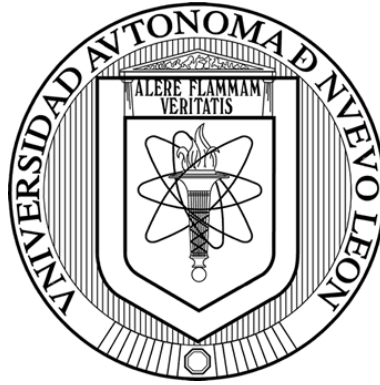


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
Echinocereus engelmannii Y *Echinocereus pectinatus* Y MICROORGANISMOS
ASOCIADOS CONTRA EL GLIOBLASTOMA HUMANO

Por

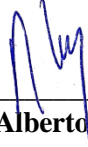
Q.B.P. Ana Laura Delgado Miranda

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2024

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
Echinocereus engelmannii Y *Echinocereus pectinatus* Y MICROORGANISMOS
ASOCIADOS CONTRA EL GLIOBLASTOMA HUMANO


Comité de tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Presidente



Dr. Pablo Zapata Benavides
Secretario



Dra. Miriam Angélica de la Garza Ramos
Vocal



Dr. Alberto Valadez Lira
Vocal



Dr. César Iván Romo Sáenz
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE
Echinocereus engelmannii Y *Echinocereus pectinatus* Y MICROORGANISMOS
ASOCIADOS CONTRA EL GLIOBLASTOMA HUMANO

Dirección de Tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director

DERECHOS RESERVADOS[©]

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN 933-19.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por permitirme llegar hasta este punto en mi vida. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT N°814557) por haberme otorgado el apoyo económico necesario para la realización de esta tesis.

Al Dr. Ricardo Gómez y al Dr. César Romo por abrirme las puertas de su laboratorio y creer en mi para la realización de esta tesis. Por su apoyo, asesoría y orientación en este trabajo.

A mi comité el Dr. Pablo Zapata, la Dra. Miriam de la Garza y al Dr. Alberto Valadez por el acompañamiento y las correcciones sobre esta tesis.

A mis padres Jorge y Coco, a mis hermanos Ricardo y Karla, a Miguel y Adriana y a mis sobrinos Mateo y Sofía por siempre ser mi apoyo más grande, mi inspiración, mi fuerza y mi porra número uno, sin ellos no hubiera logrado salir adelante. Su amor siempre me hará lograr grandes cosas.

A mis amigos, a los que tengo lejos y nunca me han dejado de animar y de querer y a los nuevos que se han encargado de hacer esta nueva etapa de mi vida toda una aventura. A mis compañeros de generación Alexia, Amalia, Becky y Azael que han sido un equipo increíble. A mis amigos del laboratorio que siempre me ayudaron y que se volvieron parte de mi familia foránea. Gracias Jessica, Maribel, Servando y Viri, a Edith por su apoyo en los últimos pasos y corrección de esta tesis y a Diana especialmente por tantísimo tiempo que pasamos juntas, por ser mi amiga, confidente y gran apoyo durante estos dos años de maestría.

DEDICATORIA

A mi familia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IX
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Cáncer y terapias.	3
2.2. Glioblastoma.	4
2.3. Plantas medicinales.	5
2.4. Cactáceas.....	5
2.5. <i>Echinocereus pectinatus</i>	5
2.6. <i>Echinocereus engelmannii</i>	6
2.7. Metabolitos secundarios.....	7
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. HIPÓTESIS.....	9
5. OBJETIVO DEL TRABAJO	10
5.1. Objetivo general.	10
5.2. Objetivos específicos.	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6.1. Colecta de material vegetal.	11
6.2. Obtención de extractos metanólicos.....	11
6.3. Cultivo de células de glioma U87 y SH-S5Y5.....	12
6.4. Descongelación de las líneas celulares.	12
6.5. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioblastoma humano U87 y SH-S5Y5 por el extracto de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	12
6.6. Aislamiento de microorganismos endófitos y asociados a suelo y obtención de cultivos axénicos.	13
6.7. Fermentación y obtención de extractos metanólicos de microorganismos	

endófitos y asociados a suelo de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	13
6.8. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioma humano U87 y SH-S5Y5 por los extractos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	14
6.9. Caracterización de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> mediante LC/MS ²	15
6.10. Actividad hemolítica de extractos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> con actividad antitumoral.....	16
6.11. Actividad antioxidante por ensayo de DPPH de extractos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> , así como de sus microorganismos asociados.	16
6.12. Evaluación de la expresión de genes asociados a actividad antitumoral por extractos metanólicos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	17
6.12.1. Cultivo de células.....	17
6.12.2. Extracción de ARN total.	17
6.12.3. Síntesis de ADNc.	18
6.12.4. Evaluación de expresión de genes.....	18
7. RESULTADOS.....	20
7.1. Obtención del material vegetal.....	20
7.2. Obtención de extractos de cactáceas.	20
7.3. Determinación de la IC ₅₀ del quimioterapéutico paclitaxel contra células de glioblastoma humano	20
7.4. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioma humano U87 y SH-S5Y5 por extractos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	21
7.5. Aislamiento de microorganismos de suelo y endófitos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	23
7.6. Fermentación y obtención de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	23
7.7. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioma humano U87 y SH-S5Y5 por los extractos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	25
7.8. Caracterización de los microorganismos seleccionados por MALDI-TOF.	27

7.9.	Caracterización de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> mediante LC/MS ²	27
7.10.	Evaluación de la expresión genética de genes asociados a actividad antitumoral por extractos metanólicos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i>	29
8.	DISCUSIÓN	31
9.	CONCLUSIONES	36
10.	PERSPECTIVAS	37
11.	BIBLIOGRAGFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Secuencia de primers utilizados (pb; pares de bases, Fwd; Forward, Rev; Reverse).	19
2	IC50 de paclitaxel en las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann.	21
3	IC50 e IS del extracto de <i>E. engelmannii</i> contra la línea celular SH-SY5Y5.	22
4	Rendimiento de extractos metanólicos obtenidos de microorganismos aislados de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> .	24
5	IC50 e IS del extracto HE1 en las líneas celulares SH-SY5Y5 y U87.	26
6	IC50 e IS del extracto HS4 en las líneas celulares SH-SY5Y5 y U87.	27
7	IC50 e IS del extracto ES4 en las líneas celulares SH-SY5Y5 y U87.	27
8	Identificación de cepas seleccionadas por MALDI-TOF.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	<i>E. pectinatus</i> (A) y <i>E. engelmannii</i> (B).	20
2	Estandarización de paclitaxel en las líneas celulares U87, SH-S5Y5 y Schwann.	21
3	Inhibición del crecimiento de las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann por el extracto de <i>E. pectinatus</i> .	22
4	Inhibición del crecimiento de las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann por el extracto de <i>E. engelmannii</i> .	22
5	Cultivos de microorganismos aislados asociados a suelo y endófitos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> .	23
6	Fermentación de biomasa de microorganismos aislados asociados a suelo y endófitos de <i>E. engelmannii</i> y <i>E. pectinatus</i> .	23
7	Biomasa en metanol absoluto para la obtención de extractos metanólicos.	24
8	Inhibición del crecimiento con extractos de microorganismos en la línea celular SH-SY5Y.	26
9	Inhibición del crecimiento con extractos de microorganismos en las líneas celulares U87.	26
10	Proporción de compuestos presentes en el extracto del microorganismo HS4.	28
11	Metabolitos presentes en el extracto metanólico del microorganismo HS4.	28
12	Análisis de la expresión genética de células de glioblastoma. A) Línea celular SH-S5Y5. B) Línea celular U87. Electroforesis en gel de agarosa. Carril 1, células tratadas con HS4; carril 2, células tratadas con ES4; carril 3, células sin tratar.	29
13	Análisis de la expresión relativa de genes asociados a actividad antitumoral en la línea celular U87, mediante el software ImageJ.	30
14	Análisis de la expresión relativa de genes asociados a actividad antitumoral en la línea celular SH-S5Y5, mediante el software	30

ImageJ.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
Å	Angstrom
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
BHE	Barrera hematoencefálica
Cas3	Caspasa 3
CE	Energía de colisión
Cel	Células
cm ²	Centímetro cuadrado
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
dL	Decilitro
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y colaboradores
FA	Ácido fórmico
g	Gramo

GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
h	horas
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IS	Índice de selectividad
Kg	Kilogramo
L	Litro
m/z	Relación masa-carga
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Micromolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF-κB	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas
ng	Nanogramos
nL	Nanolitro
nm	Nanómetros
p53	Proteína tumoral p53
PARP1	Poli ADP ribosa polimerasas
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Cadena en reacción de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
PEG-300	Polietilenglicol 300
pH	Potencial de hidrogeniones
ppm	Partes por millón
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SFB	Suero fetal bovino

U Unidades
UANL Universidad Autónoma de Nuevo León
V Voltios

RESUMEN

El glioblastoma es el tumor cerebral más común y agresivo en adultos. Sin embargo, debido a las limitaciones de los tratamientos convencionales, así como sus efectos secundarios, surge la necesidad de desarrollar estrategias para su control que sean de mayor efectividad y menos perjudiciales para la salud. Existe evidencia de que algunas plantas endémicas de la zona norte de México presentan actividad biológica de impacto en la salud humana, incluido el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. *Echinocereus engelmannii* y *Echinocereus pectinatus* son cactáceas del norte del país que podrían estar relacionadas con la producción de estos compuestos bioactivos con actividad antitumoral. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antitumoral de moléculas bioactivas producidas por cactáceas y microorganismos asociados contra el glioblastoma humano. Para su desarrollo, se obtuvieron extractos metanólicos de las plantas y sus microorganismos asociados que fueron previamente aislados y fermentados, para después rotaevaporar estos extractos. Se evaluó la citotoxicidad de los extractos contra las líneas celulares U87, SH-S5Y5 y células de Schwann, mediante la técnica colorimétrica de reducción del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los extractos que presentaron citotoxicidad selectiva se evaluaron mediante LC/MS². Además, se evaluaron los genes relacionados con actividad antitumoral por los extractos, por medio de RT-PCR. Del análisis de las cactáceas, *E. engelmannii* resultó con mejores resultados dado que mostró una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 58.29 ± 1.09 µg/mL y un índice de selectividad (IS) de 2.7. Se lograron aislar 19 microorganismos endófitos y asociados a suelo de ambas cactáceas. En la evaluación contra las distintas líneas celulares de glioma, tres de ellos se seleccionaron por sus altos porcentajes de inhibición de crecimiento tumoral. El microorganismo ES4 fue el que tuvo mejor actividad con una IC₅₀ de 17.31 ± 1.70 µg/mL y un IS de 3.11. De dichos microorganismos se identificaron las bacterias *Stenotrophomonas malfophilia* y *Burkholderia gladioli*, mediante MALDI-TOF. Se caracterizó uno de los extractos por LC/MS² y se identificó el grupo de ácidos carboxílicos y derivados con un 46.2%, como el grupo de compuestos más abundante. También se lograron identificar metabolitos presentes en la muestra, entre las que destacan la bisgerayafolina A, el dipéptido cyclo (Pro-Leu) y la maculosina.

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common and aggressive brain tumor in adults. However, due to the limitations of conventional treatments, as well as their side effects, there is a need to develop strategies for their control that are more effective and less harmful to health. There is evidence that some endemic plants in the northern part of Mexico have biological activity that has an impact on human health, including the treatment of different types of cancer. *Echinocereus engelmannii* and *Echinocereus pectinatus* are cacti from the north of the country that are related to the production of these bioactive compounds with antitumor activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antitumor activity of bioactive molecules produced by cacti and associated microorganisms against human glioblastoma. For its development, methanol extracts were obtained from the plants and their associated microorganisms that were previously isolated and fermented, which were further rotary evaporated. Cytotoxicity of the extracts against U87, SH-S5Y5 and Schwann cell lines was evaluated using the colorimetric technique of reduction of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide. Extracts that presented selective cytotoxicity were evaluated by mass spectrometry. In addition, genes related to antitumor activity by the extracts were evaluated by RT-PCR. *E. Engelmannii* showed the best antitumor activity since it showed a mean inhibitory concentration (IC₅₀) of 58.29 ± 1.09 µg/mL and a selectivity index (SI) of 2.7. Nineteen endophytic and soil-associated microorganisms were isolated from both cacti. In the evaluation against the different glioma cell lines, three of them were selected for their high percentages of tumor growth inhibition. The ES4 microorganism resulted with the highest activity with an IC₅₀ of 17.31 ± 1.70 µg/mL and an IS of 3.11. Microorganisms were identified as the bacteria *Stenotrophomonas malfophilia* and *Burkholderia gladioli*, using MALDI-TOF. One of the extracts was characterized by mass spectrometry and the group of carboxylic acids and derivatives was identified with 46.2%, as the most abundant group of compounds. Metabolites present in the sample were also identified, among which bisgerayafolin A, cyclo bipeptide (Pro-Leu) and maculosin were the most significant.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se estima que la tasa de morbilidad aumente 18.1 millones por año, estimándose una tasa de mortalidad de 9.6 millones del total. Se anticipa que, en 2040, el número de nuevos casos de cáncer por año aumentará a 29.5 millones y el número de muertes por cáncer a 16.4 millones (NCI 2020).

El glioblastoma es el cáncer cerebral primario más común en adultos. Los primeros síntomas de los tumores cerebrales en adultos no son específicos por lo que se dificulta el diagnóstico oportuno (McKinnon et al. 2021). A pesar de los esfuerzos actuales de tratamiento multimodal que incluyen la resección quirúrgica máxima si es posible, seguida de una combinación de radioterapia y/o quimioterapia, la media de supervivencia es corta de sólo unos 15 meses (Alifieris y Trafalis 2015).

Los tratamientos convencionales que implican cirugía, quimioterapia y radioterapia, junto con la inmunoterapia recientemente desarrollada, se han aplicado para eliminar las células cancerosas o para inhibir su proliferación (Yin et al. 2021).

Actualmente, entre el 30% y el 50% de los casos de cáncer se pueden prevenir reduciendo factores de riesgo y utilizando estrategias de prevención. Además, esta carga puede reducirse mediante la detección temprana y la atención y el tratamiento adecuados del paciente (OMS 2022).

A pesar de los recientes avances, el acceso a productos sanitarios seguros, apropiados, eficaces y de calidad garantizada sigue suponiendo una preocupación a nivel mundial. Por ejemplo, solo una de cada diez personas que necesitan ayudas técnicas tiene acceso a ellas e incluso cuando se dispone de medicamentos, a menudo faltan dispositivos médicos asociados para su aplicación (OMS 2020).

Por esto, existe la necesidad de diseñar nuevas estrategias que faciliten al control y eliminación del cáncer, que sean más eficaces pero que también menos dañinas para la salud y así evitar los efectos secundarios ocasionados por los tratamientos actuales (Campagne 2019).

Se ha demostrado que plantas endémicas de México presentan importante actividad biológica que beneficia a la salud humana. Plantas de la familia Cactaceae pueden ser empleadas como una fuente nutricional. Así mismo, la diversidad de

compuestos y sus excelentes capacidades antioxidantes sugieren que deberían considerarse como fuentes naturales en la elaboración de nuevos productos (Pensamiento-Niño et al. 2021).

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer y terapias.

Las características funcionales del cáncer son adquiridas por las células humanas a medida que pasan de la normalidad a los estados de crecimiento neoplásico y que son cruciales para formar tumores malignos. Además, poseen el potencial para mantener la señalización proliferativa, evadir los factores supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir/acceder al sistema circulatorio, activar la invasión y la metástasis, reprogramar el metabolismo celular y evitar la defensa inmunitaria (Hanahan 2022).

El objetivo del diagnóstico del cáncer es detectar una lesión preneoplásica o un cáncer en una etapa temprana donde el tratamiento podría cambiar el resultado y prolongar la supervivencia de los pacientes. Algunos individuos con cáncer solo recibirán un tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría recibe una combinación de tratamientos, incluyendo la cirugía, la quimioterapia y/o la radioterapia (NCI 2020). Esta última se basa en el uso de altas dosis de radiación, la cual provoca la destrucción de las células cancerosas y reduce los tumores, mientras que la quimioterapia es la administración de medicamentos, los cuales son administrados por vía intravenosa o vía oral (Alarcon Castañeda 2022).

Uno de los tratamientos que ha tomado fuerza es la inmunoterapia que tiene la función de estimular al sistema inmunológico del huésped para combatir la enfermedad y representa uno de los principales avances en el tratamiento de pacientes con cáncer. Las terapias actuales se centran en aprovechar el sistema inmunitario adaptativo, con un gran éxito logrado al interferir con los puntos de control inmunitario para liberar las respuestas de las células T antitumorales CD8⁺. Hay evidencia emergente de que diferentes tipos de cáncer desarrollan múltiples estrategias para evadir del reconocimiento de células T CD8⁺. Sin embargo, estos tumores pueden ser atacados preferentemente por células asesinas naturales (NK) (Cerwenka y Lanier 2018).

La resección quirúrgica seguida de quimioradioterapia tiene una eficacia limitada debido a la mala penetración de la barrera hematoencefálica (BHE), la resistencia intrínseca a glioblastoma y la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos. Un fármaco nuevo con potentes efectos antiinflamatorios y anticancerígenos, como la inhibición de la

invasión y la migración, es el andrografólido, el cual es un compuesto diterpenoide activo que se extrae de las hojas y el tallo de *Andrographis paniculata* (Chiu et al. 2019).

2.2. Glioblastoma.

El glioblastoma es el tumor cerebral maligno primario más agresivo y común en adultos. Se caracteriza a nivel clínico como un astrocitoma de cuarto grado con tejido necrótico y vasos sanguíneos hiperplásicos. Se observa que es el tumor cerebral adulto más frecuente y representa el 15.4% de todos los tumores cerebrales y alrededor del 60% al 75% de todo el astrocitoma (Mittal et al. 2021). Los factores de riesgo para el glioblastoma son ampliamente elusivos y el curso clínico es generalmente fatal (Wirsching et al. 2016). Este comprende el 16% de todas las neoplasias cerebrales primarias y del sistema nervioso central (Thakkar et al. 2014). La tasa de incidencia promedio ajustada por edad es de 3.2 por 100 000 habitantes (Davis 2016). En el año 2020, el número estimado de nuevos casos de glioblastoma fue de 251,329, colocándose en la posición número 12 (OMS 2020).

Existe consenso en que el glioblastoma puede surgir *de novo*, denominado glioblastoma primario, o puede evolucionar a partir de una transformación maligna de gliomas de grado inferior con la designación de glioblastoma secundario. Cada vía tiene hallazgos moleculares distintos (Penas-Prado et al. 2012).

El tratamiento estándar del glioblastoma comprende las modalidades clásicas de cirugía, radioterapia y quimioterapia con agentes alquilantes (paclitaxel, temozolomida y docetaxel, entre otros) (Mittal et al. 2021). No obstante, los enfoques inmunológicos y moleculares están en pruebas clínicas (Wirsching 2017). Esta enfermedad presenta una mediana de supervivencia de 16 a 19 meses y mala calidad de vida durante el curso de la enfermedad (Thomas et al. 2014).

Desafortunadamente, el glioblastoma finalmente recae en la mayoría los pacientes, y ninguno de los tratamientos actuales puede prolongar efectivamente la supervivencia después de la recaída. En consecuencia, dado el mal pronóstico y las limitadas opciones de tratamiento para los pacientes con glioblastoma, se ha generado un interés considerable en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para esta enfermedad (Preusser et al. 2015).

2.3. Plantas medicinales.

La OMS define planta medicinal como cualquier materia vegetal que contenga sustancias que pueden utilizarse con fines terapéuticos o cuyos principios activos puedan servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

Los productos naturales jugaron un papel importante en esta búsqueda. En México se han registrado aproximadamente 4 000 especies de plantas con propiedades medicinales, de las cuales solo se ha estudiado y caracterizado el ingrediente activo de algunas de estas (Loraine y Alberto 2010).

2.4. Cactáceas.

Las cactáceas son plantas nativas de América del Norte. Estas comprenden alrededor de 1 500 especies, de las cuales existen aproximadamente 700 en México, agrupadas en 68 géneros. En los desiertos de Chihuahua y Sonora, así como en algunos valles de Hidalgo y Querétaro, se encuentran cerca del 60% de los géneros presentes en México, de los cuales el 25% son propios o autóctonos (SEMARNAT 2010).

Son consideradas una importante parte dentro de la vegetación de las regiones tanto áridas como semiáridas y juegan un papel importante en la cultura y la población. Un reciente interés en estas plantas es porque han mostrado posibles efectos benéficos para la salud, así como la probabilidad de prevenir algunas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Estos beneficios se han relacionado a la ingesta de diferentes compuestos bioactivos tales como alcaloides, flavonoides, carotenos, terpenoides, antocianinas, vitaminas, minerales, aceites esenciales y péptidos (Pensamiento-Niño et al. 2021).

La familia Cactaceae se distingue porque muchos géneros y especies se adaptan a diversas condiciones ambientales (de Araújo et al. 2021).

2.5. *Echinocereus pectinatus*.

También conocida como biznaga arcoíris o huevo de toro. Es una cactácea que crece erguida, de esférica a cilíndrica, generalmente solitaria, y alcanza un tamaño de 8 a 35 cm de largo y de 3 a 13 cm de diámetro. El cuerpo de la planta suele tener forma de

peine de espinas, formando zonas entre blancas y rosadas. Las flores aparecen en forma de embudo en el costado del tronco, de 5 a 15 cm de diámetro, de color rosa magenta. El tubo floral está afieltrado, con espinas blancas en el exterior. Los frutos son carnosos con forma semicircular y espinosos de un color purpura (Goettsch 2017).

2.6. *Echinocereus engelmannii*.

Esta es una especie de planta de la familia de las cactáceas. Es endémica en los estados de Sonora, Chihuahua, Baja California y Baja California Sur en México y California, Arizona y Nevada en Estados Unidos. Es una planta perenne carnosa cilíndrica armada de espinos. Sus flores de color magenta brillante florecen en abril en los extremos del sur hasta fines de mayo en los lugares del norte. Las flores nacen en la mitad superior a un tercio del tallo. Tienen forma de embudo, de hasta 9 cm de largo con estigmas de color verde oscuro. El fruto es muy espinoso. Al principio es verde, volviéndose rosado y secándose al madurar. El fruto maduro tiene espinas que se desprenden con facilidad. Las semillas son negras y miden de dos a tres milímetros. Los tallos son inicialmente cilíndricos y erectos en plantas jóvenes, pero luego con la base del tallo apoyada en el suelo. Los tallos suelen tener de 4 a 9 cm de diámetro y hasta 65 cm de alto, y están oscurecidos por espinas pesadas que tienden a inclinarse hacia abajo. Las plantas tienen alrededor de 10 costillas, que son algo aplanadas y tuberculadas. No se usa con frecuencia como ornamento, incluso en jardines desérticos, porque crece muy lentamente y tiende a no florecer hasta que alcanza un tamaño maduro (Calascape 2022).

Una importante actividad antioxidante se ha observado en especies de *Echinocereus* sp., así como también un alto contenido de compuestos fenólicos, tales como quercetina así como la isorhamnetina, y de sus derivados como la apigenina y el ácido protocatequico (Pensamiento-Niño et al. 2021). En un estudio previo se demostró que la inducción apoptosis por quercetina en células de cáncer de hígado a las que se añadieron distintas concentraciones del flavonoide. A dosis elevadas se indujo muerte celular mediante un incremento en la activación de caspasa 3 y caspasa 9, también se observó inhibición de la proteína quinasa y de fosforilación de la proteína quinasa. Además, se produjo un incremento de factores proapoptóticos mientras que en los antiapoptóticos se observó una disminución (Vicente-Vicente et al. 2013).

2.7. Metabolitos secundarios.

Algunos organismos vivos como las plantas carecen de sistema inmunológico, por lo que han desarrollado el potencial de producir metabolitos secundarios bioactivos, están incluidos algunas sustancias tóxicas contra otros microorganismos dañinos. Estos productos naturales actúan como sistemas de defensa específicos contra otros organismos. Los metabolitos secundarios son compuestos que no son necesarios para el crecimiento o la reproducción, pero que desempeñan un papel vital en la inhibición del crecimiento de organismos nocivos, también representan una fuente importante de productos farmacéuticos activos (Bourgaud et al. 2001); de ahí que su descubrimiento y caracterización sean el objetivo de muchas investigaciones.

Además, son productos de bajo peso molecular del metabolismo secundario, generalmente producidos durante la fase tardía de crecimiento de los microorganismos y su producción surge a partir de intermediarios intracelulares (aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, etc.). Los metabolitos secundarios son muy importantes para la salud humana y la economía de la sociedad (Elshafie y Camele 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9% se deben a tumores malignos.

El glioblastoma es el tumor cerebral maligno más común y agresivo en adultos. En el año 2020, el número estimado de nuevos casos de glioblastoma fue de 251 329, colocándose en la posición número 12. Las opciones de tratamiento actuales en el momento del diagnóstico son multimodales e incluyen resección quirúrgica, radiación y quimioterapia. Hay terapias limitadas disponibles, y la terapia más utilizada incluye la resección quirúrgica segura, seguida de radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, esto presenta una tasa de supervivencia baja debido a los efectos secundarios y a la naturaleza del órgano afectado. Por esto, se hace indispensable buscar distintos tratamientos de mayor eficiencia y con menos efectos nocivos, para el control de este tipo de cáncer. A través de los años, se ha demostrado que de algunos extractos de plantas se obtienen compuestos bioactivos que favorecen la actividad antitumoral en distintos tipos de cáncer.

Algunos de los extractos obtenidos de *Echinocereus* sp. han mostrado actividad antitumoral contra distintas líneas de cáncer. Se conocen únicamente actividades antitumorales del género, pero no se conocen sobre la especie, por lo que es necesario evaluar este tipo de cactáceas para conocer sus efectos en contra del cáncer.

En este estudio se determinó el efecto antitumoral de extractos de *Echinocereus engelmannii* y *Echinocereus pectinatus* así como de sus microorganismos asociados, además se evaluó la expresión de genes asociados a la actividad antitumoral.

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *Echinocereus engelmannii* y *Echinocereus pectinatus* y sus microorganismos asociados, poseen actividad antitumoral contra el glioblastoma humano.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1. Objetivo general.

Determinar el efecto antitumoral de extractos metanólicos de *Echinocereus engelmannii* y *Echinocereus pectinatus* y sus microorganismos asociados en un modelo *in vitro* de glioblastoma humano.

5.2. Objetivos específicos.

1. Obtener y evaluar el efecto antitumoral de extractos metanólicos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.
2. Producir y evaluar *in vitro* extractos metanólicos de microorganismos asociados a *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.
3. Evaluar el efecto *in vitro* de extractos de microorganismos asociados a *E. engelmannii* y *E. pectinatus* en la regulación de genes relacionados con actividad antitumoral en glioblastoma humano.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Los microorganismos que se utilizaron fueron previamente aislados por el Laboratorio de Inmunología y Virología dentro de la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas.

6.1. Colecta de material vegetal.

El material vegetal se obtuvo del “Vivero Ortiz” ubicado en Av. Tecnológico N.14506 en la ciudad de Chihuahua, Chih., México el 21 de agosto del 2021. Posteriormente se lavó con agua corriente seguido de agua desionizada para eliminar la suciedad adherida y posteriormente fue almacenado a 4 °C hasta el procesamiento de la muestra.

6.2. Obtención de extractos metanólicos.

Después de lavar el material vegetal, se realizaron cortes transversales del tallo, los cuales se sometieron a un protocolo de desinfección por inmersión en las siguientes soluciones: hipoclorito de sodio comercial al 12% por 3 min, seguido por agua estéril por 1 min, etanol al 70% por 3 min, agua estéril por 1 min y PBS 1× por 1 min (Kusari et al. 2009). Posteriormente se secó y se maceró el material vegetal para obtener un polvo.

Para la obtención de los extractos, se colocaron 200 g de la planta en frascos de vidrio con tapón de rosca, a los cuales se les agregó metanol absoluto. Posteriormente, los extractos metanólicos se concentraron durante 3 semanas a temperatura ambiente, después de lo cual los extractos se filtraron utilizando papel Whatman #1. Los filtrados se concentraron en un rotavapor (Buchi R-3000; Brinkman Instruments, Inc., USA).

El rendimiento de extracción para cada uno de los extractos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso del material vegetal}} \times 100$$

Todos los extractos concentrados fueron esterilizados mediante filtración, utilizando membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.2 µm, y se almacenaron a 4 °C

en viales ámbar hasta su uso.

6.3. Cultivo de células de glioma U87 y SH-S5Y5.

Las líneas celulares U87 (ATCC HTB-14), SH-S5Y5 (ATCC CRL-2266) y Schwann (ATCC CRL-2884) se descongelaron en medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de SFB (Suero fetal de bovino; Sigma-Aldrich) y 1% de solución antibiótica-antimicótica (Sigma-Aldrich). De las líneas celulares se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2×10^7 células/mL, para lo cual las células fueron concentradas mediante centrifugación a 1 500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se suspendió en una solución de 70% medio de cultivo, 20% de SFB y 10% de DMSO y se colocó 1 mL de la suspensión por criotubo (Corning Inc., Corning, New York, USA). Este material se almacenó a -70 °C hasta su posterior uso.

6.4. Descongelación de las líneas celulares.

Se descongeló un criotubo a temperatura ambiente por 3 a 5 min ya descongelado, el volumen celular se pasó a un tubo con 5 mL de medio de cultivo DMEM y se llevó a centrifugar 5 min a 1 800 rpm a 4 °C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se suspendió en 5 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB en un frasco de 25 cm³ y se incubó a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO².

6.5. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioblastoma humano U87 y SH-S5Y5 por el extracto de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

Las células U87, SH-S5Y5 y Schwann se incubaron hasta obtener la concentración de 1×10^4 células/mL y se colocaron 100 µL en placas de 96 pozos de fondo plano. Después se colocaron los tratamientos y las placas se incubaron a 37 °C por 24 h en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire. Posteriormente se procedió a evaluar los extractos a las concentraciones de 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/mL. Se utilizó como control positivo al paclitaxel y se incubó durante 48 h, a las mismas condiciones ya mencionadas. Después se adicionaron 15 µL de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-

2,5-difeniltetrazol (MTT) a los pozos (0.5 mg/mL como concentración final) y se incubó de 3 a 4 h. Al terminar la incubación se decantó la solución, se agregaron 150 µL de DMSO a cada uno de los pozos y se determinaron las densidades ópticas (DO) a 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Rodríguez-Garza et al. 2023).

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 - \left(\left(\frac{\text{DO}_{570} \text{ células tratadas}}{\text{DO}_{570} \text{ células sin tratar}} \right) \times 100 \right)$$

Una vez obtenido el porcentaje de inhibición, se realizaron los cálculos correspondientes para la obtención de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) y el índice de selectividad (IS) para cada extracto.

$$\text{IS} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ células no tumorales (Schwann)}}{\text{IC}_{50} \text{ células tumorales (U87 o SH - S5Y5)}}$$

6.6. Aislamiento de microorganismos endófitos y asociados a suelo y obtención de cultivos axénicos.

El tejido vegetal previamente desinfectado se cortó en trozos pequeños, los cuales fueron colocados en la superficie de placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA). Las placas fueron incubadas a 28 ± 2 °C por al menos 2 semanas, las colonias que se observaron fueron transferidas a nuevas placas de PDA por triplicado.

6.7. Fermentación y obtención de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

Una vez obtenidos los microorganismos aislados en agar PDA se procedió a la fermentación de estos microorganismos, se cortó el agar en donde se encontraban colonias en formación con ayuda de un bisturí estéril y se transfirió a caldo papa dextrosa (PDB) para fermentar durante 3 semanas a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo la biomasa fermentada se filtró con ayuda de papel Whatman #1 para colocarse en frascos

ámbar, se le agregó metano destilado para obtener los extractos metanólicos de los aislados.

6.8. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioma humano U87 y SH-S5Y5 por los extractos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

Se incubaron 190 μL de las suspensiones celulares de U87, SH-S5Y5 y Schwann, a la concentración de 1×10^4 células/mL, en placas de 96 pozos de fondo plano, después de lo cual las placas se incubaron a 37 °C por 24 h en un ambiente húmedo con 5% de CO_2 con los extractos de los microorganismos de las cactáceas a concentraciones de 31.25 y 250 $\mu\text{g/mL}$ para hacer una selección inicial y posteriormente se realizó la curva con concentraciones de 1.95, 3.9, 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$ para HE1 y HE4 y de 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 $\mu\text{g/mL}$ para ES4. Se utilizó como control positivo paclitaxel, se incubó durante 48 h a las mismas condiciones ya mencionadas. Una vez transcurrida la incubación, se adicionaron 15 μL de MTT a los pozos (0.5 mg/mL como concentración final) y se incubó de 3 a 4 h. Al terminar la incubación se decantó la solución, se adicionaron 150 μL de DMSO a cada uno de los pozos y se midieron las DOs a 570 nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific) (Rodríguez-Garza et al. 2023).

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 - \left(\frac{\text{DO}_{570} \text{ células tratadas}}{\text{DO}_{570} \text{ células sin tratar}} \right) \times 100$$

Una vez obtenido el porcentaje de inhibición, se realizaron los cálculos correspondientes para la obtención de la IC_{50} y el IS para cada extracto.

$$\text{IS} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ células no tumorales (Schwann)}}{\text{IC}_{50} \text{ células tumorales (U87 o SH - S5Y5)}}$$

6.9. Caracterización de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de *E. engelmannii* y *E. pectinatus* mediante LC/MS².

La caracterización se llevó a cabo en un laboratorio especializado en metabolómica y proteómica (MetPro), ubicado en Carretera Ensenada-Tijuana No. 3918, Zona Playitas, 22860, Ensenada, Baja California, México. Se inyectó el extracto de la muestra (2 mL o 600 ng) en un LC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Las moléculas fueron separadas a través de una columna ProtID-Chip-43 II. Las fases móviles consistieron en agua con ácido fórmico (FA) al 0.1% como solución A y acetonitrilo (ACN) con FA al 0.1% como solución B. El gradiente comenzó con 5% de B y aumentó linealmente hasta 40% de B en 20 min y luego hasta 100% de B durante 5 min, seguido de 5% B en 1 min y 5% de B durante 9 min antes de la siguiente muestra. El tiempo de ejecución fue de 40 min a un caudal de 300 nL/min. Se procesaron dos muestras en blanco (4 µL de las fases móviles A y B en una proporción de 95:5) entre las inyecciones de muestras experimentales para minimizar el posible arrastre. El eluyente de la columna se pasó a un espectrómetro de masas Q-TOF 6530 Accurate-Mass (Agilent Technologies, Inc.) a través de la interfaz HPLC MS. Se empleó ionización por nanopulverización en modo positivo. La opción de exclusión activa se habilitó, se configuró en 2 espectros y se liberó después de 0.25 min. Se utilizó la opción de energía de colisión en rampa (CE) con valores de pendiente y compensación de 6 y 4, respectivamente. Se calibró el instrumento externamente antes de la adquisición de la muestra para garantizar una precisión de masa de < 5 ppm para los datos de MS y MS². El rendimiento del instrumento se supervisó durante la adquisición de datos mediante la evaluación de las señales del control de calidad y de las muestras en blanco. Las muestras fueron asignadas aleatoriamente para la adquisición de datos.

Los conjuntos de datos LC-MS² se analizaron mediante un flujo de trabajo compuesto por paquetes de software de acceso abierto y plataformas en línea. Para ampliar la supuesta identificación de metabolitos (MSI, nivel 3) no recuperados mediante coincidencia espectral, se empleó la herramienta in-silico MolDiscovery y Dereplicator+ incorporadas en la plataforma GNPS. El archivo. mgf agrupado generado por redes moleculares clásicas se utilizó para los análisis MolDiscovery y Dereplicator+.

Como herramienta complementaria, utilizamos el paquete CSI:FingerID del

software SIRIUS. Las clases químicas de los metabolitos identificados se determinaron automáticamente utilizando la aplicación web Classyfire (<http://classyfire.wishartlab.com>).

6.10. Actividad hemolítica de extractos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus* con actividad antitumoral.

La actividad hemolítica de los extractos se determinó utilizando el método descrito por Vieira et al. (2021). Se obtuvieron 20 mL de sangre en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, BD Vacutainer). Los glóbulos rojos fueron recuperados de la sangre y se les realizó 3 veces un lavado con Buffer de Fosfatos Salino (PBS) con pH 7.2 y se preparó una suspensión al 5% de eritrocitos con PBS estéril. En tubos de 2 mL se agregaron por triplicado las concentraciones (de 200 a 1 000 µg/mL) de los extractos a evaluar y se adicionó una suspensión al 5% de eritrocitos humanos. Como control positivo se utilizó agua destilada y como control negativo PBS. Las muestras se incubaron por 30 min a 37 °C, después de lo cual se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 13 000 rpm. Se tomaron 200 µL del sobrenadante de cada tubo y se pasaron a una placa de 96 pozos de fondo plano para medir la DO de hemoglobina liberada en un lector de microplacas a 540 nm (Vieira et al. 2021).

El porcentaje de hemólisis para cada muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{DO}_{540} \text{ tratamiento} - \text{DO}_{540} \text{ control negativo}}{\text{DO}_{540} \text{ control positivo} - \text{DO}_{540} \text{ control negativo}} \times 100$$

6.11. Actividad antioxidante por ensayo de DPPH de extractos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*, así como de sus microorganismos asociados.

Se realizó un ensayo de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos utilizando el método DPPH descrito por Sajna et al. (2020). Como control negativo se usó DMSO y como estándar ácido ascórbico a concentraciones 10 a 100 µg/mL. Se incubaron en una microplaca 100 µL de los extractos a diferentes concentraciones (250, 125, 62.5, 31.25 y 15.625 µg/mL) y 100 µL de DPPH durante 30 min a temperatura ambiente y en

oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se midieron las DOs a 517 nm en un lector de microplacas y se procedió a calcular el porcentaje de inhibición del radical DPPH (Ramírez-Villalobos et al. 2021).

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{DO_{517} \text{ control negativo} - DO_{517} \text{ tratamiento}}{DO_{517} \text{ control negativo}} \times 100$$

6.12. Evaluación de la expresión de genes asociados a actividad antitumoral por extractos metanólicos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

6.12.1 Cultivo de células.

Se sembraron 1×10^6 células U87 o SH-S5Y5 en una placa de 6 pozos en un volumen final de 1.9 mL. Se incubaron en un ambiente húmedo por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂, después de lo cual se adicionaron los tratamientos a las concentraciones de la IC₅₀ calculada anteriormente y se incubaron por 24 h adicionales con las condiciones ya mencionadas.

6.12.2 Extracción de ARN total.

La extracción de ácido ribonucleico (ARN) total de todos los tratamientos utilizados se realizó por el método de TRIzol. Se partió de placas de 6 pozos (NEST Biotechnology Co. Ltd, Wuxi, China), donde se realizaron los tratamientos. Para cada pozo se utilizaron 500 µL de TRIzol y se homogenizó por pipeteo hasta desprender completamente la monocapa celular. Con micropipeta se colocó la mezcla en un tubo de 1.5 mL y se incubó por 5 min en hielo, después se adicionaron 100 µL de cloroformo, se homogenizó nuevamente y se incubó en hielo por 3 min adicionales. Posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm a 4 °C por 15 min, se retiró cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, al cual se le adicionaron 400 µL de isopropanol. La mezcla se homogenizó y se incubó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover la pastilla de ARN, se adicionó 1 mL de etanol absoluto, se homogenizó y se centrifugó a 12 000 rpm por 7 min a 4 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL

de etanol al 70% y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 4 °C. Se retiró todo el sobrenadante y fue colocado en la campana de flujo laminar hasta secar la pastilla de ARN. El ARN obtenido se suspendió en 30 µL de agua destilada estéril, se cuantificó con Nanodrop y se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

6.12.3 Síntesis de ADNc.

Del ARN total de las células tratadas se obtuvo ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) mediante una transcripción inversa con el kit High Capacity DNAC Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El volumen final para la reacción del protocolo fué de 20 µL. En tubos de 0.2 mL de microcentrífuga se mezclaron 2 µL de 10X RT buffer, 0.8 µL de 25X dNTPs mix, 2 µL de RT random primer, 1 µL de la enzima (Multiscribe reverse), 4.2 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de ARN total a 2 000 ng/µL de concentración final. Los tubos fueron colocados en un termociclador con las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 37 °C por 60 min, 85 °C por 5 min y 4 °C como extensión final. Los productos de RT-PCR serán almacenados a -20 °C, hasta su posterior uso.

6.12.4 Evaluación de expresión de genes.

Se analizó la expresión relativa de los genes PARP-1, p53, Cas 9, BCL-2, BAX, NF-κB, Akt, Nrf2, Cas 9, Cas 8, CycB1, CDK1, p21 y β-actina en células U87 y SH-S5Y5 tratadas y no tratadas además se utilizó como gen endógeno a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La evaluación y cuantificación se realizó por densitometría por medio del programa Image J.

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados (pb; pares de bases, Fwd; Forward, Rev; Reverse).

Nombre del primer		Secuencia del primer (5' to 3')	Tamaño	Referencia
Cas3	Fwd	5'-ATG GGA GCA AGT CAG TGG AC- 3'	84	(Azimi et al. 2021)
	Rev	5'-CGT ACC AGA GCG AGA TGA CA-3'		
Bcl-2	Fwd	5'-GAG CGT CAA CAG GGA GA- 3'	164	(Azimi et al. 2021)
	Rev	5'-GCC AGG AGA AAT CAA ACA-3'		
BAX	Fwd	5'-ACT AAA GTG CCC GAG CTG A- 3'	161	(Azimi et al. 2021)
	Rev	5'-ACT CCA GCC ACA AAG ATG GT-3'		
p53	Fwd	5'-TGG CTC TGA CTG TAC CAC CAT CC-3'	491	(Al-Zharani et al. 2021)
	Rev	5'-CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA GC-3'		
PARP-1	Fwd	5'-AGG CCC TAA AGG CTC AGA AT-3'	470	(Rahman et al. 2021)
	Rev	5'-CTA GGT TTC TGT GTC TTG AC- 3'		
NFKβ	Fwd	5'-AAC AAA ATG CCC CAC GGT TA- 3'	113	(Rahman et al. 2021)
	Rev	5'-GGG ACG ATG CAA TGG ACT GT- 3'		
Akt	Fwd	5'- TGG ACT ACC TGC ACT CGG AGAA- 3'	155	(Al-Senosy et al. 2021)
	Rev	5'-GTG CCG CAA AAG GTC TTC ATG G- 3'		
Nrf2	Fwd	5'-CAC ATC CAG TCA GAA ACC AGT GG- 3'	112	(Gao et al. 2022)
	Rev	5'-GGA ATG TCT GCG CCA AAA GCT G- 3'		
GADPH	Fwd	5'-GGT ATC GTG GAA GGA CTC ATG AC- 3'	188	(Al-Zharani et al. 2021)
	Rev	5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC- 3'		
Cas 9	Fwd	5'-CAG GCC CCA TAT GAT CGA GG- 3'	194	(Al-Zharani et al. 2021)
	Rev	5'-TCG ACA ACT TTG CTG CTT GC-3'		
Cas 8	Fwd	5'-GGATGGCCACTGTGAATAACTG- 3'	101	(Azimi et al. 2021)
	Rev	5'-TCGAGGACATCGCTCTCTCA-3'		
CycB1	Fwd	5'-CTCCTGTCTGGTGGGAGGA-3'	380	(Al-Senosy et al. 2021)
	Rev	5'-CTGATCCAGAATAACACCTGA-3'		
CDK1	Fwd	5'-TTTTAGAGCTTTGGGCACT-3'	195	(Al-Senosy et al. 2021)
	Rev	5'-CCATTTGCCAGAAATTCGT-3'		
p21	Fwd	5'-AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG-3'	95	(Al-Senosy et al. 2021)
	Rev	5'-AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG-3'		
β-actina	Fwd	5'-CTACCTTCAACTCCATCA-3'	165	(Azimi et al. 2021)
	Rev	5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3'		

7. RESULTADOS

7.1. Obtención del material vegetal.

El material vegetal se obtuvo del “Vivero Ortiz” ubicado en Av. Tecnológico 14506 en la ciudad de Chihuahua, Chih., México, el 21 de agosto del 2021.

7.2. Obtención de extractos de cactáceas.

De ambas cactáceas se logró un buen rendimiento al momento de la obtención del extracto metanólico, para *E. engelmannii* de 500 g de molienda se obtuvieron 48 g de biomasa dando como resultado 9.6% de rendimiento para este extracto. Mientras que para *E. pectinatus* se obtuvo de la misma cantidad de molienda, 86 g de biomasa y un 17.2% de rendimiento.



Figura 1. *E. pectinatus* (A) y *E. engelmannii* (B).

7.3. Determinación de la IC₅₀ del quimioterapéutico paclitaxel contra células de glioblastoma humano.

Se evaluaron diferentes concentraciones de paclitaxel en contra de las líneas celulares de glioblastoma U87 y SH-SY5Y para obtener un control positivo, se realizó la curva con distintas concentraciones (Fig. 5) y se obtuvo una IC₅₀ para cada una de las líneas celulares (Tabla 2).

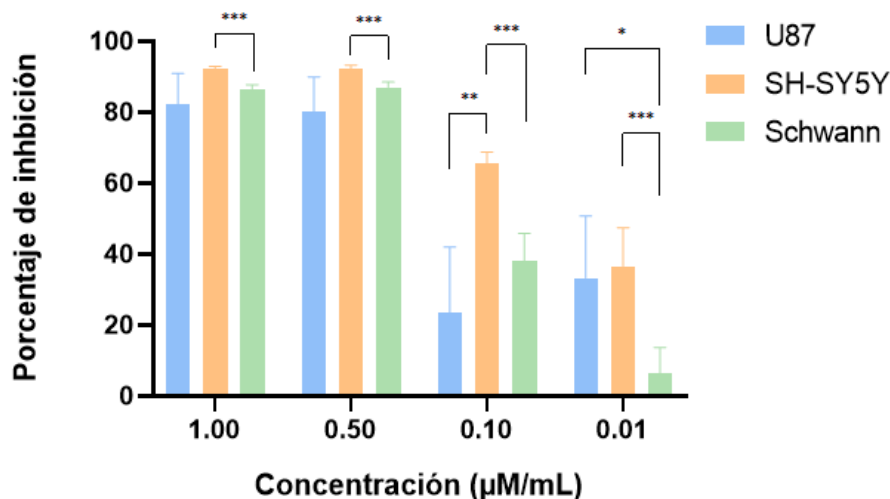


Figura 2. Estandarización de paclitaxel en las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann.

Tabla 2. IC₅₀ de paclitaxel en las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann.

Línea celular	IC ₅₀ *
U87	0.1363 ± 0.81
SH-SY5Y	0.0262 ± 1.24
Schwann	0.1404 ± 1.48

*μM/mL

7.4. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioma humano U87 y SH-SY5Y por extractos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

De los extractos obtenidos de ambas cactáceas se evaluó la viabilidad celular en las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann. Inicialmente se evaluaron dos concentraciones para ambas cactáceas (Figs. 6 y 7). Se observó mayor sensibilidad del extracto de *E. engelmannii* contra la línea celular SH-SY5Y, por lo que se procedió a realizar una curva para obtener la IC₅₀ e IS, así mismo se evaluó su actividad antioxidante y actividad hemolítica que se muestran en la Tabla 3.

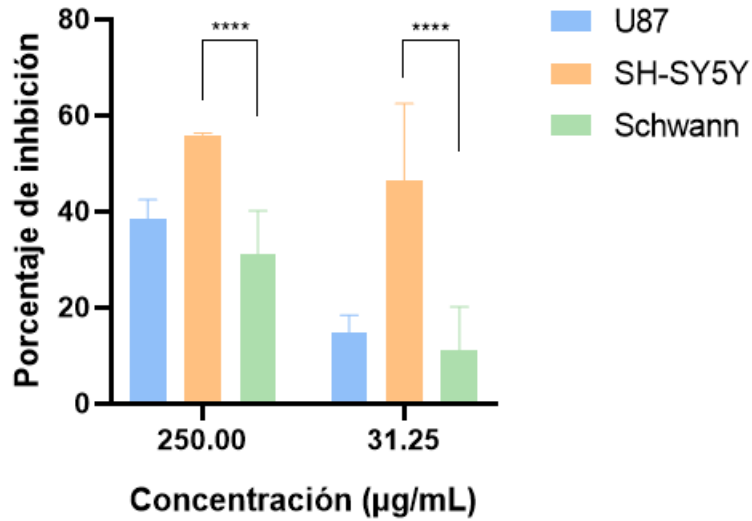


Figura 3. Inhibición del crecimiento de las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann por el extracto de *E. pectinatus*.

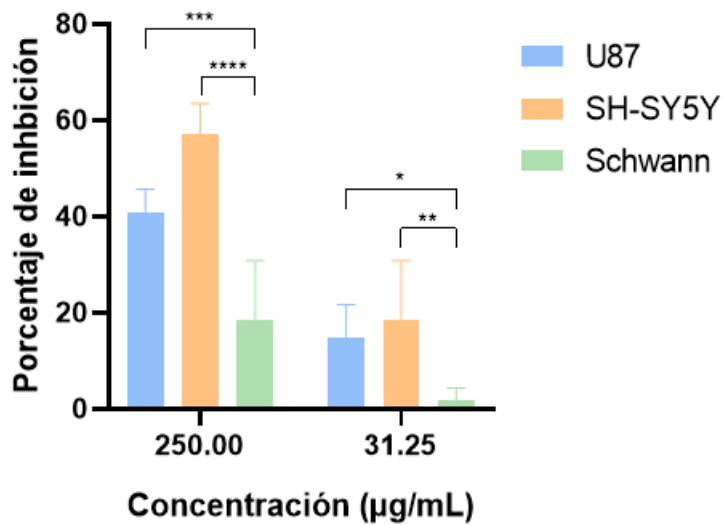


Figura 4. Inhibición del crecimiento de las líneas celulares U87, SH-SY5Y y Schwann por el extracto de *E. engelmannii*.

Tabla 3. IC₅₀ e IS del extracto de *E. engelmannii* contra la línea celular SH-SY5Y5.

Microorganismo	Línea celular	IC ₅₀ *	IS	DPPH*	Hemólisis*
<i>E. engelmannii</i>	SH-SY5Y	58.29 ± 1.09	2.7	>250	>250

*µg/mL

7.5. Aislamiento de microorganismos de suelo y endófitos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

Se lograron aislar 19 microorganismos que fueron clasificados como endófitos (E) o asociados a suelo (S). A *E. engelmannii* se le denominó “erizo” (E), mientras que a *E. pectinatus* se le denominó “huevo” (H), por la forma que tienen. De *E. engelmannii* se aislaron 10 microorganismos asociados a suelo (ES) y 4 endófitos, mientras que de *E. pectinatus* se obtuvieron 3 microorganismos asociados a suelo (HS) y 2 endófitos (HE). Algunos de estos aislados se pueden observar en la Figura 2.



Figura 5. Cultivos de microorganismos aislados asociados a suelo y endófitos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

7.6. Fermentación y obtención de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

De las cepas aisladas en fermentación (Fig. 3), se procedió a filtrar la biomasa y colocarla en metanol (Fig. 4), después de lo cual se filtró y se secó para obtener el extracto de cada microorganismo. Tanto la biomasa como el extracto final fueron pesados para obtener el rendimiento de cada microorganismo (Tabla 4) que fue desde 0.36% hasta 6.30%.



Figura 6. Fermentación de biomasa de microorganismos aislados asociados a suelo y endófitos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.



Figura 7. Biomasa en metanol absoluto para la obtención de extractos metanólicos.

Tabla 4. Rendimiento de extractos metanólicos obtenidos de microorganismos aislados de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

Microorganismos	Rendimiento (%)
ES4	1.17
ES5	0.79
ES6	0.67
ES7	6.30
ES8	0.77
ES9	2.73
ES10	1.46
ES11	0.90
ES12	0.50
ES13	0.56
EE1	0.36
EE2	1.34
EE3	0.79
EE4	2.70
HE1	0.67
HE2	0.57
HS1	0.71
HS4	3.63
HS5	0.56

7.7. Evaluación de la inhibición del crecimiento de células de glioma humano U87 y SH-S5Y5 por los extractos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

De igual manera a cada extracto de microorganismo aislado se le realizó un primer ensayo con únicamente dos concentraciones, para la selección de los extractos con mejor actividad tanto en la línea celular SH-S5Y5 (Fig. 8) como en la línea U87 (Fig. 9). Se lograron observar 3 microorganismos con una mayor actividad y un buen potencial, por lo que se procedió a la realización de una curva a distintas concentraciones para conocer la IC₅₀, IS, actividad antioxidante y actividad hemolítica de cada extracto microbiano. Para el microorganismo HE1, únicamente se analizó para la línea celular U87, dando un resultado de 159.3 ± 1.52 µg/mL que al compararla con la IC₅₀ de la línea celular no tumoral (Schwann) con un valor de 167.9 ± 2.21 µg/mL da un IS de 1.05. Dado que la muerte celular en células no tumorales era alta no se procedió con análisis para este microorganismo con la línea celular SH-S5Y5, ni actividad hemolítica ni antioxidante, los resultados se muestran en la Tabla 5. En cuanto al HS4 se obtuvo una IC₅₀ de 87.66 ± 1.54 µg/mL para la línea U87, 117.9 ± 1.99 µg/mL para la línea SH-S5Y5 y 152.8 ± 2.20 µg/mL para la línea celular Schwann dando como resultado los IS mostrados en la Tabla 6. Por último, para el microorganismo ES4 se obtuvo una IC₅₀ de 45.11 ± 1.87 µg/mL para la línea U87, 17.31 ± 1.70 µg/mL para la línea SH-S5Y5 y 53.87 ± 1.73 µg/mL para la línea celular Schwann obteniendo los resultados de IS mostrados en la Tabla 7.

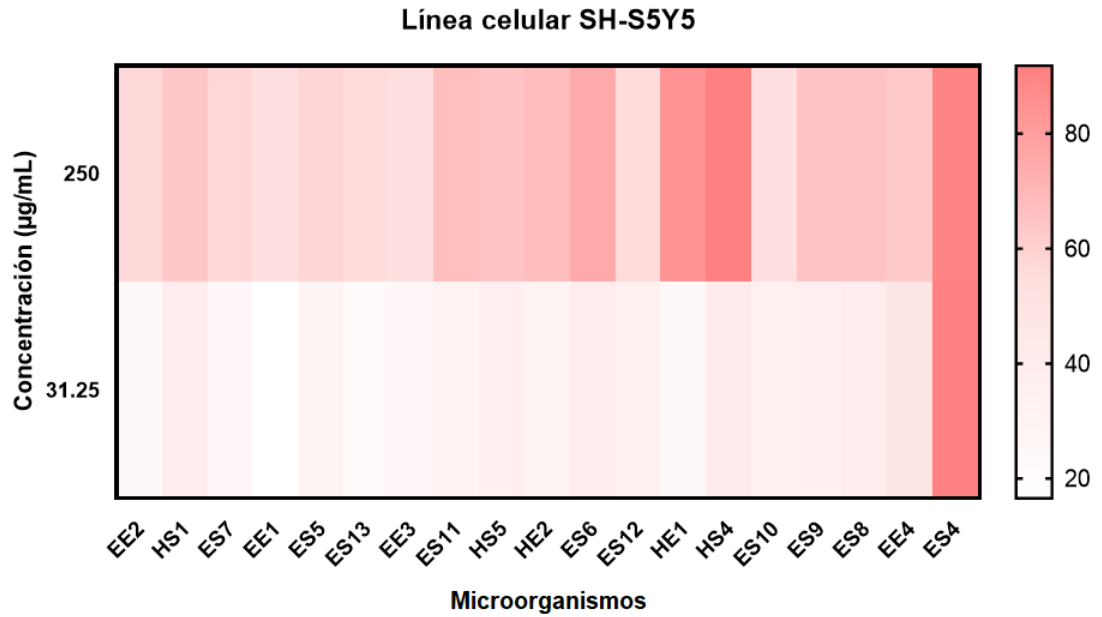


Figura 8. Inhibición del crecimiento con extractos de microorganismos en la línea celular SH-SY5Y.

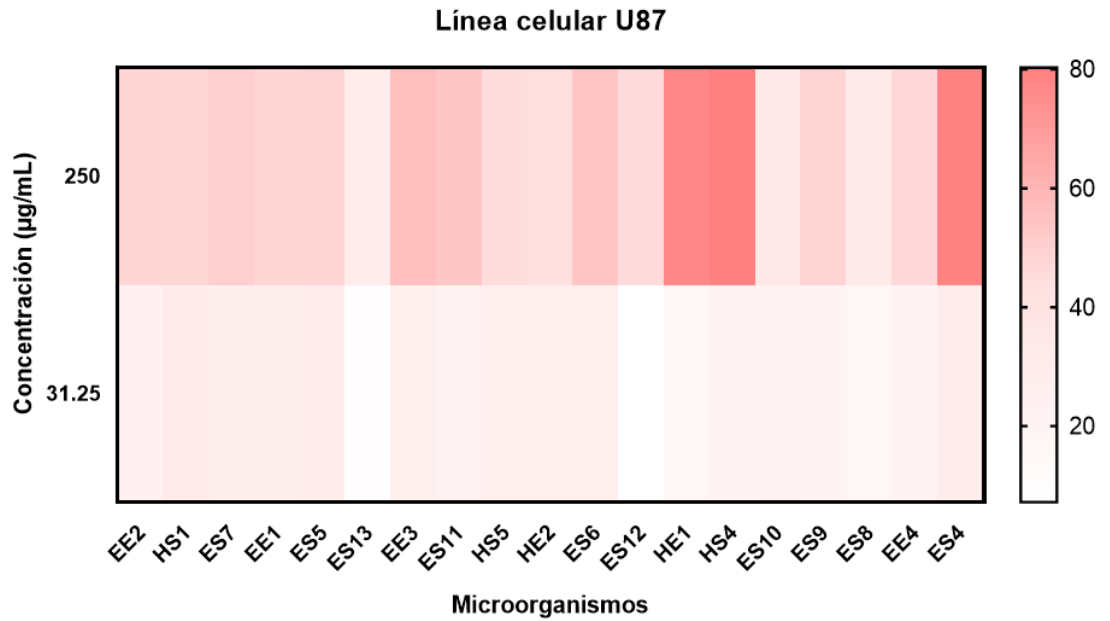


Figura 9. Inhibición del crecimiento con extractos de microorganismos en la línea celular U87.

Tabla 5. IC₅₀ e IS del extracto HE1 en las líneas celulares SH-SY5Y5 y U87.

Microorganismo	Línea celular	IC ₅₀ *	IS
HE1	U87	159.30 ± 1.52	1.05

*µg/mL

Tabla 6. IC₅₀ e IS del extracto HS4 en las líneas celulares SH-SY5Y5 y U87.

Microorganismo	Línea celular	IC ₅₀ *	IS*	DPPH*	Hemólisis*
HS4	U87	87.66 ± 1.54	1.75	>250	>250
	SH-SY5Y	117.90 ± 1.99	1.30		

*µg/mL

Tabla 7. IC₅₀ e IS del extracto ES4 en las líneas celulares SH-SY5Y5 y U87.

Microorganismo	Línea celular	IC ₅₀ *	IS	DPPH*	Hemólisis*
ES4	U87	45.11 ± 1.87	1.19	>250	>250
	SH-SY5Y	17.31 ± 1.73	3.11		

*µg/mL

7.8. Caracterización de los microorganismos seleccionados por MALDI-TOF.

A los microorganismos seleccionados anteriormente se les realizó una identificación por medio de MALDI-TOF y se lograron identificar los organismos de la Tabla 8.

Tabla 8. Identificación de cepas seleccionadas por MALDI-TOF.

Cepa	Identificación
HE1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
HS4	<i>Burkholderia gladioli</i>
ES4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

7.9. Caracterización de extractos metanólicos de microorganismos endófitos y asociados a suelo de *E. engelmannii* y *E. pectinatus* mediante LC/MS².

De igual manera se logró caracterizar uno de los extractos producido por el microorganismo aislado HS4 que mostró actividad, por medio de LC/MS², en donde se encontró principalmente cuatro grupos de compuestos activos, en un mayor porcentaje están las camarinas y sus derivados con un 46.2%, seguido de glicerofosfolipidos con 30.8%, índoles y derivados con 15.9% y al último peptidomiméticos con un 6.7. Específicamente se identificaron 12 distintos metabolitos entre los que destacan los que

se muestran en la Figura 10, que fueron obtenidos con el software ChemDB.

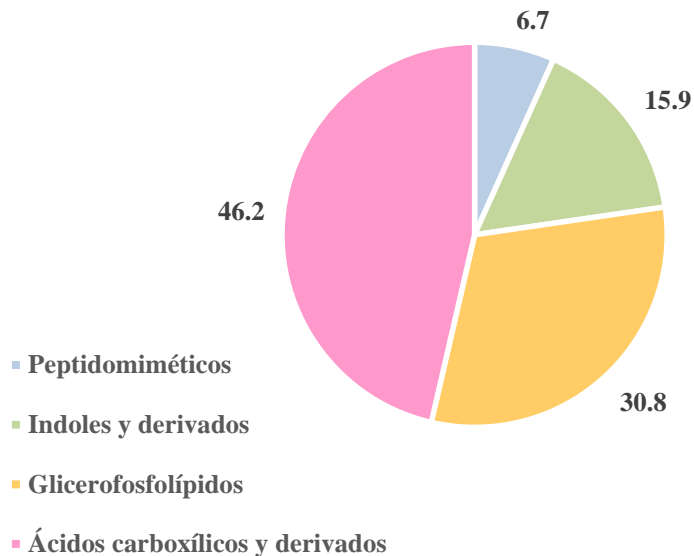


Figura 10. Proporción de compuestos presentes en el extracto del microorganismo HS4.

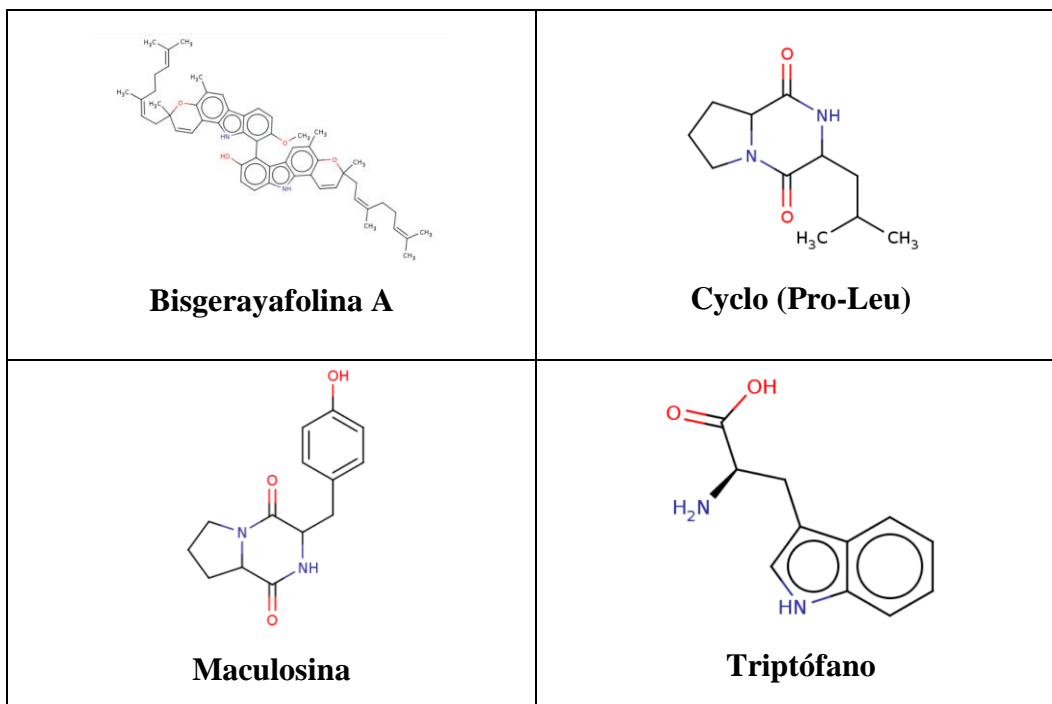


Figura 11. Metabolitos presentes en el extracto metanólico del microorganismo HS4.

7.10. Evaluación de la expresión genética de genes asociados a actividad antitumoral por extractos metanólicos de *E. engelmannii* y *E. pectinatus*.

Una vez obtenido el ARN de las células tratadas con los distintos extractos y comprobada la pureza de este se obtuvo el ADNc y se realizó una PCR para genes asociados a muerte. En la Figura 11 podemos observar que en el inciso A se encuentra la línea celular SH-S5Y5 y en el inciso B la línea celular U87. En ambos casos el gen GAPDH se tomó como el gen endógeno y se muestran los distintos genes para los que amplificó tal línea, siendo p53, Akt, Cas 9, β -actina, Cas 8, CycB1, NRF2 y p21 amplificado por ambas líneas, mientras que CDK únicamente se amplificó para SH-S5Y5. La expresión de los distintos genes se evaluó por medio de densitometría de geles de agarosa por medio de ImageJ y se graficó en un mapa de calor (Figs. 12 y 13) para la comparación del nivel de expresión, en comparación con el control no tratado de ambas líneas celulares.

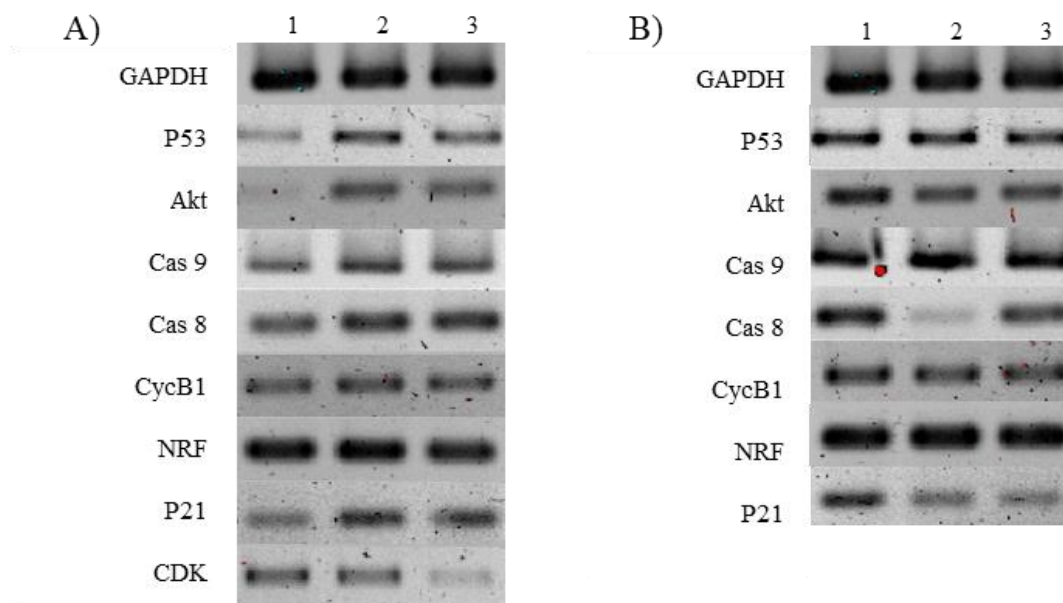


Figura 12. Análisis de la expresión genética de células de glioblastoma. A) Línea celular SH-S5Y5. B) Línea celular U87. Electroforesis en gel de agarosa. Carril 1, células tratadas con HS4; carril 2, células tratadas con ES4; carril 3, células sin tratar.

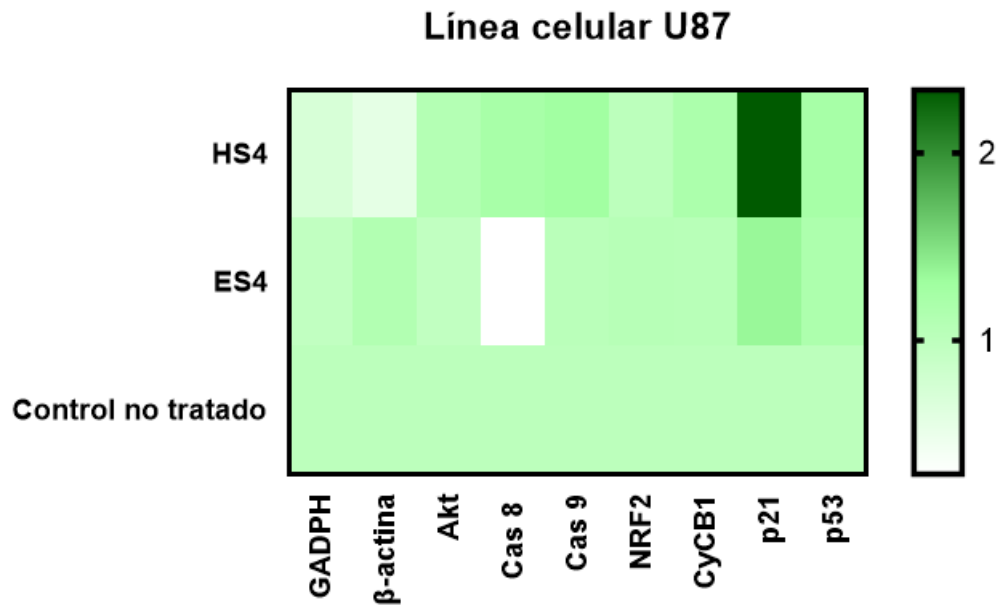


Figura 13. Análisis de la expresión relativa de genes asociados a actividad antitumoral en la línea celular U87, mediante el software ImageJ.

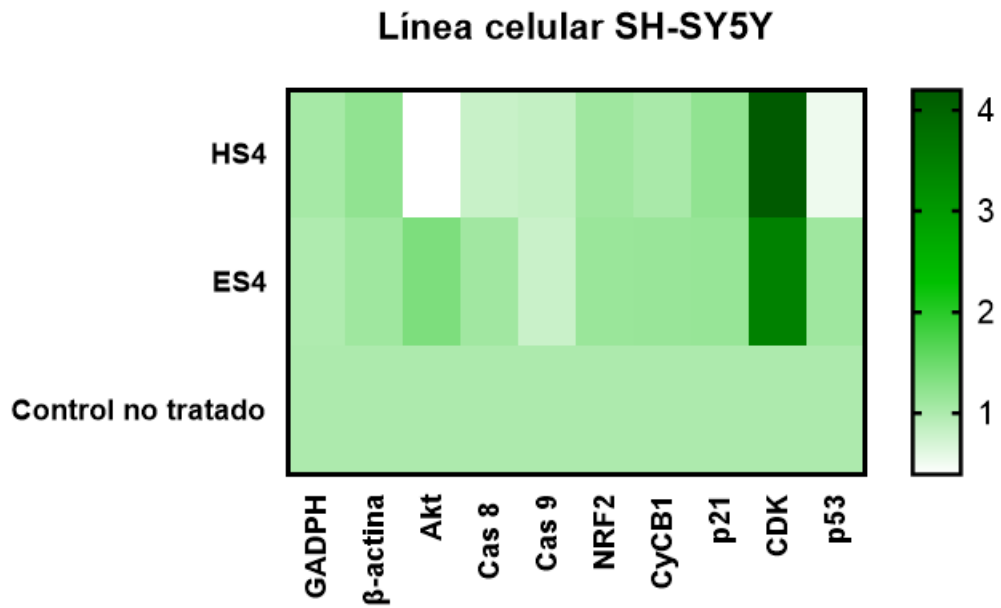


Figura 14. Análisis de la expresión relativa de genes asociados a actividad antitumoral en la línea celular SH-SY5Y, mediante el software ImageJ.

8. DISCUSIÓN

El glioblastoma es el tumor maligno cerebral más común en la población adulta (Majc et al. 2021). Su incidencia aumenta con la edad y los hombres se ven afectados con mayor frecuencia (Le Rhun et al. 2019).

El tratamiento estándar suele ser cirugía seguida de radioterapia más quimioterapia y de mantenimiento con temozolomida (Le Rhun et al. 2019). A pesar del tratamiento agresivo estos tumores son incurables e invariablemente recurrentes (Miller y Wen 2016). Las terapias existentes no han manejado adecuadamente al paciente, por lo que las terapias clásicas han tenido que expandirse e integrar nuevos enfoques alternativos, como compuestos naturales aislados de cactáceas tales como Opuntiol, Peniocerol y Macdougallina (Salazar et al. 2011; Ashfaque et al. 2021). Otros objetivos en el tratamiento del glioblastoma son la inhibición de la vía de señalización de Notch que contribuye a una disminución de la proliferación y autorrenovación de las células del glioblastoma (Fatima et al. 2022).

De la obtención de los extractos de las plantas se logró tener un buen rendimiento, así como el aislamiento de 19 microorganismos con distintas características morfológicas, obteniendo rendimientos entre 0.36% a 6.30% estos resultados demuestran un mejor rendimiento en comparación con microorganismos endófitos aislados de *Ibervillea sonorae* con rendimientos de 1.4% a 3.5% (Romero et al. 2022). El análisis de los porcentajes de inhibición de los extractos de las cactáceas en las líneas celulares U87, SH-S5Y5 y Schwann mostró un mayor potencial para *E. engelmannii* que para *E. pectinatus*, asimismo se logró observar una mayor sensibilidad en la línea celular SH-S5Y5, en donde se ha demostrado tener un mayor efecto con el compuesto bacoside A extraído de la planta *Bacopa monniera* con un porcentaje de inhibición del 60% (Malishev et al. 2017). Por otro lado, con base a los porcentajes de inhibición de las plantas, se obtuvo la IC_{50} de $58.29 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ para *E. engelmannii* en la línea SH-S5Y5. Una IC_{50} para un extracto de entre 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ se considera que tiene una fuerte citotoxicidad. Asimismo, al calcular el IS para esta línea celular observamos un valor de 2.7, un $IS > 2$ indica que un extracto presenta potencial farmacológico para continuar con el fraccionamiento e identificar la presencia del compuesto o compuestos responsables de dicha actividad (Indrayanto et al. 2021). Igualmente, los valores de IS aumentan el valor biológico de los

extractos estudiados ya que nos indican el potencial citotóxico del extracto frente a la célula tumoral y una baja toxicidad celular en células no tumorales (Mansour et al. 2022).

Posteriormente se procedió a evaluar los extractos de microorganismos obtenidos de las cactáceas, observándose nuevamente mayor sensibilidad en la línea celular SH-S5Y5 en comparación con la U87, esto posiblemente debido a la presencia de nuevas mutaciones y expresiones oncogénicas para la resistencia a los medicamentos en diferentes modelos de glioblastoma humano (Yuan et al. 2021). Esto ya se ha observado en la línea celular U87, la cual presenta comúnmente resistencia al fármaco temozolamida, lo que conduce al fracaso del tratamiento (Ren et al. 2022).

Los extractos de 3 microorganismos (HE1, HS4 y ES4) presentaron actividad en ambas líneas de glioblastoma, por los que se procedió a realizar las curvas de estos microorganismos. Al momento de realizar la curva para el microorganismo HE1, se observó que la IC_{50} en la línea celular Schwann era alta, siendo de $159.3 \pm 1.52 \mu\text{g/mL}$, al ser esta nuestra línea celular control se obtenía un IS para el extracto muy bajo, por lo cual no se procedió a realizar los siguientes experimentos para este extracto. Para el microorganismo HS4, se observó una mayor inhibición en el crecimiento para la línea celular U87 que para la línea celular SH-S5Y5 con una IC_{50} dentro de la concentración establecida y un índice de selectividad cercano a 2. El mejor resultado se observó para el extracto del microorganismo ES4 con la IC_{50} más baja y con un índice de selectividad mayor a tres, que según la literatura con este valor se puede clasificar con un mayor potencial anticancerígeno (Indrayanto et al. 2021).

Por otro lado, los extractos de HS4 y ES4 mostraron un valor de IC_{50} de DPPH $> 250 \mu\text{g/mL}$, se ha demostrado que los extractos con una $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ se consideran con una actividad antioxidante relevante (Rivas-morales et al. 2022). De igual manera el análisis de hemólisis de ambos extractos mostró un valor de $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, por lo que no mostraron hemólisis significativa para el extracto.

Los microorganismos seleccionados se lograron identificar por medio de MALDI-TOF y se encontraron 2 especies diferentes, una fue *S. maltophilia*, esta especie se encuentra asociada con plantas. Se ha logrado aislar de la rizosfera o de los tejidos internos de la planta (Ryan et al. 2009). Se han aislado cepas endofíticas de *S. maltophilia* de las raíces de muchas especies de plantas que tienen una extraordinaria gama de

actividades y la producción de biomoléculas de valor económico importante (Elshafie y Camele 2021).

Por otro lado, se encuentra *Burkholderia gladioli*, la cual se ha asociado a distintas plantas y se considera benéfica (Suárez-Moreno et al. 2012). Esta bacteria tiene el potencial de producir una amplia gama de metabolitos especializados que van desde toxinas como el ácido bongkrek hasta antibióticos beneficiosos (Jones et al. 2021).

También se logró caracterizar el extracto del microorganismo HS4 por medio de LC/MS². El análisis nos muestra que dentro de su composición en su mayoría cuenta con ácidos carboxílicos y derivados, los cuales son usados comúnmente en terapias contra cáncer y para contrarrestar los efectos secundarios de la radioterapia (Bian et al. 2020). De igual manera se identificó un alto porcentaje de glicerofosfolípidos, los cuales al ser empleados como suplementación mejoran el potencial de membrana mitocondrial, restauran las funciones celulares y aumentan la resistencia a estrés oxidativo (Medica et al., 2021). En cuanto al grupo de índoles y derivados se ha demostrado que varios compuestos sintetizados basados en indol presentan actividad notable contra numerosos cánceres, por esto los compuestos derivados del indol han presentado alto potencial en tratamientos contra el cáncer (Jadoon et al. 2023). Por último, se encuentra el grupo de los peptidomiméticos que se utilizan en una amplia gama de afecciones relacionadas con el cáncer, desde el diagnóstico hasta el tratamiento, además de reguladores apoptóticos, receptores de membrana, las GTPasas pequeñas y reguladores transcripcionales (Gomari et al. 2022).

Dentro de este mismo análisis se identificaron 12 metabolitos en este extracto, dentro de los que destacan la bisgerayafolina A, la cual se ha reportado que presenta actividad antioxidante y actividad citotóxica (Uvarani et al. 2013). Además, se ha encontrado que los carbazoles, grupo al que pertenece este compuesto, han mostrado propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales, antioxidantes, antiepilépticas, antihistamínicas, antidiarreicas, analgésicas, neuroprotectoras e inhibidoras de la lipasa pancreática (Grande et al. 2022). Otro compuesto identificado de importancia es la maculosina, la cual ha mostrado importante actividad antioxidante y se ha utilizado como un agente antibacteriano (Paudel et al. 2021). Asimismo, presenta actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de hígado humano, por lo que se

propone como un compuesto con alto valor terapéutico y podría actuar como un fármaco candidato principal en el futuro (Karanam et al. 2020). Por otra parte, entre los dipéptidos se ha demostrado que presentan actividades antivirales, antibacterianas, antifúngicas y antitumorales, específicamente Cyclo (Pro-Leu) ha mostrado tener actividad antifúngica y antimicrobiana (Yan et al. 2004). Además, el compuesto triptófano interviene en la regulación de la inmunidad, la función neuronal y la homeostasis intestinal (Platten et al. 2019). Existe también evidencia del efecto antiproliferativo del IFN- γ en células tumorales humanas debido al agotamiento de triptófano en los medios de cultivo y en la anorexia y caquexia relacionadas con el cáncer (Comai et al. 2020). El resto de los compuestos identificados (Cyclo (Pro-Val), Lyso PE (16:0/0:0), N-fructosil isoleucina, PE (15:0/16:0), PE (16:0/14:0), PE (16:0/16:1), Fen-Pro, y piroglutamilprolina) no se han reportado en las bases de datos relacionados con actividad antitumoral.

Por otro lado, nuestros resultados al exponer las diferentes células de cáncer al extracto de HS4 mostraron la disminución de p53 y un aumento en la expresión de CDK1. Estos resultados se relacionan con otros estudios que demuestran que la deficiencia de p53 bloquea transitoriamente la progresión de G2/M dentro del ciclo celular donde se encuentra relacionada directamente la expresión de CDK1 (Chen et al. 2008). Se conoce que para la detención permanente del ciclo celular en esta fase se requiere de p21, el cual actúa como modulador de reguladores mitóticos el cual al encontrarse disminuido activa el complejo Cyc-B1/CDK1 induciendo la detención del ciclo celular (Gire y Dulić 2015). Por lo que el tratamiento con el microorganismo con HS4 en la línea celular podría estar actuando directamente en la detención del ciclo celular específicamente en la fase G2-M. Por otro lado, Akt se ve expresado normalmente en líneas celulares de glioma, se ha reportado en estudios Akt es necesario para el mantenimiento del glioblastoma en el contexto de Ras activado y que la pérdida de expresión de Akt da como resultado una mayor supervivencia (Robinson et al. 2011), de igual manera con la inhibición de Akt se observó proliferación reducida, una detención del ciclo celular y un aumento de la apoptosis (Li et al. 2017; He et al. 2021).

Como se mencionó anteriormente el aumento de Akt está relacionado con un mal pronóstico para el cáncer (Chen et al. 2019), sin embargo, al estar evaluando un extracto crudo puede existir la activación o inhibición de varios genes, implicados en varias vías

de regulación debido a la heterogeneidad del extracto por lo que es necesario evaluar otras vías para poder detectar la vía por la cual induce la inhibición del crecimiento.

Una amplia gama de funciones está asociada a p53, incluida la promoción de la apoptosis, la senescencia y la reparación del ADN, cada una de las cuales ayuda a prevenir el desarrollo del cáncer (Vousden y Ryan 2009). Los componentes desregulados de la vía p53 se han implicado en la invasión, migración, proliferación, evasión de la apoptosis y formación de células cancerosas de las células de glioblastoma (Zhang et al. 2018).

La sobreexpresión de p21 induce la senescencia de manera más rápida y estable que la irradiación de células de glioblastoma humano y en las células que llegan a sobrevivir mantienen estado senescente estable durante más tiempo (Zhao et al. 2020; Mansour et al. 2023). También participa en la represión de las vías de reparación del ADN en células de glioblastoma (Aasland et al. 2019). Esto nos indica que el extracto podría estar induciendo senescencia en la célula, aunque esto es solo un resultado preliminar, se tendría que evaluar la expresión de este gen a diferentes tiempos para poder asegurar esa vía antitumoral en las células de glioma.

Estos resultados demuestran el potencial de nuestros extractos para la identificación de nuevos compuestos con actividad contra glioblastoma humano, ya que, al presentarse con una incidencia muy alta en cáncer de adultos, con una tasa de mutación alta, la búsqueda de compuestos de actividad biológica contra este cáncer y con poca actividad citotóxica en células no tumorales son de gran importancia.

9. CONCLUSIONES

a) Extractos metanólicos de *Echinocereus engelmannii* y *Echinocereus pectinatus* inhiben el crecimiento de las líneas tumorales U87 y SH-S5Y5, teniendo un mejor resultado *Echinocereus engelmannii*.

b) Los extractos metanólicos de *Stenotrophomonas maltophilia* inhiben el crecimiento de células de glioma con una mayor sensibilidad en la línea celular SH-S5Y5 aumentando la expresión de Akt y CDK.

c) Los extractos metanólicos de *Burkholderia gladioli* inhiben el crecimiento de células de glioma con una mayor sensibilidad en la línea celular U87 aumentando la expresión de p21.

d) Extractos metanólicos de *Burkholderia gladioli* mostraron la presencia de ácidos carboxílicos y derivados, bisgerayafolina A, maculosina, y triptófano.

e) Extractos metanólicos de cactáceas del norte de México y bacterias endófitas de éstas presentan actividad contra glioma humano en un modelo *in vitro*.

10. PERSPECTIVAS

- a) Optimizar las condiciones de fermentación de microorganismos para la producción de metabolitos.
- b) Realizar el aislamiento de compuestos de extractos de cactáceas y sus microorganismos asociados.
- c) Ampliar la lista de genes para el análisis de PCR, así como los tiempos de análisis.
- d) Realizar un ensayo *in vivo* con los compuestos aislados.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aasland D, Götzinger L, Hauck L, Berte N, Meyer J, Effenberger M, Schneider S, Reuber EE, Roos WP, Tomicic MT, et al. 2019. Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR–CHK1, p21, and NF-κB. *Cancer Res.* 79(1):99–113.
- Alarcon Castañeda D. 2022. Complicaciones orales en pacientes sometidos a quimioterapia y radioterapia: revisión bibliográfica. [Guayaquil, Ecuador]: Universidad Católica de Santiago.
- Alifieris C, Trafalis DT. 2015. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther.* 152:63–82.
- Al-Senosal NK, Ebeed NM, Salem LM, M. Girgis S, Ahmad ES. 2021. The Anticancer Activity of *Artemisia judaica* Crude Extract in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells by Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Int J Curr Res Rev.* 13(07):209–215.
- Al-Zharani M, Nasr FA, Alqahtani AS, Cordero MAW, Alotaibi AA, Bepari A, Alarifi S, Daoud A, Barnawi IO, Daradka HM. 2021. *In Vitro* Cytotoxic Evaluation and Apoptotic Effects of *Datura innoxia* Grown in Saudi Arabia and Phytochemical Analysis. *Applied Sciences.* 11(6):2864.
- Ashfaq A, Hanif F, Simjee S, Bari M, Faizi S, Zehra S, Mirza T, Begum S, Khan L. 2021. Opuntiol Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells by Upregulating Active Caspase 3 Expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 22(11):3607–3613.
- Azimi M, Mehrzad J, Ahmadi A, Ahmadi E, Ghorbani Ranjbar A. 2021. Apoptosis Induced by Ziziphora tenuior Essential Oil in Human Colorectal Cancer Cells. *Biomed Res Int.* 2021:1–9.
- Bian X, Qian Y, Tan B, Li K, Hong X, Wong CC, Fu L, Zhang J, Li N, Wu J-L. 2020. In-

depth mapping carboxylic acid metabolome reveals the potential biomarkers in colorectal cancer through characteristic fragment ions and metabolic flux. *Anal Chim Acta*. 1128:62–71.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161(5):839–851.

Calascape. Calscape 2022. Restaurar la naturaleza un jardín a la vez. [https://calscape.org/Echinocereus-engelmannii-\(\)](https://calscape.org/Echinocereus-engelmannii-()).

Campagne DM. 2019. Cáncer: comunicar el diagnóstico y el pronóstico. *Medicina de Familia SEMERGEN*. 45(4):273–283.

Cerwenka A, Lanier LL. 2018. Natural killers join the fight against cancer. *Science* (1979). 359(6383):1460–1461.

Chen H, Huang Q, Dong J, Zhai D-Z, Wang A-D, Lan Q. 2008. Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*. 8(1):29

Chen RQ, Xu XH, Liu F, Li CY, Li YJ, Li XR, Jiang GY, Hu F, Liu D, Pan F, et al. 2019. The Binding of PD-L1 and Akt Facilitates Glioma Cell Invasion Upon Starvation via Akt/Autophagy/F-Actin Signaling. *Front Oncol*. 9.

Chiu S-P, Batsaikhan B, Huang H-M, Wang J-Y. 2019. Application of Electric Cell-Substrate Impedance Sensing to Investigate the Cytotoxic Effects of Andrographolide on U-87 MG Glioblastoma Cell Migration and Apoptosis. *Sensors*. 19(10):2275.

Comai S, Bertazzo A, Brughera M, Crotti S. 2020. Tryptophan in health and disease. p. 165–218.

Davis ME. 2016. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clin J Oncol Nurs*. 20(5).

- de Araújo FF, de Paulo Farias D, Neri-Numa IA, Pastore GM. 2021. Underutilized plants of the Cactaceae family: Nutritional aspects and technological applications. *Food Chem.* 362:130196.
- Elshafie HS, Camele I. 2021. An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of burkholderia spp. *Metabolites.* 11(5).
- Fatima U, Roy S, Ahmad S, Ali S, Elkady WM, Khan I, Alsaffar RM, Adnan M, Islam A, Hassan MI. 2022. Pharmacological attributes of *Bacopa monnieri* extract: Current updates and clinical manifestation. *Front Nutr.* 9.
- Gao Z, Jiang J, Hou L, Ji F. 2022. Lysionotin Induces Ferroptosis to Suppress Development of Colorectal Cancer via Promoting Nrf2 Degradation. *Oxid Med Cell Longev.* 2022:1–18.
- Gire V, Dulić V. 2015. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle.* 14(3):297–304.
- Goettsch BK, G-HC, HK, TM& C-DR. 2017. *Echinocereus pectinatus*.
- Gomari MM, Abkhiz S, Pour TG, Lotfi E, Rostami N, Monfared FN, Ghobari B, Mosavi M, Alipour B, Dokholyan N V. 2022. Peptidomimetics in cancer targeting. *Molecular Medicine.* 28(1):146.
- Grande F, Ioele G, Caruso A, Occhiuzzi MA, El-Kashef H, Saturnino C, Sinicropi MS. 2022. Carbazoles: Role and Functions in Fighting Diabetes. *Applied Sciences.* 13(1):349.
- Hanahan D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12(1).
- He Z, Yang C, He Y, Gong B, Yin C, Feng J, Chen L, Tang J, Chen Y. 2021. CAMTA1, a novel antitumor gene, regulates proliferation and the cell cycle in glioma by inhibiting AKT phosphorylation. *Cell Signal.* 79:109882.
- Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. 2021. Validation of *in vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.*

46.

- Jadoon MSK, Pelletier J, Sévigny J, Iqbal J. 2023. Synthesis of new class of indole acetic acid sulfonate derivatives as ectonucleotidases inhibitors. *RSC Adv.* 13(42):29496.
- Jones C, Webster G, Mullins AJ, Jenner M, Bull MJ, Dashti Y, Spilker T, Parkhill J, Connor TR, LiPuma JJ, et al. 2021. Kill and cure: genomic phylogeny and bioactivity of *Burkholderia gladioli* bacteria capable of pathogenic and beneficial lifestyles. *Microb Genom.* 7(1).
- Karanam G, Arumugam MK, Sirpu Natesh N. 2020. Anticancer Effect of Marine Sponge-Associated *Bacillus pumilus* AMK1 Derived Dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr) in Human Liver Cancer Cell Line Through Apoptosis and G2/M Phase Arrest. *Int J Pept Res Ther.* 26(1):445–457.
- Kusari S, Zühlke S, Košuth J, Čellárová E, Spiteller M. 2009. Light-Independent Metabolomics of Endophytic *Thielavia subthermophila* Provides Insight into Microbial Hypericin Biosynthesis. *J Nat Prod.* 72(10):1825–1835.
- Le Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, Reifenberger G, Weller M. 2019. Molecular Targeted Therapy of Glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 80:101896.
- Li Y, Ma X, Wang Y, Li G. 2017. Mir-489 Inhibits Proliferation, Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis of Glioma Cells Via Targeting SPIN1-Mediated PI3K/AKT Pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 93:435–443.
- Loraine S, Alberto M-EJ. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 41(4).
- Majc B, Novak M, Kopitar-Jerala N, Jewett A, Breznik B. 2021. Immunotherapy of Glioblastoma: Current Strategies and Challenges in Tumor Model Development. *Cells.* 10(2):265.

- Malishev R, Shaham-Niv S, Nandi S, Kolusheva S, Gazit E, Jelinek R. 2017. Bacoside-A, an Indian Traditional-Medicine Substance, Inhibits β -Amyloid Cytotoxicity, Fibrillation, and Membrane Interactions. *ACS Chem Neurosci*. 8(4):884–891.
- Mansour KA, El-Neketi M, Lahloub M-F, Elbermawi A. 2022. Nanoemulsions of *Jasminum humile* L. and *Jasminum grandiflorum* L. Essential Oils: An Approach to Enhance Their Cytotoxic and Antiviral Effects. *Molecules*. 27(11):3639.
- Mansour MA, Rahman M, Ayad AA, Warrington AE, Burns TC. 2023. P21 Overexpression Promotes Cell Death and Induces Senescence in Human Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 15(4):1279.
- McKinnon C, Nandhabalan M, Murray SA, Plaha P. 2021 Jul 14. Glioblastoma: Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. *BMJ*.:n1560.
- Medica AJ, Aitken RJ, Nicolson GL, Sheridan AR, Swegen A, Iuliis GN De, Gibb Z. 2021. Glycerophospholipids Protect Stallion Spermatozoa from Oxidative Damage *In Vitro*. *Reproduction & Fertility*. 2(3):199.
- Miller JJ, Wen PY. 2016. Emerging Targeted Therapies for Glioma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 21(4):441–452.
- Mittal S, Ali J, Baboota S. 2021. Overcoming the Challenges in the Treatment of Glioblastoma via Nanocarrier- based Drug Delivery Approach. *Curr Pharm Des*. 27(45).
- NCI. 2020 Tratamiento del cáncer - NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>.
- OMS. 2020. EB 148: Documento de la OMS sobre la ampliación del acceso a tratamientos eficaces del cáncer y las enfermedades raras y huérfanas, incluyendo las terapias celulares y genéticas. https://www.saludyfarmacos.org/lang/es/boletin-farmacos/boletines/feb202102/39_eb/.
- OMS. 2022 Cáncer.

- Paudel B, Maharjan R, Rajbhandari P, Aryal N, Aziz S, Bhattarai K, Baral B, Malla R, Bhattarai HD. 2021. Maculosin, a Non-Toxic Antioxidant Compound Isolated from *Streptomyces* sp. KTM18. *Pharm Biol.* 59(1):931–934.
- Penas-Prado M, Armstrong TS, Gilbert MR. 2012. Glioblastoma. p. 485–506.
- Pensamiento-Niño CA, Campos-Montiel RG, Añorve-Morga J, Ramírez-Moreno E, Ascacio-Valdés JA, Hernández-Fuentes AlmaD. 2021. Nutritional Characterization of the Functional and Antioxidant Activity of Cactus Flowers from Hidalgo, Mexico. *Applied Sciences.* 11(13).
- Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. 2019. Tryptophan Metabolism as a Common Therapeutic Target in Cancer, Neurodegeneration and Beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 18(5):379–401.
- Preusser M, Lim M, Hafler DA, Reardon DA, Sampson JH. 2015. Prospects of Immune Checkpoint Modulators in The Treatment of Glioblastoma. *Nat Rev Neurol.* 11(9).
- Rahman MM, Reza ASMA, Khan MA, Sujon KM, Sharmin R, Rashid M, Sadik MG, Reza MA, Tsukahara T, Capasso R, et al. 2021. Unfolding the Apoptotic Mechanism of Antioxidant Enriched-Leaves of *Tabebuia Pallida* (Lindl.) Miers in EAC Cells and Mouse Model. *J Ethnopharmacol.* 278:114297.
- Ramírez-Villalobos JM, Romo-Sáenz CI, Morán-Santibañez KS, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Orozco-Flores AA, Romero-Arguelles R, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores R. 2021. *In Vitro* Tumor Cell Growth Inhibition Induced by *Lophocereus marginatus* (DC.) S. Arias and Terrazas Endophytic Fungi Extracts. *Int J Environ Res Public Health.* 18(18):9917.
- Ren, Lw., Li, W., Zheng, Xj. 2022. Benzimidazoles induce concurrent apoptosis and pyroptosis of human glioblastoma cells via arresting cell cycle. *Acta Pharmacol Sin* 43, 194–208.
- Rivas-morales, C., Gonzalez-villasana, V., Viveros-valdez, E., 2022. Biological Activities of Seven Medicinal Plants Used in Chiapas, Mexico 1–12.

- Robinson JP, Vanbrocklin MW, McKinney AJ, Gach HM, Holmen SL. 2011. Akt Signaling is Required for Glioblastoma Maintenance *in Vivo*. *Am J Cancer Res.* 1(2):155–167.
- Rodríguez-Garza NE, Quintanilla-Licea R, Romo-Sáenz CI, Elizondo-Luevano JH, Tamez-Guerra P, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores R. 2023. *In Vitro* Biological Activity and Lymphoma Cell Growth Inhibition by Selected Mexican Medicinal Plants. *Life (Basel)*. 13(4).
- Romero-Arguelles R, Romo-Sáenz CI, Morán-Santibáñez K, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Orozco-Flores AA, Ramírez-Villalobos JM, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Gomez-Flores R. 2022. *In Vitro* Antitumor Activity of Endophytic and Rhizosphere Gram-Positive Bacteria from *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene against L5178Y-R Lymphoma Cells. *Int J Environ Res Public Health*. 19(2):894.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D, Dow JM. 2009. The Versatility and Adaptation of Bacteria from the Genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol*. 7(7).
- Salazar JR, Martínez-Vazquez M, Cespedes CL, Ramírez-Apan T, Nieto-Camacho A, Rodríguez-Silverio J, Flores-Murrieta F. 2011. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichipegenin, Peniocerol, and Macdougallin Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 66(1–2):24–30.
- SEMARNAT. 2010. Cactáceas, riqueza natural de México | Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/cactaceas-riqueza-natural-de-mexico>.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. 2012. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. *Microb Ecol*. 63(2):249–266. doi:10.1007/S00248-011-9929-1.

- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. 2014. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23(10):1985.
- Thomas AA, Brennan CW, DeAngelis LM, Omuro AM. 2014. Emerging therapies for glioblastoma. *JAMA Neurol.* 71(11).
- Uvarani C, Sankaran M, Jaivel N, Chandraprakash K, Ata A, Mohan PS. 2013. Bioactive Dimeric Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii*. *J Nat Prod.* 76(6):993–1000.
- Vicente-Vicente L, Prieto M, Morales AI. 2013. Eficacia y Seguridad de la Quercetina como Complemento Alimenticio. *Revista de Toxicología.* 30(2):171–181. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91931189008>.
- Vieira NSM, Oliveira ALS, Araújo JMM, Gaspar MM, Pereiro AB. 2021. Ecotoxicity and Hemolytic Activity of Fluorinated Ionic Liquids. *Sustainable Chemistry 2021, Vol 2, Pages 115-126.* 2(1):115–126.
- Vousden KH, Ryan KM. 2009. p53 and Metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:10. 9(10):691–700. doi:10.1038/nrc2715. <https://www.nature.com/articles/nrc2715>.
- Wirsching H-G, Galanis E, Weller M. 2016. Glioblastoma. p. 381–397.
- Yan P-S, Song Y, Sakuno E, Nakajima H, Nakagawa H, Yabe K. 2004. Cyclo(l – Leucyl – l – Prolyl) Produced by *Achromobacter xylooxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol.* 70(12):7466–7473.
- Yin W, Wang J, Jiang L, Kang YJ. 2021. Cancer and Stem Cells. *Exp Biol Med.* 246(16).
- Yuan Q, Yang W, Zhang S, Li T, Zuo M, Zhou X, Li J, Li M, Xia X, Chen M, Liu Y. 2021. Inhibition of mitochondrial carrier homolog 2 (MTCH2) suppresses tumor invasion and enhances sensitivity to temozolomide in malignant glioma. *Mol Med.* 28;27(1):7

Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, Yang Y, Setiady I, Deveau C, Saoud K, et al. 2018. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 10(9):297.

Zhao Z, Wang Y, Yun D, Huang Q, Meng D, Li Q, Zhang P, Wang C, Chen H, Lu D. 2020. TRIM21 Overexpression Promotes Tumor Progression By Regulating Cell Proliferation, Cell Migration and Cell Senescence in Human Glioma. *Am J Cancer Res*. 10(1):114–130.