



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE

MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA

---

---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

“AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A

OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS:

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de posgrado otorgada para la realización de este proyecto.

Agradezco al Centro de Investigación en Biotecnología por los estudios brindados.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE CUADROS .....	VI
RESUMEN .....	VII
ANTECEDENTES .....	1
1.1 Demencia y enfermedad de Alzheimer .....	1
1.2 Déficit de Acetilcolina .....	2
1.3 Proteína BA y Tau .....	2
1.4 Factores genéticos .....	3
1.5 Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer .....	4
1.6 Huperzina A .....	6
1.6.1 Descubrimiento .....	6
1.6.2 Antecedentes farmacológicos.....	7
1.6.3 Fuente de obtención.....	9
1.7 <i>Phlegmariurus taxifolius</i> .....	10
1.8 Hongos endófitos.....	12
1.8.1 Clasificación de los hongos endófitos .....	13
1.8.2 Relaciones planta-endófito.....	14

1.8.3 Producción de compuestos bioactivos por hongos endófitos.....	16
1.8.4 Producción de Hup A por hongos endófitos .....	18
JUSTIFICACIÓN .....	20
HIPÓTESIS .....	22
OBJETIVO GENERAL .....	22
OBJETIVOS PARTICULARES .....	22
METODOLOGÍA .....	23
2.1 Materiales y métodos.....	24
2.1.1 Colecta del material vegetal.....	24
2.1.2 Aislamiento de los hongos endófitos.....	24
2.1.3 Fermentación y preparación de los extractos fúngicos.....	26
2.1.4 Identificación química de Hup A mediante CLAE y CL-EM .....	28
2.1.5 Identificación morfológica.....	28
2.1.6 Identificación molecular .....	29
2.1.7 Ensayo in vitro de la actividad inhibitoria de la AChE. ....	31
RESULTADOS .....	32
3.1 Aislamiento de hongos endófitos. ....	32
3.2 Identificación química y cuantificación de Hup A mediante CLAE y LC-MS. ....	36
3.3 Identificación morfológica del aislado C17 .....	38
3.4 Identificación molecular del aislado C17. ....	39

3.5 Inhibición de la AchE por el extracto alcaloideo de C17 .....	40
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES .....	44
PERSPECTIVAS.....	46
LITERATURA CITADA.....	47

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación del modo de acción de los inhibidores de la AchE (Dall'Acqua, 2013). .....	4
Figura 2 Estructura de Huperzina A ([5R-(5_,9_,11E)]-5-amino-11-ethylidene5,6,9,10-tetrahydron-7-methyl-5,9-methanocycloocta[b]pyridine-2-(1H)-one).....	7
Figura 3. Clasificación taxonómica de la subfamilia Huperzioideae. ....	11
Figura 4. Interpretación de las interacciones planta-hongo (Kusari <i>et al.</i> , 2012).....	15
Figura 5. Plantas de <i>P. taxifolius</i> .....	24
Figura 6. Metodología para el aislamiento de hongos endófitos.....	25
Figura 7. Obtención de los extractos fúngicos alcaloideos. ....	27
Figura 8. Preparación del medio CLA para inoculación de las esporas de C17.....	29
Figura 9. Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de la AChE.....	31
Figura 10. Hongos endófitos aislados de <i>P. taxifolius</i> .....	33
Figura 11. Vistas macroscópicas y microscópicas de algunos aislado de <i>P. taxifolius</i> . Se observaron diferentes tipos y pigmentaciones de micelio a nivel macroscópico, así como micelio cenocítico y hialino a nivel microscópico (C6, C1, C8). También se observaron estructuras características de algunos géneros de hongos como <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Aspergillus</i> (C7, C17, C24). Vistas a 100X. ....	35
Figura 12. Curva de calibración del estándar ( $R^2=0.9943$ ).....	36
Figura 13. Cromatogramas de los extractos alcaloideos en los que se observó un pico en el tiempo de retención del estándar Hup A. ....	37
Figura 14. Morfología de la cepa C17: a) Cepa C17 en PDA; b) Macroconidios y microconidios (100x); c) Monofiálides <i>in situ</i> en CLA (100x).....	38

Figura 15. Árbol filogenético que muestra la relación del aislado C17 con otras especies fúngicas en función de su homología de secuencias ITS, obtenidas del GenBank. .... 39

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Farmacos utilizados para el tratamiento del Alzheimer (Mangialasche <i>et al.</i> , 2010). ....	5
Cuadro 2. Clasificaciones taxonómicas más utilizadas de los Licopodiales (Ma <i>et al.</i> , 2007). ....	10
Cuadro 3. Clasificación de los hongos endófitos según Rodríguez <i>et al.</i> , 2009.....	14
Cuadro 4. Compuestos bioactivos producidos por hongos endófitos. ....	17
Cuadro 5. Hongos endófitos aislados de especies de la familia Huperziaceae productores de Hup A. ....	19
Cuadro 6. Número de aislamientos de <i>P. taxifolius</i> de diferentes partes de la planta en distintos medios. ....	32
Cuadro 7. Rendimiento de micelio en peso seco de las cepas inoculadas en medio PDB y rendimiento de alcaloides. ....	34
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de la AchE por C17 .....	40

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo e irreversible que afecta principalmente a personas de edad avanzada. Actualmente 50 millones de personas viven con demencia alrededor del mundo, dos tercios padecen la EA. La Huperzina A (Hup A) es un alcaloide natural que se aisló por primera vez de la planta medicinal china *Huperzia serrata* y ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de la EA. Hup A es un inhibidor reversible, potente y selectivo de la acetilcolinesterasa, tiene mayor efecto inhibitorio que los fármacos comerciales. Debido a la demanda de este alcaloide y a la sobreexplotación de las poblaciones silvestres de las especies de la familia Huperziaceae, es importante encontrar nuevas estrategias para la obtención de este alcaloide. Se colectaron plantas silvestres de *Phlegmariurus taxifolius*, los hongos endófitos se aislaron de hoja, tallo y raíz en cuatro medios diferentes: agar dextrosa y papa (PDA), agar harina de maíz (AHM), agar extracto de malta (AEM) y agar agua (AA). Las muestras se esterilizaron por lavado en etanol al 75% (v/v) 1 min, con NaClO 3.4% 10 min y etanol al 75% 30 seg y 4-5 lavados con agua destilada estéril. Se obtuvieron un total de 22 aislados fúngicos, en el análisis de los extractos alcaloideos fúngicos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), 6 mostraron un pico en el tiempo de retención del estándar de Hup A. El análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) confirmó la presencia de Hup A en el extracto alcaloideo de la cepa C17, la cual tuvo un rendimiento de 2.3 µg/g de micelio en peso seco. La cepa C17 fue identificada morfológicamente por las características de la colonia y por la presencia de macroconidios y microconidios. El análisis del ADN a través de la amplificación y secuenciación con los primers universales ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer) confirmaron que la cepa C17 pertenece a una especie del género *Fusarium*. Es el primer reporte de *Fusarium* como productor de Hup A. El aislamiento de hongos endófitos productores de Hup A ofrece una alternativa para la producción de este alcaloide. Aunque el rendimiento de Hup A por parte de la cepa C17 es bajo, la optimización en los procesos de fermentación puede mejorar la producción de este alcaloide en futuros estudios.



## **ANTECEDENTES**

### **1.1 Demencia y enfermedad de Alzheimer**

La demencia corresponde a un trastorno de las capacidades cognitivas, acompañado de alteraciones conductuales y de disminución de la autonomía. Dos criterios fundamentales la caracterizan: la persona ha experimentado un deterioro de su nivel previo de funcionamiento cognitivo y ii) hay interferencia significativa con el trabajo o actividades sociales habituales (Knopman *et al.*, 2003). Desde el punto de vista de salud pública, las demencias constituyen uno de los grandes desafíos actuales y futuros, debido a su elevada frecuencia y a la enorme repercusión económica que provocan, transformándose en la tercera enfermedad más costosa, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Dartigues *et al.*, 2002; Leifer, 2003).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia que causa problemas con la memoria, el pensamiento y el comportamiento. Los síntomas generalmente se desarrollan lentamente y empeoran con el tiempo, hasta que son tan graves que interfieren con las tareas cotidianas. La EA es responsable de entre un 60 y un 80% de los casos de demencia. El Alzheimer no es una característica normal del envejecimiento. El factor de riesgo conocido más importante es el aumento de la edad, la mayoría de las personas con Alzheimer son mayores de 65 años. Pero el Alzheimer no es solo una enfermedad de la vejez, también se presenta en personas menores de 65 años la cual es llamada Alzheimer de inicio precoz (también conocida como Alzheimer de inicio temprano) (Alzheimer's Association).

Hasta el momento, no se ha determinado el inicio del proceso fisiopatológico de la EA, sin embargo, la disfunción neurotransmisora se propaga a medida que la enfermedad progresa. Este proceso se enfoca en estructuras de memoria cruciales, que incluyen la corteza entorrinal y el hipocampo, cortezas asociadas y redes neuronales por defecto, causando atrofia, pérdida neuronal regional y posteriormente difusa y atrofia (Selkoe y Schenk, 2003; Greicius *et al.*, 2004).

### **1.2 Déficit de Acetilcolina**

La acetilcolina (ACh) está implicada en varios procesos de memoria, existiendo en la enfermedad de Alzheimer una disminución de la concentración de este neurotransmisor en varias regiones cerebrales, tales como el núcleo de Meynert, el hipocampo y córtex parietal y frontal (Aigner, 1995; Herholz *et al.*, 2004). El déficit colinérgico ha sido correlacionado con la severidad de la enfermedad (Howes y Houghton, 2003). La disminución de la transmisión colinérgica, puede mejorarse con inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) o mediante la modulación de los receptores de acetilcolina nicotínicos y muscarínicos. (Klein, 2007).

### **1.3 Proteína BA y Tau**

Los dos rasgos patológicos característicos de la EA son los depósitos de placas extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y las marañas neurofibrilares (NFTs por sus siglas en inglés) de la proteína Tau hiperfosforilada (Xu *et al.*, 2013).

El péptido  $A\beta$  es el principal componente de los depósitos amiloides en el cerebro de pacientes con EA. El péptido  $A\beta$  es el producto de la digestión proteolítica de la proteína precursora del amiloide (APP). A pesar de que aún no se esclarece en su totalidad la función

de APP, se ha producido información acerca del procesamiento del péptido A $\beta$  y cómo éste es posteriormente eliminado en el cerebro, o puede ser también transportado hacia la periferia (Mazzitelli *et al.*, 2016). Los factores genéticos y ambientales pueden cambiar el balance entre el A $\beta$  y el APP e incrementar la producción del A $\beta$ <sub>42</sub> tóxico, los mecanismos exactos de esta alteración son desconocidos. La acumulación del A $\beta$ <sub>42</sub> es seguido por su agregación, oligomerización, formación de fibrillas y protofibrillas y la deposición en forma de placas amiloides. Luego se produce una cascada de eventos que incluyen una respuesta inflamatoria, formación de radicales libres, estrés oxidativo e hiperfosforilación de la proteína Tau para formar NFTs. Estos procesos contribuyen a la disfunción sináptica y del neurotransmisor, excitotoxicidad y eventualmente a la muerte neuronal (Cummings, 2004; Rosenberg, 2005).

#### **1.4 Factores genéticos**

El mayor factor de riesgo en la EA es la vejez, como lo demuestra claramente su epidemiología. Sin embargo, aproximadamente en el 3% de los casos, la EA es causada por mutaciones genéticas relacionadas con la síntesis y el metabolismo del A $\beta$  (Bertram y Tanzi, 2008).

Un factor de riesgo adicional es la apolipoproteína E e4 (ApoE e4). Esta es una de las tres formas del gen ApoE, el cual codifica un importante transportador de colesterol en la sangre y el sistema nervioso central. Aquellos que heredan uno de los genes ApoE e4 tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar la EA, mientras que aquellos con dos genes ApoE e4 tienen un riesgo de 12 a 15 veces mayor (Raber *et al.*, 2004).

## 1.5 Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado dos tipos de medicamentos: inhibidores de la colinesterasa (ChE) (Aricept®, Exelon®, Razadyne®) y memantina (Namenda®), para tratar los síntomas cognitivos (pérdida de memoria, confusión y problemas con el pensamiento y razonamiento) de la EA (Alzheimer's Association).

Los inhibidores de la ChE retrasan la inactivación de la acetilcolina después de su liberación sináptica, y representan el único tratamiento aprobado que resulta en un beneficio clínico significativo (Figura 1) (Greg *at al.*, 2001). Hay cuatro inhibidores de la ChE disponibles para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer: tacrina, donepezilo, galantamina y rivastigmina (Cuadro 1).

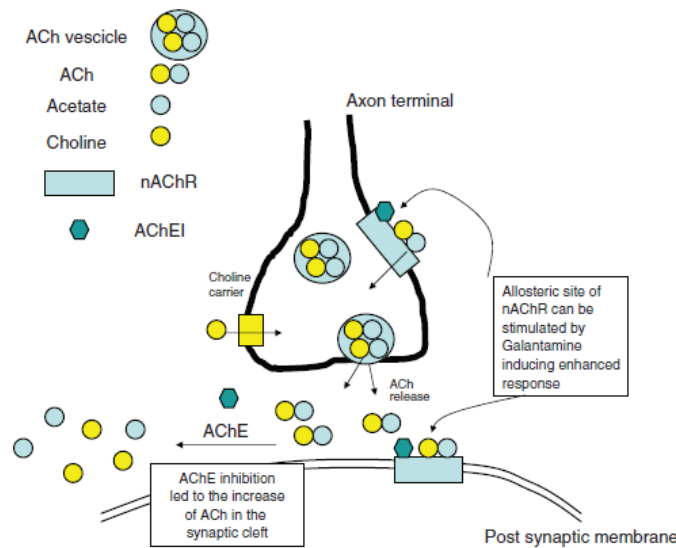


Figura 1 Representación del modo de acción de los inhibidores de la AChE

(Dall'Acqua, 2013).

Cuadro 1. Fármacos utilizados para el tratamiento del Alzheimer (Mangialasche *et al.*, 2010).

Fármaco	Estado de la enfermedad	Actividad sintomática	Actividad neuroprotectora potencial
<b>Donepezil</b>	Todos los estados	AChEI	Posible decremento en la toxicidad inducida por A $\beta$ y en la producción de A $\beta$ ; modula la expresión de isoformas de AChE; incrementa la expresión de receptores nicotínicos.
<b>Rivastagmina</b>	Leve o moderada	AChEI y BChEI	
<b>Galantamina</b>	Leve o moderada	AChEI (modulación en los receptores nicotínicos)	
<b>Huperzina A</b>	Aprobado en China para etapa leve a moderada; suplemento dietético en algunos países.	AChEI	Modula el procesamiento del APP al potenciar la secreción soluble del APP $\alpha$ ; antioxidante, efectos anti-apoptóticos, protección mitocondrial.
<b>Antagonistas del receptor NMDA: mejoran la cognición, el comportamiento y el estado funcional.</b>			
<b>Memantina</b>	Moderada a severa	No competitivo, receptor Antagonista NMDA dependiente de voltaje	Disminuye la toxicidad por A $\beta$ ; previene la hiperfosforilación de la proteína Tau; disminuye la microglía asociada a la inflamación, aumenta la liberación de factores neurotróficos de la astrogliá.

Los efectos adversos más frecuentes consisten en una extensión de los efectos colinérgicos en los diferentes órganos; aparecen con mayor frecuencia al aumentar rápidamente las dosis de los medicamentos. Se podrían observar fasciculaciones musculares, palidez, sudoración, miosis, salivación, constricción bronquial, vómitos, diarrea y debilidad muscular, hasta el punto de que se podría confundir con una crisis miasténica (Flores, 1997). En el caso de los fármacos que son selectivos para el sistema nervioso central, los efectos son mucho menos frecuentes.

## 1.6 Huperzina A

### 1.6.1 Descubrimiento

El alcaloide de licopodio Hup A (Figura 2) fue aislado por primera vez de la planta medicinal china *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev., por Liu *et al.* (1986). Este helecho ha sido usado en China para el tratamiento de contusiones, esguinces, inflamaciones, esquizofrenia, miastenia gravis y envenenamiento por organofosforados (Bai, 2007).

Científicos chinos seleccionaron nuevos fármacos de especies de licopodios de la medicina tradicional China para el tratamiento de miastenia gravis, sin embargo, se observaron diferentes grados de efectos secundarios colinérgicos durante las aplicaciones y ensayos clínicos. Por lo que se llevaron a cabo investigaciones para encontrar los compuestos químicos responsables de dicho efecto. Yu *et al.* (1982a, 1982b) aislaron tres alcaloides de licopodio (lycodoline, lycoclavine y serratinine) de *Lycopodium serratum* (Thunb. Ex Murray), un sinónimo de *H. serrata*. Estos tres alcaloides no mostraron un efecto relajante muscular marcado.

Así es como Hup A fue aislada por primera vez de *H. serrata*, un miembro de la familia Huperziaceae. Así mismo, las estructuras de Hup A y B y su marcada actividad AChE fueron demostradas por Liu *et al.* (1986a, 1986b). El primer ensayo clínico de Hup A para el tratamiento de pacientes de edad avanzada con deterioro de la memoria fue reportado por Zhang *et al.* (1986). Asimismo, un estudio farmacológico *in vivo* del efecto de Hup A sobre el proceso de aprendizaje y recuperación de la conducta discriminatoria en ratas fue reportada por Tang *et al.* (1986) y por Wang *et al.* (1986a). Wang *et al.* (1986b) también reportaron el primer ensayo farmacológico *in vitro* sobre la actividad anticolinesterasa de Hup A. Después de que se revelara que Hup A era un inhibidor de la AChE, atrajo la atención mundial,

derivándose todo tipo de estudios desde la síntesis química, relación actividad-estructura, farmacología y estudios relacionados.

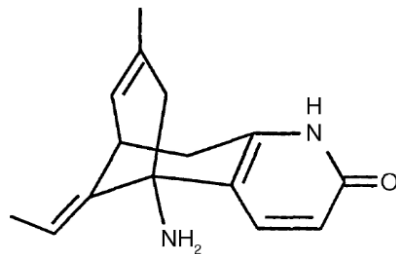


Figura 2 Estructura de Huperzina A ([5R-(5<sub>S</sub>,9<sub>S</sub>,11E)]-5-amino-11-ethylidene-5,6,9,10-tetrahidron-7-metil-5,9-metano-cicloocta[b]piridina-2-(1H)-ona).

### 1.6.2 Antecedentes farmacológicos

Hup A es un inhibidor potente, reversible y selectivo de la AChE, el cual tiene un mecanismo de acción similar al donepezil, rivastagmina y galantamina (Wang *et al.*, 1986), este alcaloide presenta alta especificidad a la enzima y un elevado tiempo de vida media (Wang y Tang, 1998; Liu *et al.*, 1986).

Los ensayos clínicos realizados con Hup A han demostrado que produce mejoras significativas en las deficiencias de memoria en pacientes ancianos y con EA. La mayoría de estos estudios se han realizado en China, donde se estima que 100,000 personas han sido tratadas con HupA. Los resultados de estos estudios indican que Hup A es un fármaco efectivo y seguro que mejora la función cognitiva (Chiu and Zhang, 2000).

Se evaluó la actividad anticolinesterasa *in vivo* de Hup A en ratas, se observó una inhibición significativa de la AChE en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, así como una inhibición dependiente de la dosis de la AChE por HupA en la región cerebral. A diferencia

del donepezilo y la tacrina, Hup A presentó una mayor biodisponibilidad oral (Cheng y Tang, 1998; Wang y Tang, 1998).

Los estudios que utilizan la técnica de microdiálisis en ratas mostraron que HupA elevaba de forma dependiente de la dosis el nivel de ACh en la corteza. El curso temporal de la inhibición cortical de AChE por HupA se correlaciona positivamente con el aumento de ACh. De acuerdo con las dosis de inhibidores, Hup A fue 8 y 2 veces más potente que donepezil y rivastigmina, respectivamente, en niveles crecientes de ACh cortical con un efecto de mayor duración (Liang y Tang, 2004).

El efecto de mejora de HupA en los déficits de memoria es más potente en la memoria de trabajo que en la memoria de referencia comparado con donepezil y tacrina. Este efecto puede ser beneficioso en el tratamiento de la EA, porque los déficits cognitivos en los pacientes con EA son severos para la memoria de corto plazo (Xiong *et al.*, 1998; Ou *et al.*, 2001; Wang y Tang, 1998).

Estudios farmacológicos han demostrado que Hup A posee diferentes bioactividades además de la inhibición de la AChE. Estos efectos no colinérgicos, incluidos el efecto antagonista sobre el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), la protección de las células neuronales contra la citotoxicidad y la apoptosis inducida por  $\beta$ -amiloide, radicales libres e isquemia hipóxica, también podrían ser importantes en el tratamiento de la EA (Jiang *et al.*, 2003). Curiosamente, el efecto neuroprotector de HupA no está correlacionado con la inhibición de AChE, lo que sugiere que el efecto terapéutico de HupA puede ejercerse a través de un mecanismo de múltiples blancos (Wang y Tang, 1998; Bai *et al.*, 2005).



HupA tiene una mejor penetración a través de la barrera hematoencefálica, una mayor biodisponibilidad oral y una mayor duración de la inhibición de la AChE en comparación con otros inhibidores de AChE conocidos. Los ensayos clínicos han demostrado que Hup A produce mejoras significativas en los déficits de memoria en pacientes ancianos y con EA (Bai, 2007).

### **1.6.3 Fuente de obtención**

La planta fuente original de Hup A, *H. serrata* pertenece a la familia Huperziaceae de acuerdo al sistema taxonómico de Ching (1978). Huperziaceae fue separada taxonómicamente de *Lycopodium* (s. L.) por Rothmaler (1944) y comprende dos géneros, *Huperzia* y *Phlegmariurus*, con un total de alrededor de 150 especies en todo el mundo. Este sistema taxonómico se utiliza en muchos países, por ejemplo, en China, y está respaldado por análisis quimiotaxonómicos (Ma *et al.*, 1998). *Lycopodium* (s. L.) es un grupo grande con alrededor de 500 especies que se conocen comúnmente como club de helechos (Ching, 1978).

Sin embargo, un sistema taxonómico común de *Lycopodium* (s.l.) no se ha adoptado en todo el mundo. Se han propuesto tres sistemas taxonómicos para *Lycopodium* (s.l.) incluyendo el de Ching (Ching, 1978), el de Holub (Holub, 1985) y Ollgaard (Ollgaard, 1989) (Cuadro 2).

Hup A no solo se produce en *H. serrata*, sino también en otras especies de Huperziaceae que tienen una estrecha relación taxonómica con *H. serrata* (Ma *et al.*, 1998). La distribución de esta familia de plantas es global, pero estas plantas se encuentran en relativamente mayor abundancia en los hábitats tropicales de América. En China, se distribuyen principalmente en el área a lo largo del río Yangtze y en todo el sur. Sin embargo, estas plantas no son abundantes y solo se encuentran en hábitats muy especializados. También crecen lentamente,

normalmente requieren de 15 a 20 años desde la germinación de las esporas hasta la madurez. Debido a los grandes beneficios para la salud que proporcionan estas plantas, *H. serrata* ha sufrido una extensa sobreexplotación en los últimos años, lo que pronto puede llevarla a la extinción (Ma and Gang, 2004).

Cuadro 2. Clasificaciones taxonómicas más utilizadas de los Licopodiales (Ma *et al.*, 2007).

<b>Ching (1978)</b>	<b>Holub (1985)</b>	<b>Ollgaard (1989)</b>
Familia Huperziaceae Género Huperzia Género Phlegmariurus	Familia Huperziaceae Género Huperzia	Familia Lycopodiaceae Género Huperzia Género Lycopodium Género Lycopodiella Género Phylloglossum
Familia Lycopodiaceae Género Lycopodium Género Diphasiastrum Género Palhinhaea Género Lycopodiella Género Lycopodiostrum	Familia Lycopodiaceae Género Lycopodium Género Lycopodiella Género Lycopodiostrum Género Diphasiopsis Género: Pseudolycopodium Género Diphasium Género Diphasiastrum Género Palhinhaea Género Lateristochys Género Phylloglossum	

### 1.7 *Phlegmariurus taxifolius*

El género *Phlegmariurus* es por mucho, el más rico en especies en la familia Lycopodiaceae (según la clasificación de Ollgaard, 1989), exhibe una excepcional diversidad morfológica y ecológica, especialmente en el clado neotropical. A pesar del extenso estudio taxonómico, las relaciones entre muchas especies y grupos de especies han permanecido inciertas, especialmente entre la taxa andina de gran altitud (Testo *et al.*, 2018).

Las plantas son terrestres, saxícolas o epifíticas, producen sus raíces a lo largo del tallo, migrando por la corteza para emerger en las zonas de contacto con el sustrato. Tiene tallos

erectos a péndulos, ramificados o raramente simples. Tallos con licofilos monomorfos, con esporofilos y trofofilos similares, o subdimorfos, con los esporofilos muy reducidos dispuestos en ramificaciones terminales. Esporangios axilares, reniformes, isovalvados. Esporas con la línea ecuatorial convexa a casi plana entre las lesuras y ángulos obtusos o agudos. Gametófito micorrícico, ramificado, con pelos pluricelulares entre los gametangios (Arana y Ollgaard, 2012).

Recientemente, Testo *et al.* (2018) reconoció la subfamilia Huperzioideae, de la familia Lycopodiaceae, que está formada por tres géneros: *Phlegmariurus*, *Huperzia* y *Phylloglossum* (Figura 3). El género *Phlegmariurus* está compuesto por aproximadamente 250 especies y es el más numeroso de la familia Lycopodiaceae. En el caso particular de *Huperzia taxifolia*, se ha reclasificado como *Phlegmariurus taxifolius*. Por lo que, para fines de este trabajo de investigación se referirá a *H. taxifolia* como *P. taxifolius*.

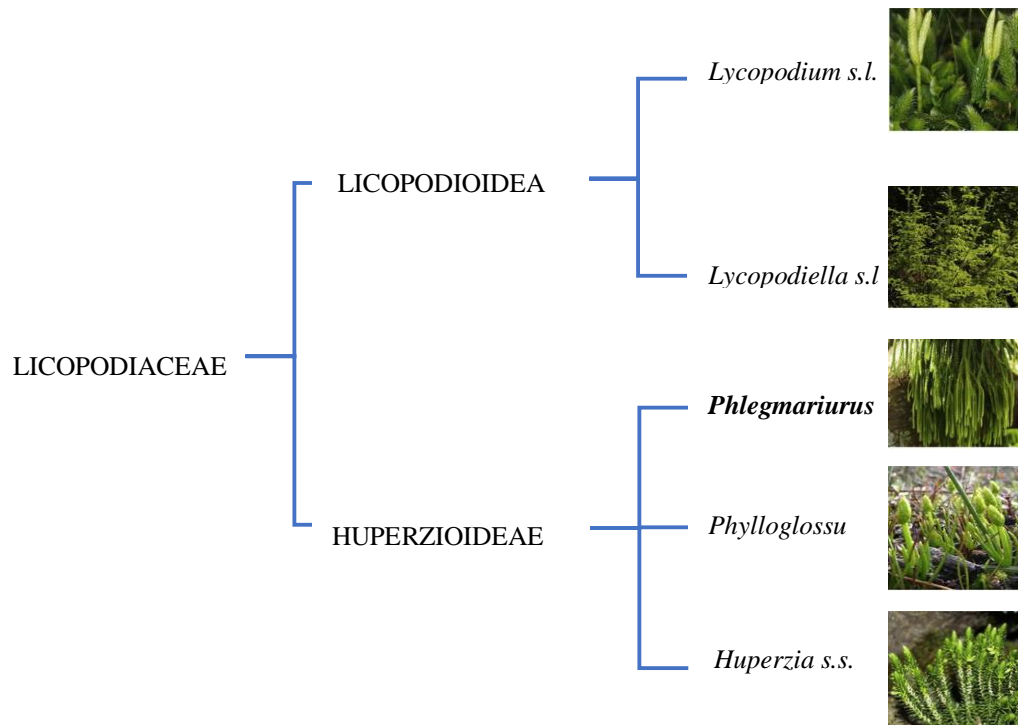


Figura 3. Clasificación taxonómica de la subfamilia Huperzioideae.

## 1.8 Hongos endófitos

La palabra “endófito” proviene de la palabra griega “endón”, que significa dentro y “phyton” que significa planta, es decir “dentro de la planta”. Los hongos endófitos son un grupo ecológico que colonizan el interior de las plantas sin causarles síntomas de enfermedad. Son ubicuos, comparten con su hospedero relaciones simbióticas, mutualistas, comensalistas y trofobióticas (Tan y Zhou, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

El término endófito se refería a cualquier organismo que colonizara el interior de los tejidos de las plantas, sin embargo, Wilson (1995) restringió el término únicamente a bacterias y hongos que no provocan daño aparente a la planta hospedera. En la actualidad, el término endófito engloba a bacterias, hongos, algas e insectos (Tan y Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009).

Los hongos endófitos de pastos fueron observados por primera vez a finales del siglo XIX, En semilla de *Lolium temulentum*, *Lolium arvense*, *Lolium linicolum* y *Lolium remotum* (Guerin, 1898; Hanausek, 1898; Vogl, 1898). Desde su primer descubrimiento, investigadores se plantearon la hipótesis de que había un vínculo entre los cuadros tóxicos que experimentaban los animales que consumían pastos infectados con hongos endófitos. Sin embargo, esta hipótesis se comprobó hasta que Bacon et al. (1977) vincularon al endófito *Neotyphodium coenophialum* con la alta incidencia de una intoxicación del ganado denominada “síndrome de verano” debida al consumo de pastos de la especie *Festuca arundinaceae*, la cual, no presentaba síntomas de enfermedad.

Posteriormente Clay (1988) propuso que los hongos endófitos son mutualistas defensivos de los pastos. A medida que esta hipótesis se hizo ampliamente conocida, las investigaciones

sobre historia natural, evolución, ecología y fisiología de los hongos endófitos continuó (Rodríguez *et al.*, 2009).

### **1.8.1 Clasificación de los hongos endófitos**

Los hongos endófitos pueden ser divididos en dos grandes grupos: clavicipitáceos y no-clavicipitáceos. Los clavicipitáceos generalmente están distribuidos en pastos hospederos, muchas especies de clavicipitáceos son transmitidos verticalmente de forma sistémica a la siguiente generación a través de las semillas de su planta hospedera (ejemplos de hongos clavicipitáceos: *Epichloe* sp. y *Neotyphodium* sp.). Los hongos no-clavicipitáceos están compuestos por una amplia gama de especies de varias familias, todas ellas del subreino Dikarya (Ascomycota o Basidiomycota). No se distribuyen sistémicamente, pero están presentes en casi todas las especies de plantas, incluidos los pastos (Padhi *et al.*, 2013).

Rodríguez *et al.* (2009) clasificaron a los hongos endófitos tomando en cuenta su taxonomía, su planta hospedera, su evolución y sus funciones ecológicas. De igual manera, los clasificaron en clavicipitáceos y no-clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de los hongos endófitos según Rodríguez *et al.*, 2009.

Criterio	Clavicipitáceos	No Clavicipitáceos		
	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
<b>Rango de hospederos</b>	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
<b>Tejidos que colonizan</b>	Tallo y rizomas	Tallo, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores, frutos	Raíces
<b>Colonización <i>in planta</i></b>	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
<b>Biodiversidad <i>in planta</i></b>	Baja	Baja	Alta	Desconocida
<b>Transmisión*</b>	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
<b>Función ecológica</b>	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia a la sequía y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementan la biomasa de la planta, confieren tolerancia al estrés biótico y abiótico y protegen contra los hongos patógenos por acción de los metabolitos secundarios	Inducen resistencia a las enfermedades, protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de los metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros
*Transmisión de hongos endófitos en las plantas: vertical, a través de semillas, y horizontal, se adquieren del medio ambiente.				

### 1.8.2 Relaciones planta-endófito

La hipótesis “antagonismo balanceado” (Schulz *et al.*, 1999) propone que la colonización asintomática es un balance de antagonismos entre el hospedero y el endófito. Los endófitos y los patógenos poseen muchos factores de virulencia que son contrarrestados por los mecanismos de defensa de la planta. Si la virulencia del hongo y la defensa de la planta están balanceadas, la asociación permanece aparentemente asintomática y avirulenta. Esta fase es solo un período transitorio donde los factores ambientales juegan un papel importante para desestabilizar el delicado balance de antagonismo. Si los mecanismos de defensa de la planta contrarrestan por completo los factores de virulencia fúngica, el hongo perecerá. Por el contrario, si la planta sucumbe a la virulencia del hongo, una relación planta-patógeno conduciría a la enfermedad de la planta. Debido a que muchos endófitos podrían ser

patógenos latentes, podrían estar influenciados por ciertos factores intrínsecos o ambientales para expresar factores que conducen a la patogenicidad (Arnold, 2008). Recientemente, se reveló que la interacción planta-endófito podría no ser solo el balance entre virulencia y defensa, sino una interacción mucho más compleja y controlada con precisión (Kusari *et al.*, 2012).

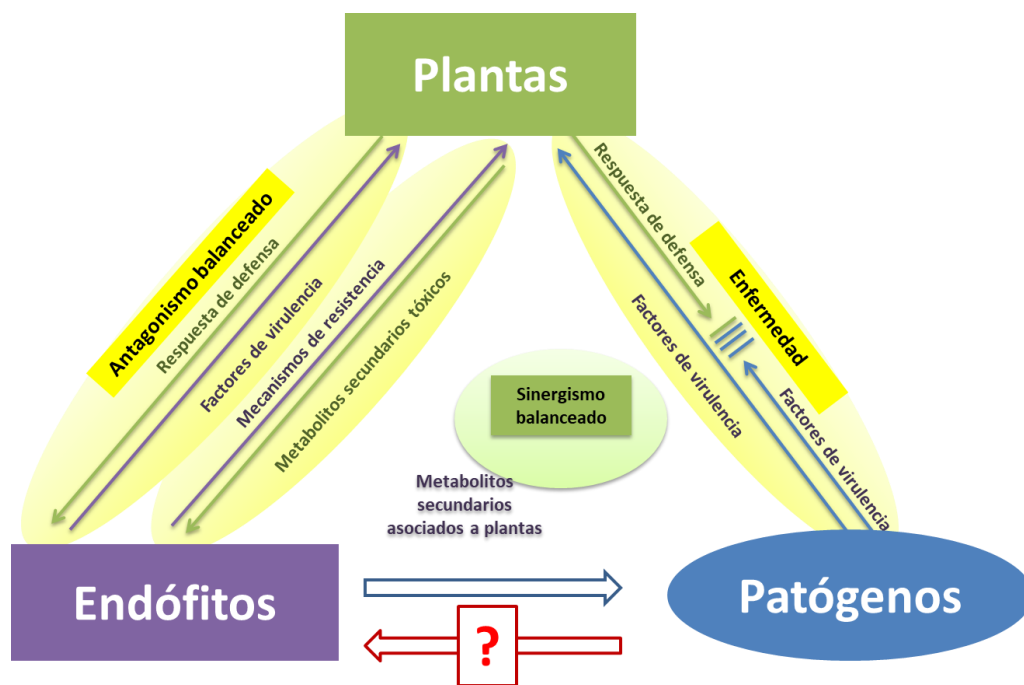


Figura 4. Interpretación de las interacciones planta-hongo (Kusari *et al.*, 2012).

Se ha observado que los hongos endófitos pueden contribuir a la protección de su planta hospedera contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), Sánchez et al. (2013) describe tres mecanismos:

1) Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.

2) Indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.

3) Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación.

### **1.8.3 Producción de compuestos bioactivos por hongos endófitos**

La estrecha relación que existe entre el endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos. Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina (Sánchez *et al.*, 2013).

En las últimas dos décadas, se han descubierto con éxito compuestos bioactivos valiosos, con actividades antimicrobianas, insecticidas, citotóxicas y anticancerígenas a partir de hongos endofíticos. Durante el largo período de coevolución, se desarrolló una relación amigable entre el endófito y su planta hospedera. Algunos endófitos tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos iguales o similares a los producidos por su planta hospedera (Zhao *et al.*, 2010). En el cuadro 4 se muestran algunos ejemplos de compuestos bioactivos de interés farmacéutico producidos por hongos endófitos.



Cuadro 4. Compuestos bioactivos producidos por hongos endófitos.

HONGO ENDÓFITO	PLANTA HOSPEDERA	COMPUESTO BIOACTIVO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<i>Alternaria sp.</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Taxus cuspidata</i> <i>Taxus chinensis var. Mairei</i> <i>Podocarpus sp.</i>	Paclitaxel (taxol)	Anticáncer	Strobel <i>et al.</i> , 1996. Kim <i>et al.</i> , 1999. Tian <i>et al.</i> , 2006.
<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Penicillium sp.</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i> <i>Sabina recurva</i> (= <i>Juniperus recurva</i> ) <i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Podofilotoxina	Anticáncer, antiviral, antioxidante, antibacterial, antireumático, inmunoestimulador	Yang <i>et al.</i> , 2003. Kour <i>et al.</i> , 2008.
<i>Entrophospora infrequens</i> <i>Fusarium solani</i>  <i>Neurospora sp.</i>	<i>Nothapodytes foetida</i> <i>Camptotheca acuminata</i> – <i>Nothapodytes foetida</i>	Camptotecina	Antineoplásico	Puri <i>et al.</i> , 2005. Rehman, <i>et al</i> 2008. Kusari <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria sp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharanthus roseus</i> <i>C. roseus</i>	Vinblastina	Anticáncer	Guo <i>et al.</i> , 1998. Zhang <i>et al.</i> , 2000.

#### **1.8.4 Producción de Hup A por hongos endófitos**

Un antecedente inmediato respecto a la producción de Hup A por hongos endófitos es el trabajo realizado por Wang *et al.* (2011), donde aislaron 127 hongos endófitos de la planta *Huperzia serrata*. A nivel *in vitro*, 39 aislados mostraron inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), de los cuales 9 fueron capaces de producir Hup A. El hongo identificado como *Shiraira* sp. mostró el mayor rendimiento en la producción de Hup A, con 142 µg/g PS en caldo papa dextrosa (PDB). Zhang *et al.* (2011) también aislaron de hojas de *H. serrata* el hongo endófito *Cladosporium cladosporioides*, el cual produjo 56.84 µg/L de Hup A en PDB. A nivel *in vitro* la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa producida por la Hup A de *C. cladosporioides* (78%) fue muy similar a la auténtica Hup A (79%). Sin embargo, el extracto metanólico fúngico exhibió mayor actividad inhibitoria (90%) que la propia Hup A, esto sugiere que existen otros inhibidores de la AChE en adicción a la Hup A que confieren un efecto sinérgico o aditivo a la actividad inhibitoria. En los últimos años ha aumentado el interés por el aislamiento de hongos endófitos productores de Hup A, en el siguiente cuadro se muestran los hongos endófitos productores de dicho alcaloide.

Cuadro 5. Hongos endófitos aislados de especies de la familia Huperziaceae productores de Hup A.

Hongo	Planta hospedera	Rendimiento Hup A	Referencia
-	<i>Huperzia serrata</i>	182.6 µg/g PS*	Ma <i>et al.</i> , 2005.
<i>Shiraia sp.</i>	<i>H. serrata</i>	142 µg/g PS	Zhu <i>et al.</i> , 2010.
<i>Ceriporia lacerata</i>	<i>Phlegmariurus phlegmaria</i>	40.53 µg/L PS	Zhang <i>et al.</i> , 2015.
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>H. serrata</i>	37.63 µg/g PS	Dong <i>et al.</i> , 2014.
<i>Colletotrichum gloeosporioides ES026</i>	<i>H. serrata</i>	32.75 µg/g PS	Zhao <i>et al.</i> , 2013.
<i>Colletotrichum gloeosporioides ES026</i>	<i>H. serrata</i>	1 µg/g PS	Shu <i>et al.</i> , 2014.
<i>Paecilomyces tenius YS-13</i>	<i>H. serrata</i>	21 µg/g PS	Su y Yang, 2015
<i>Alternaria brassicae AGF041</i>	<i>H. serrata</i>	42.89 µg/g PS	Zaki <i>et al.</i> , 2019
<i>Botrytis sp.</i> <i>Blastomyces sp.</i>	<i>P. cryptomerianus</i>	20–30 µg/g PS	Zan <i>et al.</i> , 2009.

\*PS: Peso seco de micelio.

## JUSTIFICACIÓN

Las plantas han sido usadas por miles de años en la medicina tradicional y todavía son usadas para beneficiar la salud. En nuestros días, las plantas medicinales se explotan para el aislamiento de medicamentos derivados de plantas, ya que son muy efectivas y tienen efectos secundarios relativamente menores. Sin embargo, los recursos naturales de las plantas medicinales se agotan gradualmente y el acceso a los compuestos bioactivos de las plantas se ve desafiado por los bajos niveles de estos productos que se acumulan en las plantas medicinales nativas (Venieraki *et al.*, 2017). En el caso específico de las plantas de la familia Huperziaceae, tienen un contenido muy bajo de Hup A, distribución limitada y crecimiento extremadamente lento. Estas especies de helechos actualmente se encuentran en peligro de extinción debido a la sobreexplotación y los métodos de propagación *in vitro* aún no han sido exitosos para generar una fuente de Hup A, además la síntesis química de este compuesto es económicamente inviable.

La Hup A es un compuesto con alto valor agregado y ampliamente utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en China. Una de las grandes ventajas que representa la disponibilidad de un sinnúmero de microorganismos endófitos capaces de sintetizar un fármaco o un agroquímico potencial, es evitar la necesidad de cultivar o coleccionar especies vegetales silvestres, así como reducir el costo de producción de los principios activos. Por tales motivos los hongos endófitos representan una nueva fuente para el aislamiento de moléculas bioactivas como la Hup A. El medio de cultivo para organismos fúngicos (comparado con el de células vegetales) es simple, sin abundantes suplementos y el costo de producción es relativamente bajo, el periodo de fermentación es corto y las

condiciones del cultivo pueden ser controladas. También muchas estrategias podrían ser adoptadas para aumentar la eficiencia en la producción de compuestos bioactivos, tales como alimentación de precursores, adición de elicitores bióticos o abióticos, así como inhibidores y otras sustancias a través de investigación de ingeniería metabólica.

Los resultados de este trabajo aportarán datos útiles que encaminarán el desarrollo de estrategias biotecnológicas, que podrán permitir la producción sustentable y racional de Hup A y/o de compuestos relacionados con la actividad anticolinesterásica.

## **HIPÓTESIS**

Los hongos endófitos aislados de la especie vegetal *Phlegmariurus taxifolius* producen Hup A.

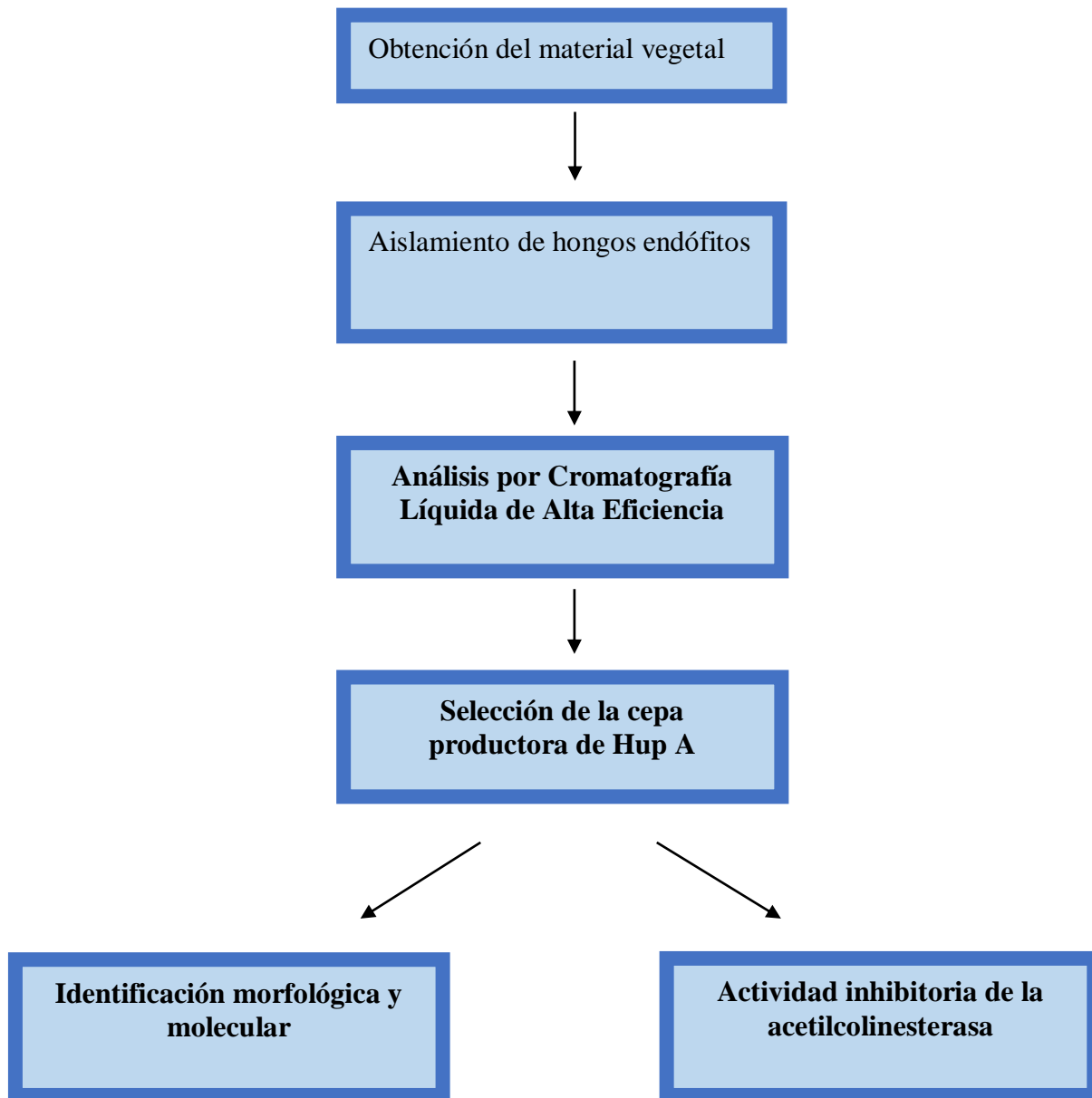
## **OBJETIVO GENERAL**

Aislar hongos endófitos productores de Hup A, a partir de muestras vegetales de la especie *Phlegmariurus taxifolius*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Aislar los hongos endófitos en medios selectivos.
- b) Identificar y cuantificar la producción de Hup A de los aislados mediante Cromatografía de Alta Eficiencia (CLAE).
- c) Evaluar a nivel *in vitro* la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de la cepa seleccionada.
- d) Identificar morfológicamente y mediante técnicas moleculares la cepa productora de Hup A seleccionada.

## METODOLOGÍA



## 2.1 Materiales y métodos

### 2.1.1 Colecta del material vegetal.

*P. taxifolius* se obtuvo en el mercado del municipio de Coatepec, Veracruz, en julio de 2012 y fue identificada por el Mtro. Aniceto Mendoza Ruiz del Laboratorio de Pteridofitas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Una exicata de la muestra fue depositada en el Herbario HUMO de la UAEM, con el número de voucher 39243.



Figura 5. Plantas de *P. taxifolius*

### 2.1.2 Aislamiento de los hongos endófitos.

Para la esterilización del material vegetal se siguió la metodología descrita por Bayman *et al.*, (1996). Las plantas se lavaron con agua de la llave y se tomaron muestras de hoja, tallo y raíz, que fueron sumergidas en etanol al 75% por 1 min, NaClO al 3.4% por 10 min, etanol al 75% por 30 s, seguido de 5-6 lavados con agua destilada estéril. Para el aislamiento de los hongos endófitos se siguió la metodología descrita por Wang *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Las raíces y tallos se cortaron en piezas de 0.5 cm de largo y las hojas en piezas de 0.5 cm<sup>2</sup>, las cuales se transfirieron a cajas Petri con distintos medios: agar dextrosa y papa (PDA), agar extracto de malta (AEM), agar harina de maíz (AHM) y agar agua (AA). A estos medios se les adicionó 60 µg/mL de estreptomycin y 100 µg/mL de ampicilina. Las



cajas Petri se incubaron a 28 °C en oscuridad al menos 10 días. Cuando fue visible el crecimiento fúngico, se tomaron muestras por el método de punta de hifa y se pasaron a cajas con nuevo medio de cultivo.



Figura 6. Metodología para el aislamiento de hongos endófitos.

### **2.1.3 Fermentación y preparación de los extractos fúngicos.**

Se llevó a cabo la metodología descrita por Wang *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Los aislados fúngicos se inocularon en matraces de 250 mL con 100 mL de caldo papa dextrosa (PDB) por triplicado, y se cultivaron a 120 rpm a 28-29 °C por 14 días en una incubadora-agitadora orbital. Posteriormente el medio líquido se eliminó por filtración con gasas estériles y se cosechó el micelio, el cual se secó en una estufa a 45 °C durante 15 horas. El micelio seco (1 g) se pulverizó con ayuda de un mortero y se le adicionó 50 mL de etanol al 75%. La extracción se realizó por triplicado en un sonicador a 40 °C durante 30 minutos. El extracto fúngico se filtró y concentró en un rotaevaporador a 40 °C. El residuo seco se disolvió en 50 mL de ácido clorhídrico al 2.5%, que se extrajo por agitación tres veces con cloroformo. A la fase acuosa se le adicionó una solución de hidróxido de amonio al 25 % (pH 9) y después se extrajo exhaustivamente con cloroformo, posteriormente el extracto clorofórmico se evaporó a sequedad.



Figura 7. Obtención de los extractos fúngicos alcaloides.

#### **2.1.4 Identificación química de Hup A mediante CLAE y CL-EM**

El extracto alcaloideo se disolvió en 1 mL de metanol y se pasó a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  antes del análisis cromatográfico. Se utilizó una columna fase reversa ODS-C<sub>18</sub>. (C18 MGIIS-5 4.6 mm X 250 mm). Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto alcaloideo, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La fase móvil estuvo compuesta por agua (modificada con ácido trifluoroacético 100:0.0125 v/v): acetonitrilo (85:15 v/v). La detección de los compuestos fue monitoreada a 310 nm. Para la cuantificación se usó una curva del estándar de Huperzina A ((-)-huperzine A, Sigma Aldrich) en un intervalo de concentraciones de 0.1-50  $\mu\text{g/mL}$ , siguiendo los parámetros de resolución de  $R_s > 2$  y una linealidad de  $r^2 = 0.9955$ .

Para el análisis por CL-EM se usó el equipo Performance de Agilent (1290 Infinity II) el cual fue equipado con un Columna Agilent Eclipse Plus C18 RRHD (2.1  $\times$  50 mm, tamaño de partícula 1.8  $\mu\text{m}$ ). El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$  del extracto alcaloideo de C17 (3 mg/ml en metanol). La columna se eluyó usando agua desionizada con ácido fórmico al 0,025% y acetonitrilo, grado UHPLC, a 85:15 v / v, con una velocidad de flujo de 0,25 ml / min. El análisis de espectrometría de masas se realizó en el equipo Agilent 6545 QTOF equipado con una fuente de ionización por electropulverización, en modo positivo.

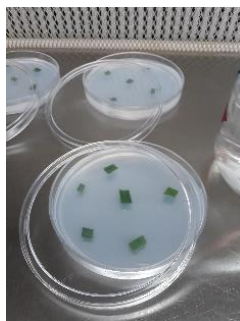
#### **2.1.5 Identificación morfológica**

El aislado C17 previamente seleccionado por la presencia de Hup A mediante el análisis por CLAE se inoculó en una caja Petri con medio PDA y se mantuvo a 28 °C por 10 días en oscuridad. Para la observación de esporas, el hongo se inoculó en agar hoja de clavel (CLA por sus siglas en inglés) como lo describe Leslie *et al* (2006) (Figura 7). Se prepararon cajas Petri con agar al 2% y se colocaron sobre la superficie hojas de clavel estériles (3-5  $\text{mm}^2$ ), el hongo se inoculó cerca de las piezas de las hojas de clavel y se incubó a 28°C por 10 días a

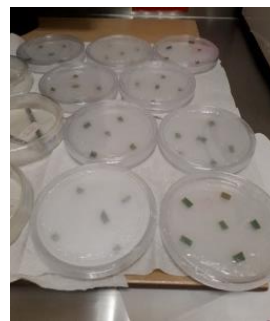
luz constante. Las esporas y otras estructuras se observaron con un microscopio óptico (LEICA DM500) con una ampliación de 100x usando aceite de inmersión.



Esterilización de  
hojas de clavel con  
NaClO al 0.5%



Preparación de  
CLA



Inoculación de C17  
en CLA

Figura 8. Preparación del medio CLA para inoculación de las esporas de C17.

### 2.1.6 Identificación molecular

Para la identificación molecular, el aislado C17 se inoculó en matraces de 250 mL con 100 mL de caldo papa dextrosa (PDB) a 120 rpm a 28-29 °C por 14 días en oscuridad. El micelio se filtró con gasas estériles y se llevó a cabo la extracción de ADN genómico (ADNg) con el kit *Quick-gDNA<sup>TM</sup>MiniPrep* (No. Catalogo D3007) de Zymo Research siguiendo el protocolo de manufactura. El ADNg fue visualizado en un gel de agarosa al 1% para verificar su calidad. La concentración del ADNg se determinó en un Nano Drop One (Thermo Scientific). La muestra de ADN se envió a MacroGen Inc. para su amplificación y secuenciación con los primers universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

A partir de las secuencias obtenidas se determinó una secuencia consenso, la cual se depositó en el Gen Bank con número de acceso MK560083. La identificación se realizó utilizando

Blast en la base de datos de Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), teniendo en cuenta las secuencias de hongos con las puntuaciones más altas de identidad. Se seleccionaron secuencias de otros hongos para llevar a cabo el análisis filogenético, las secuencias se alinearon usando Clustal W con los parámetros predeterminados y el análisis filogenético se realizó mediante el programa MEGA 7.0. El árbol filogenético se generó usando el método Neighbor Joining y se editó con el programa iTOL (<http://itol.embl.de/>).

### 2.1.7 Ensayo *in vitro* de la actividad inhibitoria de la AChE.

La actividad *in vitro* de la AchE del extracto fúngicos alcaloideo se comparó con el estándar de Hup A (Figura 8). Se siguió la metodología descrita por Ellman *et al.* (1961) con algunas modificaciones. Un volumen de preincubación de 190  $\mu\text{L}$  de búfer de fosfatos (100 mM, pH 8), conteniendo 10  $\mu\text{L}$  del extracto fúngico o 10  $\mu\text{L}$  de (-)-huperzine A (Sigma-Aldrich), 10  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoico 0.5 mM (DTNB) (Sigma-Aldrich) y 10  $\mu\text{L}$  de AChE (EC 3.1.1.7 Type VI-S, Sigma, 0.16 U/mL), la mezcla se incubó por 30 min a 25°C. Seguida de la preincubación se añadieron 10  $\mu\text{L}$  del substrato acetiltiocolina 20 mM para iniciar la reacción enzimática. Después de 5 min de iniciada la reacción la hidrólisis del substrato se monitoreó a 412 nm por la formación de ácido 5-thio-2-nitrobenzoico. Se utilizaron placas de 96 pozos y un espectrofotómetro (SpectraMax® iD3). El porcentaje de inhibición fue calculada usando la fórmula:

$(\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia de la muestra}) / \text{absorbancia del control} \times 100$ .

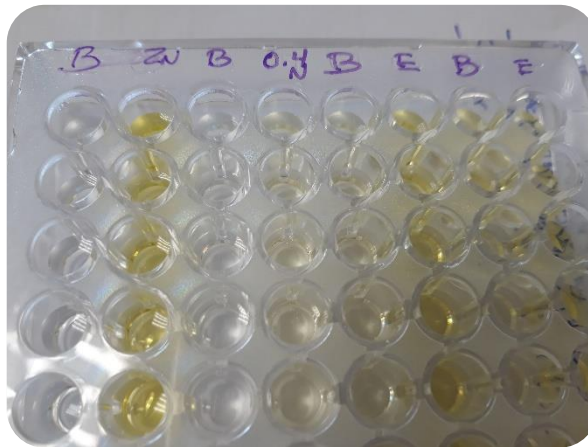


Figura 9. Ensayo *in vitro* de inhibición de la AChE.

## RESULTADOS

### 3.1 Aislamiento de hongos endófitos.

Después de 15 días a partir de la siembra de las muestras vegetales se obtuvieron 22 aislados fúngicos de diferentes partes de la planta, así como en diferentes medios (Figura 9). Se observó que en medio PDA se aisló el mayor número de hongos, principalmente de raíz. En los medios AEM y AHM se aisló el mismo número de hongos, sin embargo, en el medio AEM no se aislaron hongos de tallo y en medio AHM sólo se obtuvieron hongos de hoja (Cuadro 6). Respecto a la producción de micelio y rendimiento de alcaloides, la cepa C4 mostró el mayor rendimiento micelial en peso seco, mientras la cepa C15 mostró el mayor rendimiento de alcaloides (Cuadro 7). A nivel macroscópico los aislados presentaron micelio algodonoso o pionatal, con pigmentación variada (naranja, verde, rosa, negro, blanco, gris). A nivel microscópico algunos aislado presentaron micelio hialino y cenocítico, sin embargo, también se observaron estructuras características de algunos géneros de hongos como *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* (Figura 10).

Cuadro 6. Número de aislamientos de *P. taxifolius* de diferentes partes de la planta en distintos medios.

Material vegetal	No. de aislamientos			
	PDA	AEM	AHM	AA
Hoja	1	1	2	1
Tallo	1	0	0	1
Raíz	11	2	0	2
Total	13	3	2	4



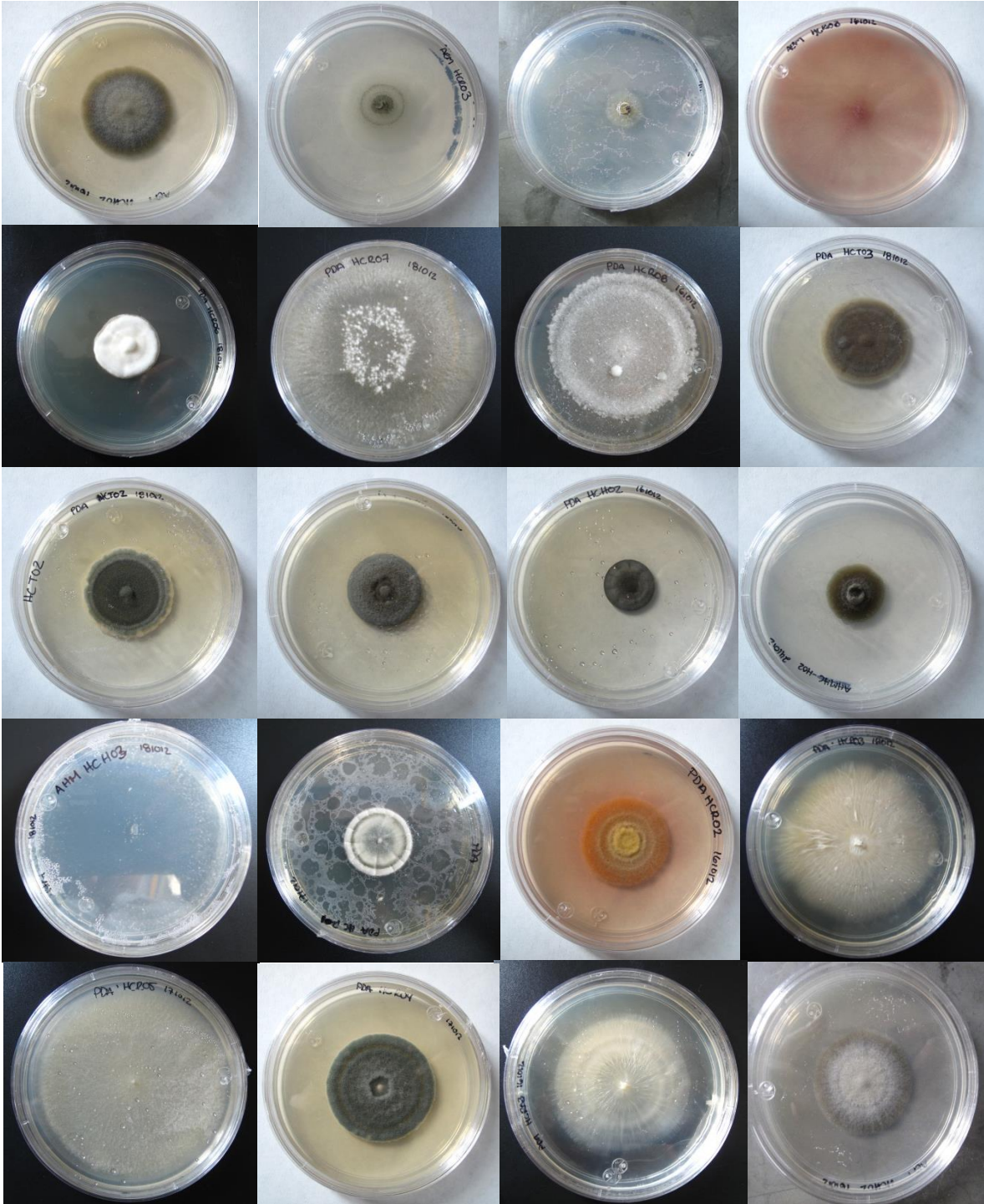


Figura 10. Hongos endófitos aislados de *P. taxifolius*

Cuadro 7. Rendimiento de micelio en peso seco de las cepas inoculadas en medio PDB y rendimiento de alcaloides.

N° aislado	Y micelio (gPS/L)	Y alcaloides (mg/g PS)
<b>C1</b>	0.82	2.2
<b>C2</b>	1.5	52
<b>C3</b>	9.0	33.6
<b>C4</b>	8.5	31.6
<b>C5</b>	8.1	33.6
<b>C6</b>	0.66	1.7
<b>C7</b>	0.69	2.8
<b>C8</b>	1.2	1.4
<b>C9</b>	2	1.3
<b>C10</b>	2.4	41.2
<b>C11</b>	2.4	35.6
<b>C12</b>	2.3	43.2
<b>C13</b>	2.9	1.1
<b>C14</b>	-	-
<b>C15</b>	8.4	106.4
<b>C16</b>	4.1	53.3
<b>C17</b>	3.0	1.6
<b>C18</b>	7.2	1.3
<b>C19</b>	2.6	29.6
<b>C20</b>	2.9	66.7
<b>C21</b>	2.5	35.53
<b>C22</b>	5.0	6.2
<b>C23</b>	1.18	5.8

\*El rendimiento es el promedio de la suma del micelio de tres matraces.

PS: Peso seco de micelio.

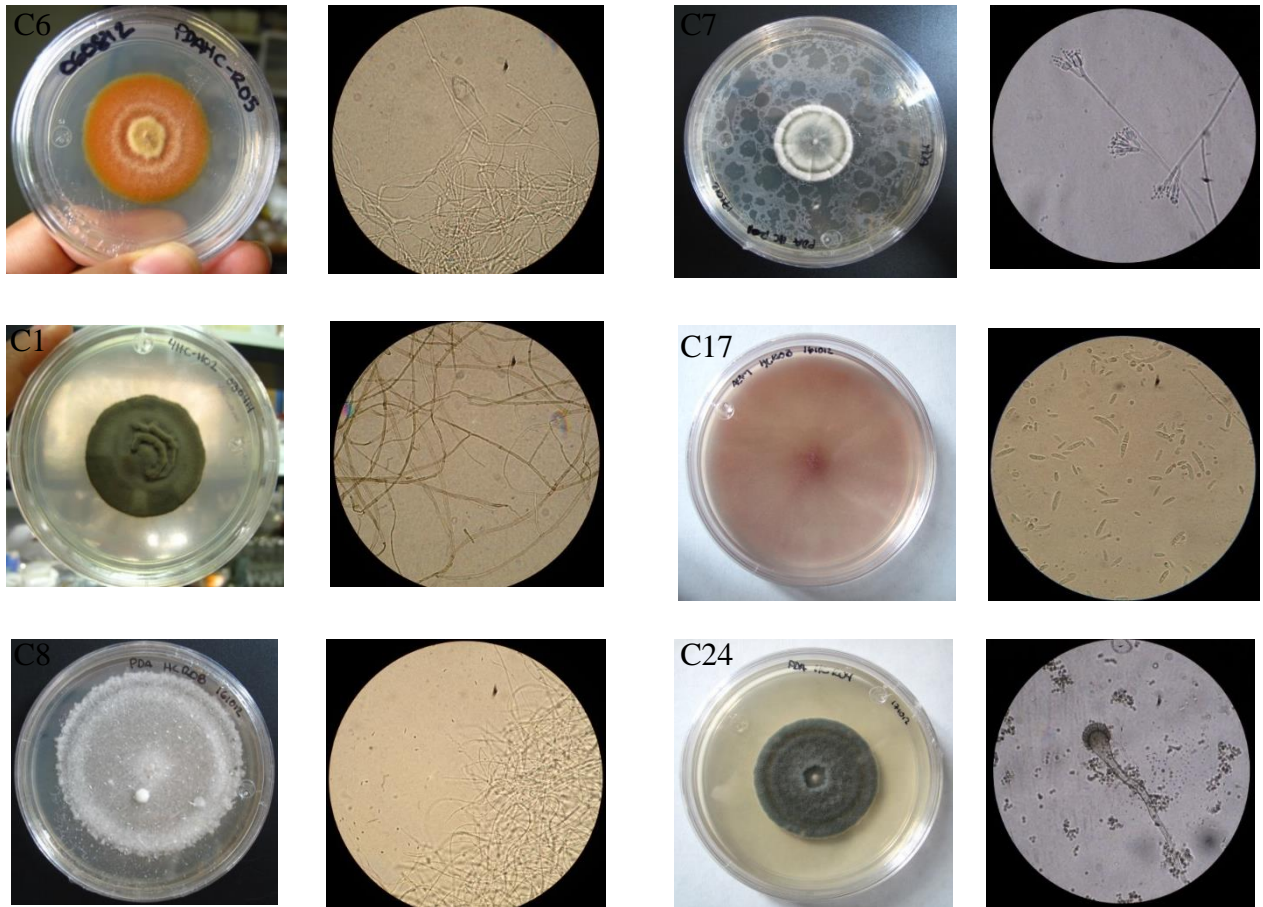


Figura 11. Vistas macroscópicas y microscópicas de algunos aislado de *P. taxifolius*. Se observaron diferentes tipos y pigmentaciones de micelio a nivel macroscópico, así como micelio cenocítico y hialino a nivel microscópico (C6, C1, C8). También se observaron estructuras características de algunos géneros de hongos como *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* (C7, C17, C24). Vistas a 100X.

### 3.2 Identificación química y cuantificación de Hup A mediante CLAE y LC-MS.

La curva de calibración del estándar de Hup A mostró una relación lineal con el área y la altura del pico. Con un tiempo de retención  $T_R = 6.64$  min.

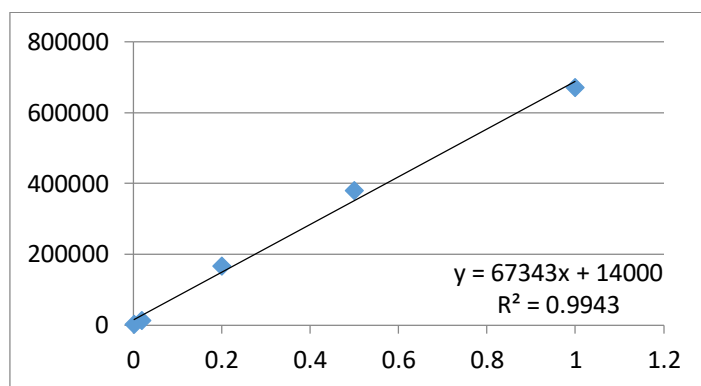


Figura 12. Curva de calibración del estándar ( $R^2=0.9943$ ).

De los 22 extractos fúngicos alcaloideos analizados, solo 6 mostraron un pico en el tiempo de retención del estándar Hup A. Las cepas C8, C10, C12, C16, C17 y C23 sugieren la presencia de este alcaloide (Figura 12).

La cepa C17 se seleccionó para la identificación morfológica y molecular, así como para llevar a cabo el ensayo de inhibición *in vitro* de la AChE debido a que presentó el pico más alto y definido en el perfil cromatográfico.

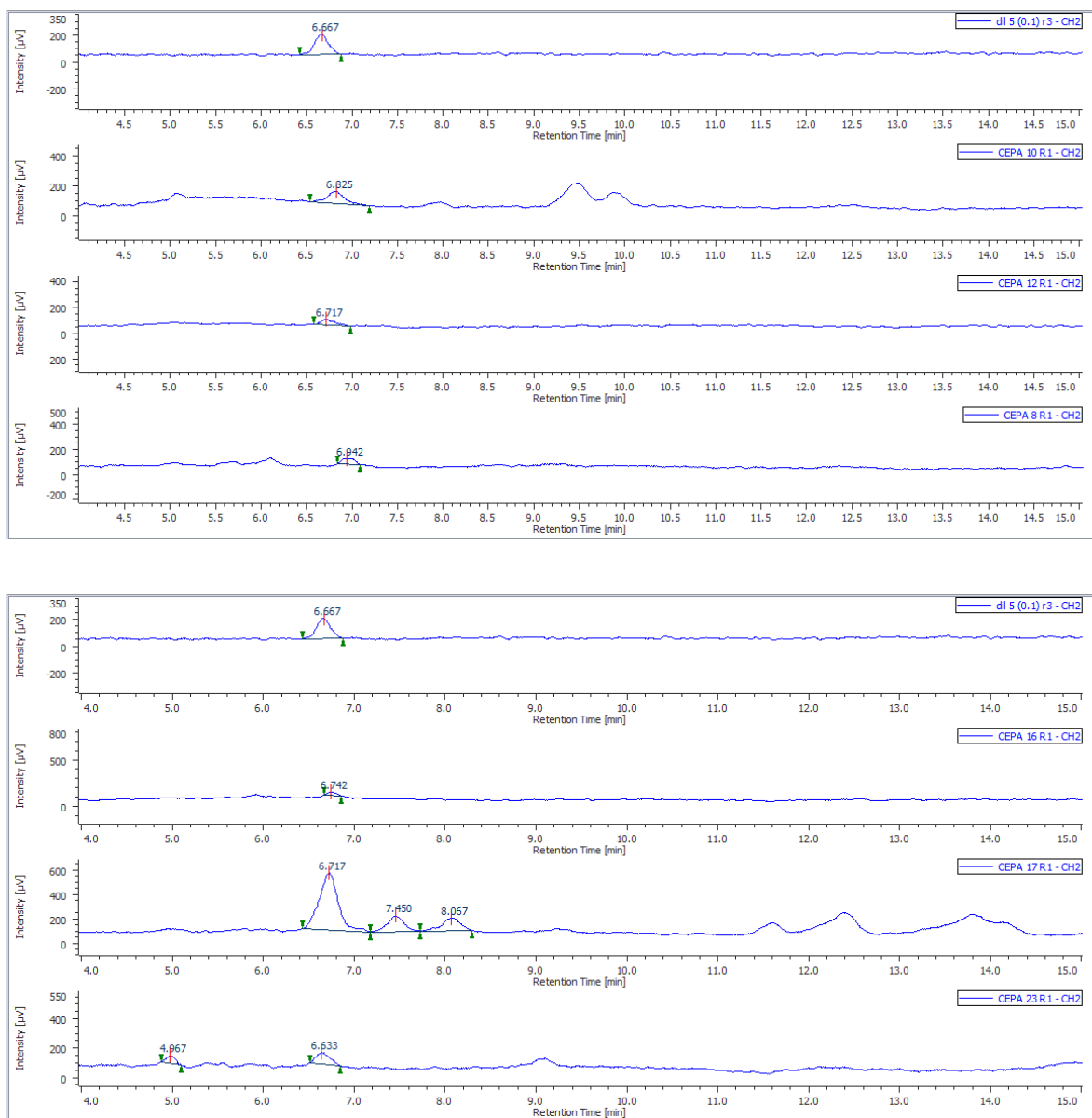


Figura 13. Cromatogramas de los extractos alcaloides en los que se observó un pico en el tiempo de retención del estándar Hup A.

### 3.3 Identificación morfológica del aislado C17

El aislado C17 se inoculó en medio PDA a 28°C, la colonia se caracterizó por presentar un color púrpura al centro y rosa pálido en el contorno, con micelio blanco y ligeramente algodonoso (Fig. 1a). Para la descripción microscópica se observó la presencia de macroconidios, estos fueron hialinos y septados, fusiformes con una célula apical alargada y una célula basal pedicelada (Fig. 1b). Los microconidios presentaron forma ovalada con uno o dos septos, hialinos, individuales o en monofiálides (Fig. 1c). No se observó la presencia de clamidosporas. Las características antes descritas revelaron que el aislado C17 podría pertenecer a una especie del género *Fusarium*.



Figura 14. Morfología de la cepa C17: a) Cepa C17 en PDA; b) Macroconidios y microconidios (100x); c) Monofiálides *in situ* en CLA (100x).

### 3.4 Identificación molecular del aislado C17.

Para confirmar los resultados del análisis morfológico del aislado C17. Los fragmentos de 561 pb se amplificaron y secuenciaron (número de acceso de GenBank MK560083). Se estableció una relación filogenética a través del análisis cladístico y el alineamiento de secuencias de nucleótidos homólogas entre especies del género *Fusarium* (Fig. 14). El aislado C17 mostro estar estrechamente relacionada al género *Fusarium*.

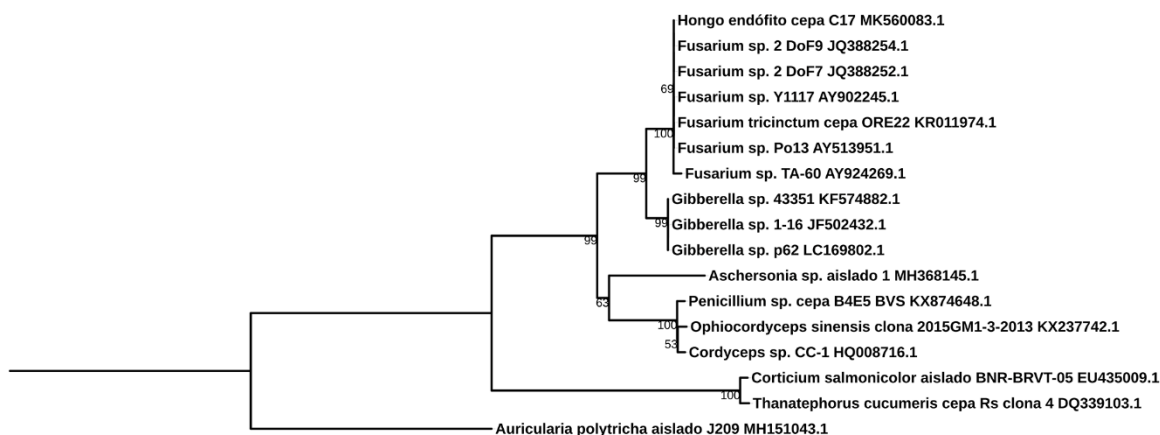


Figura 15. Árbol filogenético que muestra la relación del aislado C17 con otras especies fúngicas en función de su homología de secuencias ITS, obtenidas del GenBank.

### 3.5 Inhibición de la AchE por el extracto alcaloideo de C17

La actividad de inhibición *in vitro* de la AChE del extracto fúngico alcaloideo de la cepa C17 fue comparada con el estándar de Hup A (0.16  $\mu\text{g/mL}$ ). El porcentaje de inhibición *in vitro* de la AChE del extracto fúngico alcaloideo mostró moderada (41.6%) y baja (16.6%) actividad inhibitoria a 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición *in vitro* de la AchE por C17

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibición de la AchE
Estándar Hup A	0.16	50%
C17	50	16.6%
	100	41.6%



## DISCUSIÓN

Wang *et al* (2011) aislaron 127 hongos endófitos de raíces, tallos y hojas de *H. serrata* de los cuales nueve produjeron Hup A. El grupo de Zhang (2011) también aisló 53 hongos endófitos de hojas de *H. serrata*, entre ellos *Cladosporium cladosporioides*, productor de Hup A. En comparación con las cepas obtenidas en este trabajo el número de aislados es bajo, sin embargo, Hyde y Soyong (2008) mencionan que el número de cepas y especies de endófitos aislados varían considerablemente, y generalmente dependen del tratamiento de desinfección. Además, mencionan que las plantas de clima templado producen diferentes comunidades de endófitos que las de clima tropical, y que también los diferentes tipos de tejidos vegetales varían en la producción de endófitos. Los resultados son influenciados por la metodología, como es el tiempo de esterilización (los diferentes órganos de la planta requieren de tiempos diferentes de esterilización), el tipo de esterilizante, así como el medio de cultivo. Si el método de esterilización no es efectivo se tendrán un gran número de hongos contaminantes de la superficie, por el contrario, si se aíslan muy pocos endófitos el método es efectivo. Lo descrito anteriormente puede responder al bajo número de hongos aislados de *P. taxifolius* y considerar que el método de esterilización utilizado fue efectivo

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) mostró que sólo seis cepas presentaron un pico con tiempo de retención correspondiente a Hup A. En los últimos años se han reportado hongos endófitos productores de Hup A, aislados de distintas especies de *Huperziaceae* y con diferentes rendimientos en la producción de este alcaloide. Zhu *et al.* (2010) aislaron el hongo endófito *Shiraia sp.* el cual produjo 142.6 µg/gdcw, la producción más alta de Hup A por un hongo endófito reportada hasta el momento. Si bien, la cepa C17

tuvo un rendimiento bajo (3.2 µg/gdcw) en comparación con los ya reportados, la optimización de los procesos de fermentación, combinados con inductores efectivos parecen prometedores en la producción de Hup A. Zhao *et al.* (2013) probaron varias condiciones de fermentación para optimizar la producción de Hup A a partir del hongo endófito *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 aislado de *H. serrata*. La optimización de estos parámetros dio como resultado un aumento del 25,58% en el rendimiento de Hup A. Es bien sabido que la fermentación de microorganismos se ha utilizado ampliamente en muchas ocasiones durante un largo período de tiempo. La penicilina, la avermectina, la validamicina y otros antibióticos conocidos se han desarrollado con éxito a través del proceso de fermentación. El medio de cultivo para células fúngicas (comparado con el de células vegetales) es simple, sin abundantes suplementos y el costo de producción es relativamente bajo, el periodo de fermentación es corto y las condiciones del cultivo pueden ser controladas (Zhao *et al.*, 2010). Tomando las ventajas que ofrece la fermentación de células fúngicas, creemos que la producción de Hup A de la cepa C17 puede incrementarse y poder ofrecer una fuente segura de este alcaloide sin tener que sobre explotar las especies de Huperziaceae, que cada día se encuentran más amenazadas.

Como se mencionó anteriormente la cepa C17 fue uno de los 22 hongos aislados de *P. taxifolius* la cual se identificó como una especie del género *Fusarium*, con referencia en las características morfológicas y el análisis filogenético mediante la homología de secuencias ITS y se designó como *Fusarium sp.* El género *Fusarium* fue introducido por Link en 1809, los miembros de este género pueden provocar enfermedades en plantas, humanos y animales (Leslie *et al.*, 2006). Sin embargo, aparentemente en ciertos contextos, los hongos fitopatógenos pueden comportarse como colonizadores asintomáticos (Eberl *et al.*, 2019) o

puede que esta especie en particular no sea un fitopatógeno. El género *Fusarium* representa un complejo de muchas especies estrechamente relacionadas (Domsch *et al.*, 1980), por lo que se necesitará un análisis más detallado (con marcadores específicos) para determinar si se trata de una especie recientemente descrita, ya que se agrupa con especies de *Fusarium spp* no descritas. Diversos estudios han reportado especies endófitas del género *Fusarium* las cuales producen alcaloides con actividades antibacterianas y anti cáncer (Tsuchinari *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2015; Nenkep *et al.*, 2016; Kumara *et al.*, 2012)

Este es el primer reporte de una especie de *Fusarium* capaz de producir Hup A, de acuerdo a los resultados de HPLC que mostró un pico en el mismo tiempo de retención del estándar de Hup A.

La actividad *in vitro* de inhibición de la AChE del extracto fúngico alcaloideo de la cepa C17 mostró actividad moderada (41,6%) y baja (15,6%) a 100 y 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente. El estándar de Hup A se utilizó como control positivo y mostró un 50% de inhibición de AChE a 0,16  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . La baja producción de Hup A por la cepa C17 (3,2  $\mu\text{g} / \text{gDCW}$ ) explicó la débil inhibición de la AChE que mostró el extracto fúngico alcaloideo a 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

## CONCLUSIONES

1. Se aislaron 22 cepas fúngicas de tallo, hoja y raíz del helecho *P. taxifolius* de las cuales la mayoría fueron obtenidas en medio PDA.
2. En las vistas macroscópicas de las cepas fúngicas se observaron diferentes tipos de micelio, presentando coloraciones naranjas, verdes, rosas, grises, negros y blancos. Algunas cepas desarrollaron micelio pionatal o algodonoso.
3. A nivel microscópico se observaron estructuras características de algunos géneros de hongos como *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. También se observó micelio hialino y cenocítico, sin presencia de esporas lo que dificultó la identificación morfológica de algunas cepas.
4. Los extractos alcaloideos de las cepas C8, C10, C12, C16, C17 y C23 mostraron un pico en el tiempo de retención del estándar de Hup A, lo que sugiere que pueden ser productoras de dicho alcaloide. La cepa C17 mostró el pico más alto y definido respecto a las demás cepas, los análisis de CL-MS confirmaron la presencia de Hup A en el extracto fúngico alcaloideo de la cepa C17.
5. La cepa C17 fue identificada a nivel molecular y morfológico como una especie del género *Fusarium*, es el primer reporte de esta especie como productora de Hup A.
6. La producción de Hup A de la cepa C17 fue baja, comparada con otros hongos productores de Hup A reportados, la cual se vio reflejada en el ensayo *in vitro* de inhibición de la AchE, en donde a una concentración de 50 y 100 µg/mL del extracto alcaloideo presentó una inhibición del 16.6% y 41.6% respectivamente.
7. La utilización de herramientas biotecnológicas permitirá aumentar la producción de Hup A de la cepa C17. Además, la producción de Hup A por hongos endófitos,

evitaría la sobreexplotación de especies de la familia Huperziaceae, contribuyendo a la conservación de estas plantas.

## PERSPECTIVAS

1. Producir mayor cantidad de micelio de las cepas que mostraron un pico en el tiempo de retención del estándar de Hup A para obtener una mayor cantidad de alcaloides y evaluar el porcentaje de inhibición de la AchE.
2. Evaluar el extracto alcaloideo de las cepas que no producen Hup A en el ensayo *in vitro* de inhibición de la AChE para evaluar si alguna cepa no productora de Hup A produce otros alcaloides inhibidores de dicha enzima.
3. Inducir el aumento en la producción de Hup A de la cepa C17 bajo diferentes condiciones de crecimiento, como luz, temperatura, agitación, así como, modificación del medio del cultivo, adición de elicitores o precursores.
4. Identificar a nivel molecular y morfológico todas las cepas aisladas de *P. taxifolius*.

## LITERATURA CITADA

Aigner, T. G. (1995). Pharmacology of memory: cholinergic—glutamatergic interactions. *Current opinion in neurobiology*, 5(2), 155-160.

Alzheimer's Association consultado en: <https://alz.org/>

Arana, M. D., & Øllgaard, B. (2012). Revisión de las Lycopodiaceae (Embryopsida, Lycopodiidae) de Argentina y Uruguay. *Darwiniana*, 266-295.

Arnold, A.E. (2008). Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In *Tropical Forest Community Ecology*, W.P. Carson and S.A. Schnitzer, eds. (West Sussex, UK: Wiley-Blackwell), pp. 254–271.

Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescus grasses. *Applied & Environmental Microbiology* 34: 576–581.

Bai, D. (2007). Development of huperzine A and B for treatment of Alzheimer's disease. *Pure and Applied Chemistry*, 79(4), 469-479.

Bai, D. (2007). Development of huperzine A and B for treatment of Alzheimer's disease. *Pure and Applied Chemistry*, 79(4), 469-479.

Bayman, P., Lebron, L. L., Tremblay, R. L., & Lodge, D. J. (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *The New Phytologist*, 135(1), 143-149.

Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: The implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9(10), 768–778.

Cheng, D. H., & Tang, X. C. (1998). Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60(2), 377-386.

Ching, R.C., 1978. The Chinese fern families and genera: systematic arrangement and historical origin. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 16, 1–9.

Chiu, H.F., Zhang, M., 2000. Dementia research in China. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 15, 947–953.

Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69: 10–16.

Cummings, J. (2004). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351(1), 56–67

D. L. Bai, Z. F. Wang, S. Feng, X. C. Tang. In *Advances in Pharmaceutical Chemistry*, D. L. Bai, K. X. Chen (Eds.), pp. 378–383, Chemical Industry Press, Beijing (2005).

Dall'Acqua, S. (2013). Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. *Bot Targets Ther*, 3, 19-28.

Dartigues, J. F., Helmer, C., Dubois, B., Duyckaerts, C., Laurent, B., Pasquier, F., & Touchon, J. (2002). Alzheimer's disease: a public health problem: yes, but a priority?. *Revue neurologique*, 158(3), 311-315.

disease. *Arch Gen Psychiatry* 62(11), 1186–1192.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980) "*Fusarium*". *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London, pp 333–337



Dong LH, Fan SW, Ling QZ, Huang BB, Wei ZJ (2014) Identification of huperzine A-producing endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*. *World J Microbiol Biotechnol* 30(3):1011–1017.

Eberl F, Uhe C, Unsicker SB (2019) Friend or foe? The role of leaf-inhabiting fungal pathogens and endophytes in tree-insect interactions. *Fungal Ecol* 38:104–112.

Ellman GL, Courtney KD, Andres JV, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95.

Flórez J. *Farmacología humana*. España:Editorial Masson, 1997:222-224, 594-596.

Greicius, M. D., Srivastava, G., Reiss, A. L., & Menon, V. (2004). Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: Evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13), 4637–4642.

Greig N et al. Butirilcolinesterasa: un nuevo objetivo terapéutico en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer? *Alzheimer Insights* 2001; Jun 1-3.

Guerin D. 1898. Sur la presence d'un champignon dans l'lvraie. *Journal Botany* 12: 230–238.

Guo B, Li H, Zhang L. Isolation of the fungus producing vinblastine. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)* 1998; 20: 214-215.

Hanausek TF. 1898. Vorlaufige mittheilung uber den von a vogl in der frucht von lolium temulentum entdeckten pilz. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 16: 203.

Herholz, K., Weisenbach, S., Zündorf, G., Lenz, O., Schröder, H., Bauer, B., ... & Heiss, W. D. (2004). In vivo study of acetylcholine esterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease. *Neuroimage*, 21(1), 136-143.

Holub, J., 1985. Transfers of Lycopodium species to Huperzia—with a note on generic classification in Huperziaceae. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 20, 67–80.

Howes, M. J. R., & Houghton, P. J. (2003). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 513-527.

Howes, M. J. R., & Houghton, P. J. (2003). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 513-527.

Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*, 33(163), e173.

Jiang, H., Luo, X., & Bai, D. (2003). Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of huperzine A: a drug of traditional chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry*, 10(21), 2231-2252.

Kim SU, Strobel GA, Ford E. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* and *Taxus cuspidata* in Korea. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 1999; 42: 97-99.

Klein, J. (2007). Phenserine. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(7), 1087-1097.

Knopman, D. S., Boeve, B. F., & Petersen, R. C. (2003, October). Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 78, No. 10, pp. 1290-1308). Elsevier.

Kour A, Shawl AS, Rehman S, Sultan P, Qazi PH, Suden P, Khajuria RK, Verma V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24: 1115-1121.

Kumara, P. M., Zuehlke, S., Priti, V., Ramesha, B. T., Shweta, S., Ravikanth, G., ... & Shaanker, R. U. (2012). *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook. f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(2), 323-329.

Kusari S, Zuhlke S, Spitteller M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products*. 2009; 72: 2-7.

Kusari, S., Hertweck, C., & Spitteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 19(7), 792-798.

Leifer, B. P. (2003). Early diagnosis of Alzheimer's disease: clinical and economic benefits. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(5s2), S281-S288.

Leslie JF, Summerell BA, Bullock S (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell-Wiley, USA

Liang, Y. Q., & Tang, X. C. (2004). Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. *Neuroscience letters*, 361(1-3), 56-59.

Link, H. F. 1809. Observationes in ordinibus plantarum naturalium, Dissertatio I. *Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin* 3: 3-42. (1, 8, 9)

Liu, J.S., Yu, C.M., Zhou, Y.Z., Han, Y.Y., Wu, F.W., Qi, B.F., Zhu, Y.L., 1986a. Study on the chemistry of huperzine-A and huperzine-B. *Acta Chimica Sinica* 44, 1035–1040.

Liu, J.S., Zhu, Y.L., Yu, C.M., Zhou, Y.Z., Han, Y.Y., Wu, F.W., Qi, B.F., 1986b. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry* 64, 837–839.

Llibre Rodríguez, J. D. J., & Guerra Hernández, M. A. (1999). Enfermedad de Alzheimer: Situación actual y estrategias terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina*, 38(2), 134-142.

Ma X, Tan C, Zhu D, Gang DR (2005) Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China. *J Agric Food Chem* 53(5):1393–1398.

Ma, X., & Gang, D. R. (2004). The lycopodium alkaloids. *Natural product reports*, 21(6), 752-772.

Ma, X., & Gang, D. R. (2008). In vitro production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 69(10), 2022-2028.

Ma, X., Tan, C., Zhu, D., & Gang, D. R. (2006). A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 104(1-2), 54-67.

Ma, X., Tan, C., Zhu, D., Gang, D. R., & Xiao, P. (2007). Huperzine A from *Huperzia* species—an ethnopharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 113(1), 15-34.

Ma, X.Q., Gang, D.R., 2004. The Lycopodium alkaloids. *Natural Product Reports* 21, 752–772.

Ma, X.-Q., Jiang, S.-H., Zhu, D.-Y., 1998. Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae sensu lato occurring in China and their contribution to classification. *Biochemical Systematics and Ecology* 26, 723–728.

Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, 9(7), 702-716.

Mazzitelli S, Filipello F, Rasile M, Lauranzano E, Starvaggi-Cucuzza C, Tamborini M, Pozzi D, Barajon I, Giorgino T, Natalello A, Matteoli M (2016) Amyloid- $\beta$  1–24 C-terminal truncated fragment promotes amyloid- $\beta$  1–42 aggregate formation in the healthy brain. *Acta Neuropathologica Communications Neuroscience of Disease* 4:110.

Nenkep, V., Yun, K., & Son, B. W. (2016). Oxysporizoline, an antibacterial polycyclic quinazoline alkaloid from the marine-mudflat-derived fungus *Fusarium oxysporum*. *The Journal of antibiotics*, 69(9), 709-711.

Ollgaard, B., 1989. Index of the Lycopodiaceae. Det Kongelige Danske Videnskabernes

Ou, L. Y., Tang, X. C., & Cai, J. X. (2001). Effect of huperzine A on working memory in reserpine-or yohimbine-treated monkeys. *European journal of pharmacology*, 433(2-3), 151-156.

Padhi, L., Mohanta, Y. K., & Panda, S. K. (2013). Endophytic fungi with great promises: A Review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3(3)..

Puri SC, Verma V, Amna T, Qazi GN, Spitteller M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products*. 2005; 68: 1717-1719.

Raber, J., Huang, Y., & Ashford, J. W. (2004). ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25(5), 641–650.

Rehman S, Shawl AS, Kour A, Andrabi R, Sudan P, Sultan P, Verma V, Qazi GN. An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008; 44: 203-209.

Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.

Rosenberg, R. (2005). Translational research on the way to effective therapy for Alzheimer

Rothmaler, W. (1944). Pteridophyten-Studien I. *Repertorium novarum specierum regni vegetabilis*, 54(1), 55-82.

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.

Schulz, B., Rommert, A.-K., Dammann, U., Aust, H.J., and Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycol. Res.* 103, 1275–1283.

Selkoe, D., & Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 545–584.

Selskab The Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen.

Shu S, Zhao X, Wang W, Zhang G, Cosoveanu A, Ahn Y, Wang M (2014) Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces huperzine A. *World J Microbiol Biotechnol* 30(12):3101–3109.

Strobel GA, Hess WM, Ford E, Sidhu RS, Yang X. Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology.* 1996; 17: 417-423.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67, 257-268 (2004).

Su J, Yang M (2015) Huperzine A production by *Paecilomyces tenuis* YS-13, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*. *Nat Prod Res* 29(11):1035–1041.

Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459.

Tang, X.C., Han, Y.F., Chen, X.P., Zhu, X.D., 1986. Effects of huperzine A on learning and the retrieval process of discrimination performance in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 7, 507–511.

Testo, W., Øllgaard, B., Field, A., Almeida, T., Kessler, M., & Barrington, D. (2018). Phylogenetic systematics, morphological evolution, and natural groups in neotropical Phlegmariurus (Lycopodiaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 125, 1-13.

Tian R, Yang Q, Zhou G, Tan J, Zhang L, Fang C. Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Journal of Wuhan Botanical Research*. 2006; 24: 541-545.

Tsuchinari, M., Shimanuki, K., Hiramatsu, F., Murayama, T., Koseki, T., & Shiono, Y. (2007). Fusapyridons A and B, novel pyridone alkaloids from an endophytic fungus, *Fusarium* sp. YG-45. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 62(9), 1203-1207.

Venieraki, A., Dimou, M., & Katinakis, P. (2017). Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(2), 51-66.

Vogl A. 1898. Mehl und die anderen mehlprodukte der cerealien und leguminosen. *Zeitschrift Nahrungsmittle Untersuchung Hyg Warenkunde* 12: 25–29.

Wang, H., & Tang, X. C. (1998). Anticholinesterase effects of huperzine A, E2020, and tacrine in rats. *Zhongguo yao li xue bao= Acta pharmacologica Sinica*, 19(1), 27-30.

Wang, T., & Tang, X. C. (1998). Reversal of scopolamine-induced deficits in radial maze performance by (-)-huperzine A: comparison with E2020 and tacrine. *European journal of pharmacology*, 349(2-3), 137-142.

Wang, Y., Yue, D., Tang, X., 1986a. Anticholinesterase activity of huperzine A. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 7, 110–113.

Wang, Y., Zeng, Q. G., Zhang, Z. B., Yan, R. M., Wang, L. Y., & Zhu, D. (2011). Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(9), 1267-1278.



- Wang, Y.E., Yue, D.X., Tang, X.C., 1986b. Anti-cholinesterase activity of huperzine A. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 7, 110–113.
- Wen, H., Li, Y., Liu, X., Ye, W., Yao, X., & Che, Y. (2015). Fusagerins A–F, New Alkaloids from the Fungus *Fusarium* sp. *Natural products and bioprospecting*, 5(4), 195-203.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274-276.
- Xiong, Z. Q., Cheng, D. H., & Tang, X. C. (1998). Effects of huperzine A on nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial working memory deficit. *Zhongguo yao li xue bao=Acta pharmacologica Sinica*, 19(2), 128-132.
- Xu W, Ferrari C, Wang HX (2013) Epidemiology of Al zheimer’s Disease. En: Mental and Behavioural Disorders and Diseases of the Nervous System. Editor: Inga Zerr, pp 329359.
- Yang X, Guo S, Zhang L, Shao H. Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. *Natural Research and Development*. 2003; 15: 419-422.
- Yu, C., Shen, W., Han, J., Chen, Y., Zhu, Y., 1982a. Studies on alkaloids in She Zu Cao *Lycopodium serratum* Thunb., a herbal drug. I. *Zhongcaoyao* 13, 15.
- Yu, C.M., Shen, W.Z., Chen, Y.C., Chen, Y.C., Zhu, Y.L., 1982b. Studies on the alkaloids of Chinese medicine, *Lycopodium serratum*. *Yao Xue Xue Bao* 17, 795–797.
- Zaki AG, El-Shatoury EH, Ahmed AS, Al-Hagar OEA (2019) Production and enhancement of the acetylcholinesterase inhibitor, huperzine A, from an endophytic *Alternaria brassicae* AGF041. *Appl Microbiol Biot* 103:5867–5878.

Zan JU, Wang J, Pan S (2009) Isolation and preliminary identification of the endophytic fungi which produce huperzine A from four species in Huperziaceae and determination of huperzine A by HPLC. *Fudan Univ J Med Sci* 36:445–449

Zhang FF, Wang MZ, Zheng YX, Liu HY, Zhang XQ, Wu SS (2015) Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Phlegmariurus phlegmaria*. *Microbiology* 84(5):701–709.

Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* 2006; 23: 753-771.

Zhang L, Guo B, Li H, Zeng S, Shao H, Gu S, Wei R. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 2000; 31: 805-807.

Zhang, C.L., 1986. Therapeutic effects of huperzine A on the aged with memory impairment. *New Drugs Clinical Remedies* 5, 260–262.

Zhang, Z. B., Zeng, Q. G., Yan, R. M., Wang, Y., Zou, Z. R., & Zhu, D. (2011). Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 479-486.

Zhao XM, Wang ZQ, Shu SH, Wang WJ, Xu HJ, Ahn YJ, Wang M, Hu X (2013) Ethanol and methanol can improve huperzine A production from endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026. *PLoS ONE* 8(4):e61777.

Zhao XM. Wang ZQ. Shu SH. Wang WJ. Xu HJ. Ahn YJ. Wang M. Hu X (2013) Ethanol and methanol can improve huperzine A production from endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026. *PloS One* 8(4):e61777

Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., & Gao, X. (2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr Res, Technol Educ Trop Appl Microbiol Microbial Biotechnol*, 1, 567-576.

Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., & Gao, X. (2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr Res, Technol Educ Trop Appl Microbiol Microbial Biotechnol*, 1, 567-576.

Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., & Gao, X. (2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr Res, Technol Educ Trop Appl Microbiol Microbial Biotechnol*, 1, 567-576.

Zhu D, Wang J, Zeng Q, Zhang Z, Yan R (2010) A novel endophytic huperzine A producing fungus, *Shiraia* sp Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *J Appl Microbiol* 109(4):1469–1478

Zhu D. Wang J. Zeng Q. Zhang Z. Yan R (2010) A novel endophytic huperzine A–producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *J Appl Microbiol* 109(4):1469–1478.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 27-Febrero-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A"

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DCN  
Doctorado en  
Ciencias Naturales

DES de CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 27-Febrero-2020

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A"

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

**Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 27-Febrero-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A”

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DCN  
Doctorado en  
Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos a 27-Febrero-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A"

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

Dr. Jorge Luis Folch Mallol



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DCN  
Doctorado en  
Ciencias Naturales

DES de CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 27 - Febrero - 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A”

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

Dra. Verónica Rodríguez López





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 21 feb. 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A"

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 27-Febrero-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dra. Verónica Rodríguez López

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

Dra. Silvia Bautista Baños

Tesis: AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE *Phlegmariurus taxifolius*  
PRODUCTORES DE HUPERZINA A"

Alumno que la presenta a revisión: **OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como  
TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
Dra. Silvia Bautista Baños