mL por un periodo de estímulo de 24 horas y de *S. chinensis* a 0,1 µg/mL a 48 horas de estímulo poseen un efecto anti-proliferativo mediante la detención del ciclo celular en las fases G0/G1 y S respectivamente sobre células HeLa.

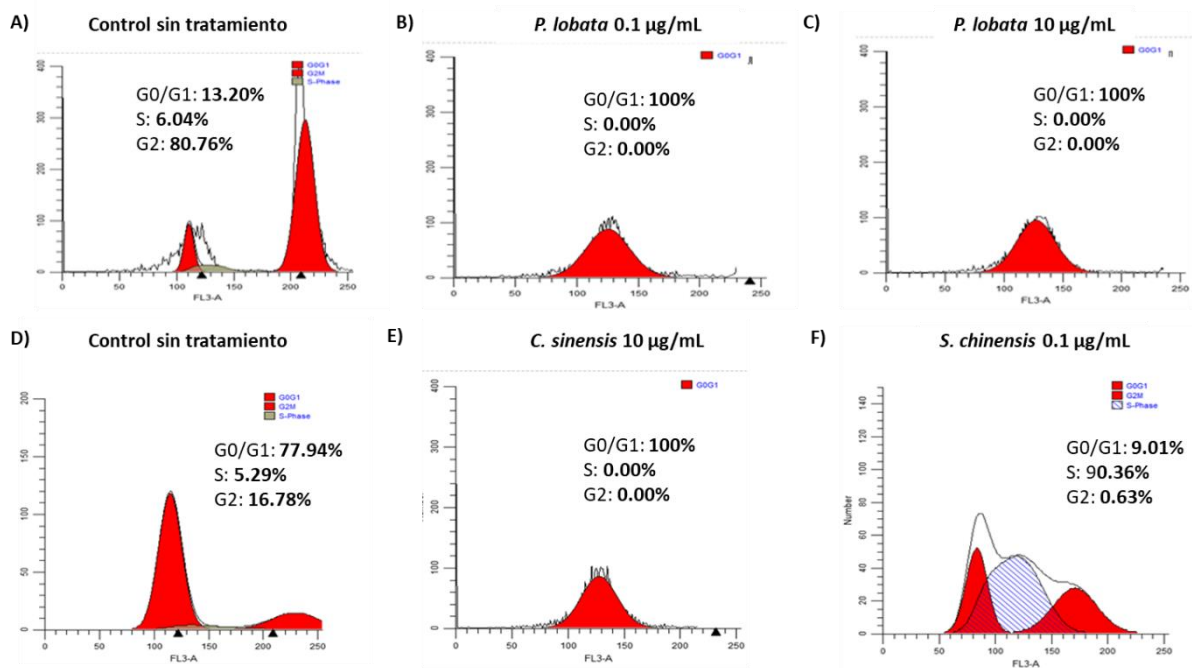


Figura 3. Evaluación de la distribución del ciclo celular de células HeLa estimuladas con los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata*. **A)** Control sin estímulo por 24 horas. **B)** *P. lobata* a 0.1 µg/ml por 24 horas **C)** *P. lobata* a 10 µg/ml por 24 horas. **D)** Control sin estímulo por 48 horas. **E)** *C. sinensis* a 10 µg/ml durante 48 horas. **F)** *S. chinensis* a 0.1 µg/ml durante 48 horas. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el Post hoc U de Mann-Whitney. Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.

Efecto de los extractos *Schisandra chinensis* y *Pueraria lobata* sobre la expresión génica de *BCL-2*, *E2F-1* y *p53* de células HeLa

Debido a que observamos que los extractos de *S. chinensis* y *P. lobata* inducían detención en las fases del ciclo celular G1 y G0/G1 respectivamente, se decidió evaluar genes claves en la regulación del ciclo celular como lo son p53, BCL-2 y E2F-1, con el fin de elucidar algún posible

mecanismo por el cual los extractos estaban induciendo dicha acumulación en el ciclo celular. La expresión génica de Bcl-2, E2F-1 y p53 de células HeLa tratadas con los extractos de *S. chinensis* a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y *P. lobata* a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Se observó que ambos extractos inducen aumento de la expresión del gen E2F-1 siendo *S. chinensis* el que induce un mayor aumento a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 4A), este efecto es inversamente proporcional en la expresión del gen BCL-2 siendo el extracto *P. lobata* el cual lo hace con mayor aumento a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 4B). Por otro lado, el extracto de comparación *C. sinensis* indujo sub-expresión del gen E2F-1 (Figura 4A) y sobreexpresión del gen BCL-2 (Figura 4B) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En la expresión de p53 tanto *C. sinensis* como *P. lobata* y *S. chinensis* indujeron aumento, siendo mucho mayor el que indujo *S. chinensis* a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 4C). En conjuntos estos resultados muestran que *S. chinensis* y *P. lobata* tienen efecto sobre la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, de los cuales depende la progresión de este, por lo tanto, la sobreexpresión de estos genes podría explicar el posible mecanismo a través del cual los extractos inducen detención de las fases G0/G1, lo cual impide la proliferación de las células HeLa.

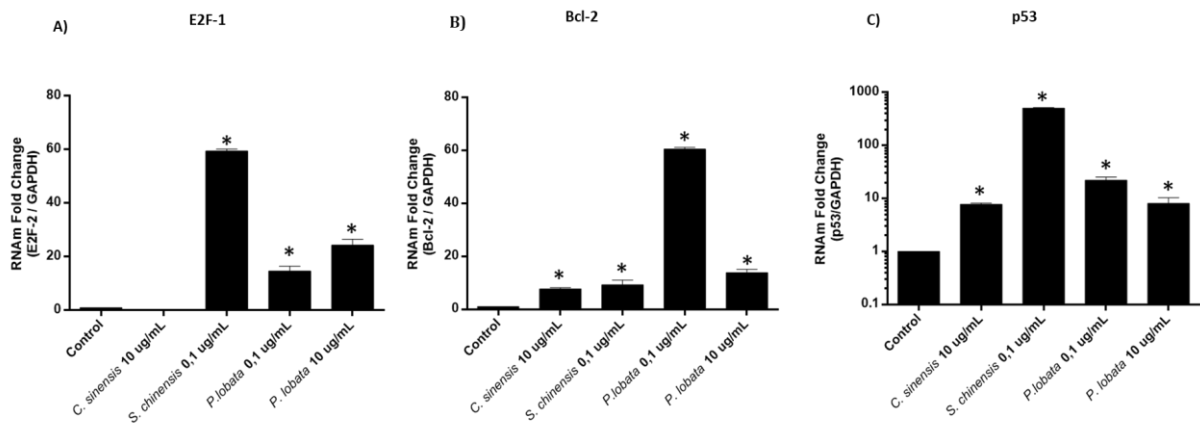


Figura 4. Expresión génica de BCL-2, E2F-1 y p53 de células HeLa tratadas con los extractos *S. chinensis* y *P. lobata*. **A)** Expresión génica de E2F-1. **B)** Expresión génica de Bcl-2. **C)** Expresión génica de p53. *P. lobata*. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el Post hoc U de Mann-Whitney. $*p < 0.05$ respecto al control sin estímulo. Análisis estadístico realizado por la Dra. Gloria Lafaurie.

10. Discusión

La búsqueda de agentes anticancerígenos alternativos ha generado un renovado interés en la medicina tradicional (Jiang et al., 2018). *P. lobata* y *S. chinensis* en medicina tradicional china, tiene efectos protectores sobre el sistema nervioso y cardiovascular y, además, puede prevenir la osteoporosis, la inflamación y la lesión hepática. Múltiples estudios han revelado que dichos extractos inducen la apoptosis celular, suprime la proliferación celular y aumenta la quimiosensibilidad de las células cancerosas (Nowak et al., 2019; Zhang et al., 2018). Por otro lado, los compuestos naturales derivados de plantas se han considerado durante mucho tiempo como posibles candidatos a fármacos contra el cáncer, especialmente debido a su relativa baja toxicidad y buena eficacia en comparación con los agentes sintéticos.

Por estas razones este trabajo, tuvo como objetivo evaluar el efecto citotóxico y anti-proliferativo de *P. lobata* y *S. chinensis* sobre queratinocitos tumorales transformados por VPH-18. Esto puede conducir al descubrimiento y desarrollo de medicamentos contra el cáncer mucho más eficaces y presentar un ejemplo de cómo superar las limitaciones de los fármacos anticáncer actuales.

En este estudio se pudo evidenciar que a pesar que tanto *S. chinensis* como *P. lobata* en las concentraciones hasta 100 ug/ml no tienen efecto citotóxico sobre las células tumorales y tampoco lo tienen sobre células sanas (no tumorales), un resultado similar se observó en el estudio de Kee y colaboradores en el año 2018, donde evaluaron efecto de la gomisina A sobre la proliferación y metástasis de células de cáncer colorrectal utilizando un modelo de ratón de metástasis pulmonar y evidenciaron que la gomisina A de *S. chinensis* no tiene efecto sobre las células normales del colon (Kee et al., 2018), al igual que en el estudio de Jung y colaboradores en el 2019, cuyos resultados revelaron que la línea celular epitelial mamaria humana normal, parecía ser mucho menos sensibles al tratamiento con gomisina J (Jung et al., 2019) Con respecto a *P. lobata*, Jeon y colaboradores en el año 2005, demostraron que sus componentes no tuvieron ningún efecto sobre los fibroblastos humanos normales utilizados (Jeon et al., 2005). Estos resultados en conjunto con los del presente estudio podrían sugerir que estos extractos naturales tienen efectos secundarios adversos reducidos o nulos en los tejidos normales.

A pesar de que los extractos naturales de *S. chinensis* y *P. lobata* no tuvieron efecto citotóxico sobre células HeLa a bajas concentraciones, se encontró que los extractos de *C. sinensis* a 10 µg/mL, *S. chinensis* a 0,1 µg/mL y *P. lobata* a 0,1 y 10 µg/mL logran disminuir la expresión génica del oncoproteína viral E6 posterior a un tiempo de estímulo de 24 horas. *C. sinensis* contiene catequinas, los cuales son polifenoles antioxidantes que se han evaluado como agentes antitumorales para la intervención de diferentes tipos de cáncer (Wang et al., 2018). La epigallocatequina galato (EGCG) corresponde a alrededor del 40% de las catequinas que contiene el té verde (Dong et al., 2011). Se ha evaluado en ensayos *in vitro* que el EGCG inhibe la síntesis de RNAm y expresión génica de receptores de estrógenos (ER) y la aromatasa, una enzima implicada en la síntesis de estrógenos en células HeLa. La subexpresión de ER y aromatasa logra limitar la expresión génica de E6 en células HeLa e indirectamente logra inhibir el crecimiento celular e induce la apoptosis de estas células, posiblemente mediado por la sobreexpresión de p53 consecuente a la inhibición de la expresión proteica de E6, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (Qiao et al., 2009; Wang et., al 2018).

Asimismo, no se había evaluado en previos estudios el efecto sobre la expresión génica de las oncoproteínas E6 y E7 en células HeLa al ser estimuladas con el extracto de *S. chinensis*. Este efecto se le puede atribuir a los diferentes compuestos de este extracto, donde se destacan diferentes lignanos los cuales han sido evaluados por su actividad antiviral (Szopa et al., 2017). Ensayos previos han mostrado que los lignanos schizandrina B y deoxischizandrina inhiben selectivamente la transcriptasa inversa asociada a la actividad de la ADN polimerasa del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (Xu et al., 2015). El extracto de *S. chinensis* logra reducir la actividad transcripcional de la oncoproteína E6 en células HeLa de manera dosis-tiempo-dependiente en células HeLa. Sin embargo, es necesario realizar futuros estudios para determinar a qué compuestos se le atribuye esta actividad. Adicionalmente, este estudio es el primero en mostrar el efecto inhibitorio de la expresión génica de E6 de *P. lobata* sobre la línea celular HeLa de manera dosis-dependiente. Este efecto se puede explicar tomando en cuenta el modelo planteado por Jia y colaboradores en el año 2019, donde señalan que el compuesto puerarina de *P. lobata* logra inhibir la cascada de señalización PI3K/Akt/mTOR en células HeLa. Esta cascada de señalización promueve la progresión del ciclo celular, reduce la apoptosis y promueve la migración de células tumorales. La activación excesiva de Akt activa

a la proteína mTOR, la cual puede causar aumento en la proliferación celular, aumento en la secreción de oncoproteínas y aceleración en el ciclo celular, lo cual promueve el desarrollo de tumores (Jia et al., 2019).

Los resultados de la citometría de flujo determinaron la detención del ciclo celular en células HeLa inducido por los extractos de *P. lobata* a concentraciones de 0,1 y 10 µg/mL por un periodo de estímulo de 24 horas y de *S. chinensis* a 0,1 µg/mL a 48 horas de estímulo en las fases G0/G1 y S, respectivamente. De manera similar, se ha observado que el isoflavonoide puerarina aislado de *P. lobata* logró inhibir la proliferación de células de glioblastoma deteniendo el ciclo celular en las fases S y G2/M (Yang et al., 2015). El arresto del 100% de las células HeLa en la fase G0/G1 posterior al estímulo con el extracto de *P. lobata* a las concentraciones evaluadas en este estudio se le puede atribuir a la sobreexpresión de p53 inducido por el mismo extracto a las mismas concentraciones. Un mecanismo por el cual p53 podría inducir arresto del ciclo celular es el aumento de la actividad transcripcional de p21/WAF1 (El-deiry et al., 1993; Wade Harper et al., 1993). La transcripción de ARNm codificante para el promotor p21 es altamente inducida tras la activación de p53 (El-deiry et al., 1993). p21 crea enlaces con los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina D/Cdk4, inactivándolos y así causando arresto en la fase G1 del ciclo celular (Wade Harper et al., 1993). De igual manera, se ha determinado que p53 induce arresto del ciclo celular en la fase G2/M por diferentes mecanismos, como los son la represión del promotor cdc25 después de detectarse daño del ADN celular (Clair et al., 2004) y la inhibición del complejo ciclina B/Cdc2, inhibiendo la progresión del ciclo celular a través de la mitosis (Martin-Caballero et al., 2001). Un efecto similar se evidenció en un modelo *in vitro* en donde el compuesto aislado deoxischizandrina de *S. chinensis* indujo un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular en diferentes líneas celulares de cáncer de ovario humano (A2780, SKOV3, and OVCAR3) mediado por la supresión de la ciclina E (Lee et al., 2018).

P. lobata a 0,1 µg/ml indujo una mayor expresión de BCL-2 la cual es inversamente proporcional a la expresión que indujo de E2F-1 a la misma concentración. Vairo y colaboradores en el año 2000 evidenciaron en fibroblastos que la sobreexpresión de BCL-2 regula negativamente la expresión de E2F-1; BCL-2 actúa a través de p27 y p130 para mantener los complejos p130-E2F-4, que luego reprimen a E2F-1, de esta forma se puede explicar por qué las células tratadas con *P. lobata* se detuvieron en fase G1 en un 100%, ya

que, E2F-1 es una proteína necesaria para el paso de la fase G1 a S del ciclo celular. Por otro lado, *S. chinensis* indujo un mayor aumento en la expresión del gen E2F-1 a 0,1 µg/ml, con lo cual se puede explicar porque la mayoría de células tratadas con *S. chinensis* estaban en fase S, además este extracto también indujo casi 100 veces más la expresión de p53 con respecto al extracto de comparación *C. sinensis*, p53 es un regulador importante del ciclo que podría ser el causal de estar deteniendo el ciclo celular en fase S de las células tratadas con *S. chinensis* y aunque p53 es clave en la regulación del ciclo celular induciendo su detención cuando se requiere, promueve la apoptosis regulando negativamente a BCL-2 antiapoptótico, esto podría explicar la expresión inversamente proporcional de p53 y BCL-2 de *S. chinensis* a 0,1 µg/ml. *P. lobata* también indujo una mayor expresión de p53 a 0,1 µg/ml con respecto al extracto de comparación, por lo que se puede inducir que además de la regulación de BCL-2 en el ciclo celular, p53 también puede ser la causa de la detención de las células HeLa tratadas con este extracto en la fase G1 en un 100%. En otros trabajos también se evidencio que *P. lobata* induce arresto del ciclo celular a través de la regulación positiva de p53. Lin y colaboradores en el año 2009 investigaron el efecto de puerarina de *P. lobata* en células de cáncer de mama y demostraron que inducen arresto del ciclo celular e inhibe la proliferación celular a través de la regulación positiva de los niveles de p53 (Lin et al., 2009). Chen y colaboradores en el año 2016 evaluaron eficacia de *S. chinensis* contra células de carcinoma hepático humano (HepG2) para investigar los efectos de su actividad antitumoral, observaron que el tratamiento con *S. chinensis* redujo BCL-2 y aumentó p53, este hallazgo implica que *S. chinensis* indujo apoptosis dependiente de p53 en las células HepG2. Por lo tanto, concluyeron que p53 determina el destino de las células HepG2 tratadas con *S. chinensis* (Chen et al., 2016).

11. Conclusión

Los resultados de este estudio evidencian que los extractos naturales de *P. lobata* y *S. chinensis* no poseen un efecto citotóxico sobre células HeLa y células sanas a bajas concentraciones (<100 µg/mL). Adicionalmente, se evidenció que ambos extractos evaluados poseen un efecto inhibitorio en la expresión génica de la oncoproteína viral E6 sobre células HeLa a bajas concentraciones, así como un efecto antiproliferativo mediante la detención del ciclo celular en las fases G0/G1 y S a 24 y 48 horas de estímulo , respectivamente, posiblemente mediado por la sobreexpresión de genes reguladores del ciclo celular como p53 y antiapoptótico como BCL-2.

Con base a estos resultados, se puede afirmar que los extractos de *P. lobata* y *S. chinensis* tienen un efecto antiproliferativo sobre células HeLa, y que además podrían ser unos candidatos promisorios para el tratamiento contra el VPH, debido a su efecto inhibitorio sobre la expresión de la oncoproteínas viral E6. Investigaciones futuras son necesarias para determinar a qué compuesto de los extractos evaluados se le atribuyen estos efectos. Se requiere trabajo adicional, incluida la separación adicional y la determinación estructural de los componentes aislados.

12. Referencias bibliográficas

Ahn SY, Jo MS, Lee D, Baek SE, Baek J, Yu JS, et al. Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Bioorg Chem* [Internet]. 2019;83(September 2018):135–44.

Amin ARMR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol*. 2009;27(16):2712–25.

Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).

Brahmbhatt H, Uehling D, Al-awar R, Leber B, Andrews D. Small molecules reveal an alternative mechanism of Bax activation. *Biochem J*. 2016;473(8):1073–83.

Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod*. 2004;67(12):2141–53.

Casarin E, Dall'Acqua S, Šmejkal K, Šlapetová T, Innocenti G, Carrara M. Molecular mechanisms of antiproliferative effects induced by Schisandra-derived dibenzocyclooctadiene lignans (+)-deoxyschisandrin and (-)-gomisin N in human tumour cell lines. *Fitoterapia*. 2014;98:241–7.

Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives. *J Oncol*. 2019;2019.

Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4294–301.

Chen DF, Zhang SX, Kozuka M, Sun QZ, Feng J, Wang Q, et al. Interiotherins C and D, two new lignans from *Kadsura interior* and antitumor-promoting effects of related neolignans on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod*. 2002;65(9):1242–5.

Chen, Y.; Shi, S.; Wang, H.; Li, N.; Su, J.; Chou, G.; Wang, S. A homogeneous polysaccharide from *Fructus Schisandra chinensis* (Turz.) Baill. induces mitochondrial apoptosis through the hsp90/AKT signalling pathway in HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2016, 17, 1015.

Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. *Front Pharmacol*. 2020;10(January):1–17.

Cos P, Apers S. *Phytoestrogens : Recent Developments*. 2003.

Dai X, Yin C, Guo G, Zhang Y, Zhao C, Qian J, et al. Schisandrin B exhibits potent anticancer activity in triple negative breast cancer by inhibiting STAT3. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2018;358:110–9.

de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13.

De Schryver A, Meheus A. Epidemiology of sexually transmitted diseases: The global picture. *Bull World Health Organ*. 1990;68(5):639–54

Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, et al. Oral cancer: A multicenter study. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2018;23(1):e23–9.

Dong JJ, Ye JH, Lu JL, Zheng XQ, Liang YR. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2011;89(1):62–6.

Dutta S, Mahalanobish S, Saha S, Ghosh S, Sil PC. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019;128(February):240–55.

Dyne EA Van, Henley SJ, Saraiya M, Thomas CC, Markowitz LE, Benard VB. Trends in Human Papillomavirus – Associated Cancers —. 2018;67(33):1999–2015.

El-deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. 1-s2.0-009286749390500P-main.pdf. 1993;75:817–25.

Fong WF, Wan CK, Zhu CY, Chattopadhyay A, Dey S, Zhao Z, et al. Schisandrol A from *Schisandra chinensis* reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by affecting Pgp-substrate complexes. *Planta Med.* 2007;73(3):212–20.

Fridlender M, Kapulnik Y, Koltai H. Plant derived substances with anti-cancer activity: From folklore to practice. *Front Plant Sci.* 2015;6:1–9.

Gan M, Yin X. Puerarin Induced in Mantle Cell Lymphoma Apoptosis and its Possible Mechanisms Involving Multi-signaling Pathway. *Cell Biochem Biophys.* 2014;71(1):367–73.

Gayar OH, Ruterbusch JJ, Elshaikh M, Cote M, Ghanem T, Hall F, et al. Oropharyngeal carcinoma in young adults: An alarming national trend. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States).* 2014;150(4):594–601.

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3235–42

Gnabre J, Unlu I, Chang T cheng, Lisseck P, Bourne B, Scolnik R, et al. Isolation of lignans from *Schisandra chinensis* with anti-proliferative activity in human colorectal carcinoma: Structure-activity relationships. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet].* 2010;878(28):2693–700.

Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghetti A, et al. Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin: Antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sci.* 2000;67(24):2997–3006.

H V, DM R, SL G. Identification of Human Papilloma Virus (HPV) in the Oral Cavity of Asymptomatic Colombian Men. *Mol Biol*. 2015;04(04).

Hirakura K, Morita M, Nakajima K, Sugama K, Takagi K, Niitsu K, et al. Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry*. 1997;46(5):921–8.

Hou D, Xu G, Zhang C, Li B, Qin J, Hao X, et al. Berberine induces oxidative DNA damage and impairs homologous recombination repair in ovarian cancer cells to confer increased sensitivity to PARP inhibition. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3070

Hou W, Gao W, Wang D, Liu Q, Zheng S, Wang Y. The protecting effect of deoxyschisandrin and schisandrin B on HaCaT cells against UVB-induced damage. *PLoS One*. 2015;10(5):1–11.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2010;62(1):1–20.

Hwang D, Shin SY, Lee Y, Hyun J, Yong Y, Park JC, et al. A compound isolated from *Schisandra chinensis* induces apoptosis. *Bioorganic Med Chem Lett [Internet]*. 2011;21(20):6054–7.

Jang MK, Nam JS, Kim JH, Yun YR, Han CW, Kim BJ, et al. *Schisandra chinensis* extract ameliorates nonalcoholic fatty liver via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 2016;185:96–104.

Jeannot E, Viviano M, Follonier MC, Kaech C, Oberhauser N, Mpinga EK, et al. Human papillomavirus infection and vaccination: Knowledge, attitude and perception among undergraduate men and women healthcare university students in Switzerland. *Vaccines*. 2019;7(4):1–11.

Jeon GC, Park MS, Yoon DY, Shin CH, Sin HS, Um SJ. Antitumor activity of spinasterol isolated from *Pueraria* roots. *Exp Mol Med*. 2005 Apr 30;37(2):111-20.

Jia L, Hu Y, Yang G, Li P. Puerarin suppresses cell growth and migration in HPV-positive cervical cancer cells by inhibiting the PI3K/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2019;(12):543–9.

Jiang K, Chen H, Tang K, Guan W, Zhou H, Guo X, et al. Puerarin inhibits bladder cancer cell proliferation through the mTOR/p70S6K signaling pathway. *Oncol Lett*. 2018;15(1):167–74.

Jin SE, Son YK, Min BS, Jung HA, Choi JS. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Arch Pharm Res*. 2012;35(5):823–37.

Jung S, Moon HI, Kim S, Ngoc Quynh NT, Yu J, Sandag Z, et al. Anticancer activity of gomisins J from *Schisandra chinensis* fruit. *Oncol Rep*. 2019;41(1):711–7

Mandlik DS, Nair SS, Patel KD, Gupta K, Patel P, Patel P, Sharma N, Joshipura A, Patel M. Squamous cell carcinoma of gingivobuccal complex: Literature, evidences and practice. *J Head Neck Physicians Surg [serial online]* 2018 [cited 2020 Nov 16];6:18-28

Kee JY, Han YH, Mun JG, Park SH, Jeon HD, Hong SH. Gomisins A suppresses colorectal lung metastasis by inducing AMPK/p38-mediated apoptosis and decreasing metastatic abilities of colorectal cancer cells. *Front Pharmacol*. 2018;9:1–13.

Keung WM, Vallee BL. Kudzu root: An ancient Chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry*. 1998;47(4):499–506.

Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2016;42(6):327.

Kim W, Lee WB, Lee J, Min B Il, Lee H, Cho SH. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for nasopharyngeal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Integr Cancer Ther*. 2015;14(3):212–20.

Kim W, Lee WB, Lee JW, Min B II, Baek SK, Lee HS, et al. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review. *Complement Ther Med* [Internet]. 2015;23(4):626–32.

Kumar M, Nanavati R, Modi T, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):458–63.

Kuo YT, Liao HH, Chiang JH, Wu MY, Chen BC, Chang CM, et al. Complementary Chinese Herbal Medicine Therapy Improves Survival of Patients With Pancreatic Cancer in Taiwan: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Integr Cancer Ther*. 2018;17(2):411–22.

Lafaurie GI, Perdomo SJ, Buenahora MR, Amaya S, Díaz-Báez D. Human papilloma virus: An etiological and prognostic factor for oral cancer? *J Investig Clin Dent*. 2018;9(2):e12313.

Lee K, Ahn JH, Lee KT, Jang DS, Choi JH. Deoxyschizandrin, isolated from schisandra berries, induces cell cycle arrest in ovarian cancer cells and inhibits the protumoural activation of tumour-associated macrophages. *Nutrients*. 2018;10(1)

Lin RC, Li TK. Effects of isoflavones on alcohol pharmacokinetics and alcohol-drinking behavior in rats. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(6 SUPPL.):1512–5.

Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *Br J Pharmacol*. 2020;177(6):1409–23.

Lin SR, Fu YS, Tsai MJ, Cheng H, Weng CF. Natural compounds from herbs that can potentially execute as autophagy inducers for cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).

Lin TJ, Yeh CF, Wang KC, Chiang LC, Tsai JJ, Chang JS. Water extract of *Pueraria lobata* Ohwi has anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines. *Kaohsiung J Med Sci* [Internet]. 2013;29(12):651–7.

Lin YJ, Hou YC, Lin CH, Hsu YA, Sheu JJC, Lai CH, et al. Puerariae radix isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;378(4):683–8.

Liu Z, Zhang B, Liu K, Ding Z, Hu X. Schisandrin B attenuates cancer invasion and metastasis via inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2012;7(7):1–12.

Lv XJ, Zhao LJ, Hao YQ, Su ZZ, Li JY, Du YW, Zhang J. Schisandrin B inhibits the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells by inducing cycle arrest and apoptosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 May 15;8(5):6926-36.

Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor Susceptibility of p21 Waf1/Cip1-deficient Mice 1. *Cancer Res*. 2001;61:6234–8

McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2008;1782(3):127–50.

Mediouni S, Jablonski JA, Tsuda S, Richard A, Kessing C, Andrade M V., et al. Potent suppression of HIV-1 cell attachment by Kudzu root extract 11 *Medical and Health Sciences* 1108 *Medical Microbiology. Retrovirology* [Internet]. 2018;15(1):1–18.

Migueláñez-Medrán, B. D. C., Pozo-Kreiling, J. J., Cebrián-Carretero, J. L., Martínez-García, M. Á., & López-Sánchez, A. F. (2019). Oral squamous cell carcinoma of tongue: Histological risk assessment. A pilot study. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 24(5), e603–e609.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep*. 2000;17(3):215–34.

Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*. 2009;59(6):365–78.

Nowak A, Zakłós-Szyda M, Błasiak J, Nowak A, Zhang Z, Zhang B. Potential of schisandra chinensis (Turcz.) Baill. in human health and nutrition: A review of current knowledge and therapeutic perspectives. *Nutrients*. 2019;11(2).

Ogbonna JDN, Kenechukwu FC, Attama AA, Chime SA. Different approaches to formulation of herbal extracts /phytopharmaceuticals /bioactive phytoconstituents - a review. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2012;16(1):1–8

Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020;10.

Panossian A, Wikman G. Pharmacology of Schisandra chinensis Baill.: An overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol*. 2008;118(2):183–212.

Piao L, Mukherjee S, Chang Q, Xie X, Li H, Castellanos MR, et al. TriCurin, a novel formulation of curcumin, epicatechin gallate, and resveratrol, inhibits the tumorigenicity of human papillomaviruspositive head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(36):60025–35.

Qiao Y, Cao J, Xie L, Shi X. Cell growth inhibition and gene expression regulation by (-)-epigallocatechin-3-gallate in human cervical cancer cells. *Arch Pharm Res*. 2009;32(9):1309–15.

Qicheng F. Some current study and research approaches relating to the use of plants in the traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol*. 1980 Mar;2(1):57-63.

Qu HM, Liu SJ, Zhang CY. Antitumor and antiangiogenic activity of Schisandra chinensis polysaccharide in a renal cell carcinoma model. *Int J Biol Macromol*. 2014 May;66:52-6.

Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes Dev*. 2002;16(2):245–56

- Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94.
- Rudat V, Wannemacher M. Role of multimodal treatment in oropharynx, larynx, and hypopharynx cancer. *Semin Surg Oncol*. 2001;20(1):66–74.
- Sadhukhan P, Saha S, Dutta S, Mahalanobish S, Sil PC. Nutraceuticals: An emerging therapeutic approach against the pathogenesis of Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 129, *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd; 2018. 100–114 p.
- Saleh MH, Rashedi I, Keating A. Immunomodulatory properties of coriolus versicolor: The role of polysaccharopeptide. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–12.
- Sathish N, Wang X, Yuan Y. Human Papillomavirus (HPV)-associated Oral Cancers and Treatment Strategies. *J Dent Res*. 2014;93:29S-36S
- Sher G, Salman NA, Kulinski M, Fadel RA, Gupta VK, Anand A, et al. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus (HPV) in breast cancer: A Qatar based study. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1–10.
- Shi YM, Wang LY, Zou XS, Li XN, Shang SZ, Gao ZH, et al. Norriterpenoids from *Schisandra chinensis* and their absolute configurational assignments by electronic circular dichroism study. *Tetrahedron [Internet]*. 2014;70(4):859–68.
- Singhvi HR, Malik A, Chaturvedi P. The role of chronic mucosal trauma in oral cancer: A review of literature. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2017;38(1):44–50.
- Strauss MJ, Khanna V, Koenig JD, Downs SM, Goldberg SH, Manyak MJ, et al. The cost of treating genital warts. *Int J Dermatol*. 1996;35(5):340–8.
- Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochem Rev*. 2017;16(2):195–218.

Tumban E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*. 2019;11(10).

Turner L. Review of the complications associated with treatment of oropharyngeal cancer. *Quintessence Int (Berl)*. 2013;44(3):267–79.

Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME, et al. Bcl-2 Retards Cell Cycle Entry through p27Kip1, pRB Relative p130, and Altered E2F Regulation. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4745–53.

Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis Changing epidemiology of head and neck cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am [Internet]*. 2014;26(2):123–41.

Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993;75(4):805–16.

Waiwut P, Shin MS, Yokoyama S, Saiki I, Sakurai H. Gomisins A enhances tumor necrosis factor- α -induced G1 cell cycle arrest via signal transducer and activator of transcription 1-mediated phosphorylation of retinoblastoma protein. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(11):1997–2003.

Wang HX, Zeng M Sen, Ye Y, Liu JY, Xu PP. Antiviral activity of puerarin as potent inhibitor of influenza virus neuraminidase. *Phyther Res*. 2020;(December 2019):1–13.

Wang J, Yang ZR, Guo XF, Song J, Zhang J xiang, Wang J, et al. Synergistic effects of puerarin combined with 5-fluorouracil on esophageal cancer. *Mol Med Rep*. 2014;10(5):2535–41.

Wang X, Yu J, Li W, Wang C, Li H, Ju W, et al. Characteristics and Antioxidant Activity of Lignans in *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* from Different Locations. *Chem Biodivers*. 2018;15(6).

Wong HM. Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. *Sci World J.* 2014;2014.

World Health Organization. Global Health Observatory. Lyon, France: World Health Organization; 2018. Disponible en URL: gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.

Wu M, Zhang Q, Yi D, Wu T, Chen H, Guo S, Li S, Ji C, Wang L, Zhao D, Hou Y, Wu G. Quantitative Proteomic Analysis Reveals Antiviral and Anti-inflammatory Effects of Puerarin in Piglets Infected With Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Front Immunol.* 2020 Feb 26;11:169.

Wu X, Chung VCH, Lu P, Poon SK, Hui EP, Lau AYL, et al. Chinese herbal medicine for improving quality of life among nonsmall cell lung cancer patients overview of systematic reviews and network meta-analysis. *Med (United States).* 2016;95(1):1–12.

Xiao L, Wang YC, Li WS, Du Y. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: An immunohistochemical study on tissue microarray. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28(1):1–9.

Xu L, Grandi N, Del Vecchio C, Mandas D, Corona A, Piano D, et al. From the traditional Chinese medicine plant *Schisandra chinensis* new scaffolds effective on HIV-1 reverse transcriptase resistant to non-nucleoside inhibitors. *J Microbiol.* 2015;53(4):288–93.

Xue Y, Li X, Du X, Li X, Wang W, Yang J, et al. Isolation and anti-hepatitis B virus activity of dibenzocyclooctadiene lignans from the fruits of *Schisandra chinensis*. *Phytochemistry [Internet].* 2015;116(1):253–61.

Yakin, M., Seo, B., Hussaini, H., Rich, A., & Hunter, K. (2019). Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the essentials. *Australian Dental Journal*, 64(1), 11–18. <https://doi.org/10.1111/adj.12652>

Yang JA, Li JQ, Shao LM, Yang Q, Liu BH, Wu TF, et al. Puerarin inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cell lines. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):10132–42.

Yeo-Teh NSL, Ito Y, Jha S. High-risk human papillomaviral oncogenes E6 and E7 target key cellular pathways to achieve oncogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).

Yim SY, Lee YJ, Lee YK, Jung SE, Kim JH, Kim HJ, Son BG, Park YH, Lee YG, Choi YW, Hwang DY. Gomisin N isolated from *Schisandra chinensis* significantly induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in hepatic carcinoma. *Mol Med Rep*. 2009 Sep-Oct;2(5):725-32

You EL, Henry M, Zeitouni AG. Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: Review of current evidence and management. *Curr Oncol*. 2019;26(2):119–23.

Yu Z, Li W. Induction of apoptosis by puerarin in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*. 2006;238(1):53–60.

Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*. 2004;215(2):159–66.

Zhang XL, Wang B Bin, Mo JS. Puerarin 6''-O-xyloside possesses significant antitumor activities on colon cancer through inducing apoptosis. *Oncol Lett*. 2018;16(5):5557–64.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342–50