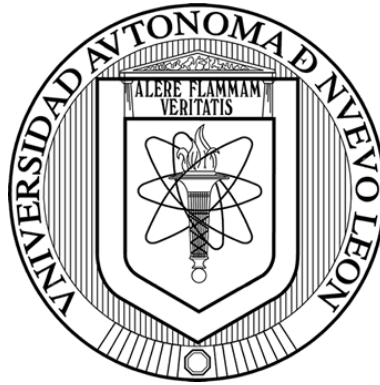


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE  
EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A *Lophocereus*  
*marginatus* EN EL MODELO DE LINFOMA MURINO L5178Y-R

Por

I.B. DIANA LAURA CLARK PÉREZ

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

2024

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE  
EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A *Lophocereus*  
*marginatus* EN EL MODELO DE LINFOMA MURINO L5178Y-R

Comité de Tesis



---

**Dr. Ricardo Gómez Flores**  
Presidente



---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Secretario



---

**Dr. José Alberto Valadez Lira**  
Vocal



---

**Dra. Karla Selene Moran Santibáñez**  
Vocal



---

**Dr. César Iván Romo Sáenz**  
Vocal

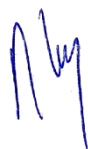


---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**  
Subdirectora de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE  
EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A *Lophocereus*  
*marginatus* EN EL MODELO DE LINFOMA MURINO L5178Y-R

**Dirección de Tesis**



---

**Dr. Ricardo Gómez Flores**

Director



---

**Dr. Joel Horacio Elizondo Luévano**

Director Externo

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**

A mis padres y hermanos, gracias a ustedes me he convertido en la persona que soy hoy en día y que me han enseñado a no rendirme y concluir todo lo que me propongo.

A mi familia, que siempre me ha apoyado y alentado a seguir adelante, en especial a mi tía Adelita por todas las palabras de aliento y enseñanzas.

A mis abuelos, que siempre han estado enseñándome a enfrentar las situaciones que presenta la vida mediante su experiencia y amor.

A mis primos, que siempre puedo contar con su apoyo, gracias por sus risas y alegrías, por los momentos que pasamos juntos que son inolvidables.

A mis amigos de maestría, Ana, Amalia, Azael, Becky y Alexia, por los momentos compartidos, las desveladas, las tareas en equipo y ser parte importante para el combustible día a día a lo largo de estos semestres además de su apoyo y ser parte de mi familia foránea.

A Juan, gracias a su apoyo incondicional, motivación y compañía me impulso a comenzar esta aventura, además de alentarme a no rendirme y seguir adelante para llegar a lo más alto posible.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Servando, Maribel, Angello, Diego, Ricardo, Ángel, Viri, Edith y Rosa, por sus consejos y enseñanzas a lo largo de mi estancia en el laboratorio, en especial al Dr. Ricardo Gómez Flores por su apoyo y brindarme la oportunidad de ser su alumna y al Dr. César y Jesica que gracias a sus explicaciones, recomendaciones, apoyo y paciencia pude lograr realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca otorgada (N° 814415).

A la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por permitirme realizar este trabajo en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## DEDICATORIAS

*A mis padres Eudor y Verónica, gracias a su apoyo me permitieron salir adelante y poder concluir mis estudios de maestría, guiándome por el camino y alentándome a llegar cada día más alto.*

*A mis hermanos Karla, Sarahí y Andrés, por estar para apoyarme en todo momento.*

*A Dios, por permitirme cumplir una meta más en mi vida y brindarme una familia tan especial.*

# INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIAS .....	II
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Cáncer.....	2
2.1.1. Características del cáncer. ....	2
2.1.2. Linfoma. ....	2
2.2. Metabolitos bioactivos. ....	4
2.2.1. Plantas. ....	5
2.2.2. Bacterias. ....	5
2.2.3. Hongos.....	5
2.3. <i>Lophocereus marginatus</i> . ....	5
2.3.1. Uso medicinal de <i>Lophocereus marginatus</i> . ....	5
2.3.2. Hongos endófitos en <i>Lophocereus marginatus</i> . ....	6
2.4. Vías de regulación. ....	6
3. JUSTIFICACIÓN .....	8
4. HIPÓTESIS.....	9
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	10

5.1. OBJETIVO GENERAL. ....	10
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	10
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
6.1. Cultivo de microorganismos. ....	11
6.2. Conservación de cepas. ....	11
6.3. Obtención de extractos de hongos a escala semi-piloto. ....	11
6.3.1. Fermentación del hongo a nivel semi-piloto. ....	11
6.3.2. Recuperación de biomasa y sobrenadante. ....	11
6.3.3. Recuperación de extractos. ....	12
6.4. Líneas celulares. ....	12
6.5. Actividad antitumoral <i>in vitro</i> de extractos contra el linfoma murino L5178Y-R. ....	12
6.5.1. Efecto de los extractos contra la línea celular de linfoma murino L5178Y-R. ...	12
6.5.2. Actividad antioxidante por ensayo de DPPH. ....	13
6.5.3. Actividad hemolítica y anti-hemolítica. ....	13
6.6. Efecto <i>in vitro</i> de extractos de hongos endófitos en la regulación de genes relacionados con vías de muerte en linfoma murino. ....	14
6.6.1. Extracción de RNA. ....	14
6.6.2. Obtención de cDNA. ....	14
6.6.3. Análisis de expresión de genes. ....	14
6.7. Efecto <i>in vivo</i> de extractos de hongos endófitos contra el linfoma murino L5178Y-R. ....	15
6.7.1. Máxima dosis tolerada. ....	15
6.7.2. Efecto de los extractos en el modelo de tumor murino L5178Y-R. ....	16
6.8. Análisis estadístico. ....	17
7. RESULTADOS .....	18



7.1. Actividad antitumoral <i>in vitro</i> de extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> contra el linfoma murino L5178Y-R.....	18
7.2. Efecto <i>in vitro</i> de extractos de hongos endófitos de <i>Lophocereus marginatus</i> en la regulación de genes relacionados con vías de muerte en el linfoma murino. ....	20
7.3. Efecto <i>in vivo</i> de los extractos de hongos endófitos contra el linfoma murino L5178Y-R.....	22
7.3.1. Máxima dosis tolerada.....	22
7.3.2. Efecto de tratamiento con extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> en ratones BALB/c que presentan el tumor L5178Y-R.....	24
8. DISCUSIÓN .....	26
9. CONCLUSIONES .....	31
10. PERSPECTIVAS .....	32
11. BIBLIOGRAFÍA .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Secuencias de primers utilizados (pb: pares de bases; F: forward; R: reverse).	15
2	Score clínico.	16
3	Rendimiento de extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> .	19
4	Actividad antitumoral <i>in vitro</i> de extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> .	19
5	Actividad biológica de extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> .	20
6	Porcentaje de sobrevivencia a los 14 d de ratones BALB/c tratados con extracto de acetato de etilo y vehículo.	23
7	Pruebas de función hepática realizada a ratones tratados con extracto de <i>A. versicolor</i> , <i>M. anisopliae</i> , vehículo y sin tratar.	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	A) <i>A. versicolor</i> en agar PDA; B) Fermentación de <i>A. versicolor</i> al día 15 en CM; C) <i>M. anisopliae</i> en agar PDA; D) Fermentación de <i>M. anisopliae</i> al día 7 en PDB.	18
2	Expresión de genes en gel de agarosa al 1% de células de linfoma L5178Y-R tratadas con los distintos extractos (C: control sin tratamiento; 5H: <i>A. versicolor</i> extracto hexánico; 5A: <i>A. versicolor</i> extracto de acetato de etilo; 7H: <i>M. anisopliae</i> extracto hexánico; 7A: <i>M. anisopliae</i> extracto de acetato de etilo).	21
3	Mapa de calor de expresión génica de células L5178Y-R tratadas con extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> (5H: <i>A. versicolor</i> extracto hexánico; 5A: <i>A. versicolor</i> extracto de acetato de etilo; 7H: <i>M. anisopliae</i> extracto hexánico; 7A: <i>M. anisopliae</i> extracto de acetato de etilo).	22
4	Variación de peso de los ratones tratados con extracto y vehículo durante 14 d. * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ , **** $p < 0.0001$ .	23
5	Sobrevivencia de ratones BALB/c hembras tratados con extracto de acetato de etilo de los hongos <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> , vehículo y sin tratar.	25
6	Volumen tumoral de ratones BALB/c hembras tratados con extracto de acetato de etilo de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> , vehículo y sin tratar. * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ , **** $p < 0.0001$ .	25

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
AAPH	Dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
Cas3	Caspasa 3
cDNA	DNA complementario
Cel	Células
CM	Caldo de malta
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
d	Días
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y colaboradores
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
h	Hora
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media máxima

INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IS	Índice de selectividad
Kg	Kilogramo
L	Litro
mg	Miligramo
min	Min
mL	Mililitro
mM	Micromolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas
nm	Nanóm
p53	Proteína tumoral p53
PARP1	Poli ADP ribosa polimerasas
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
PEG-300	Polietilenglicol 300
pH	Potencial de hidrogeniones
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

## RESUMEN

El linfoma es un tipo de cáncer del sistema linfático que afecta las células inmunitarias, alterando su funcionalidad y/o presentando un crecimiento descontrolado. Se ha encontrado que los hongos endófitos de plantas como *Lophocereus marginatus*, presentan actividad antitumoral *in vitro* hacia diversos tipos de cáncer humanos y animales, sin embargo, es importante conocer el mecanismo molecular que influye en esta cualidad, así como su eficacia *in vivo*, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antitumoral de hongos endófitos *in vitro* e *in vivo* asociados a *L. marginatus* en un modelo de linfoma murino L5178Y-R. Se obtuvieron extractos de acetato de etilo y hexano de *Metarhizium anisopliae* y *Aspergillus versicolor* previamente aislados de *L. marginatus* y se evaluó la inhibición del crecimiento de la línea celular L5178Y-R y células mononucleares de sangre periférica humana (control sano) mediante la técnica colorimétrica de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-difeniltetrazolio (MTT). La evaluación de la expresión génica se realizó por densitometría de los genes GAPDH, Bax, Cas3, p53, PARP1 y Bcl-2 mediante PCR punto final. Por otra parte, se realizó el tratamiento con extractos a ratones con tumor L5178Y-R y se evaluó su sobrevivencia y volumen tumoral. Los extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* mostraron IC<sub>50</sub> más bajos ( $13.51 \pm 1.62$  y  $9.168 \pm 1.21$  µg/mL respectivamente) e índices de selectividad (IS) mayores a 30. La modulación de la expresión génica mostró que los extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* disminuyeron la expresión de Cas3 y PARP1, mientras que el extracto hexánico de *M. anisopliae* aumentó la expresión de Cas3, p53 y PARP1. La máxima dosis tolerada indicó que el extracto y el vehículo no mostraron evidencia de daño hepático a 100 mg/kg de peso. Al tratar los ratones con tumor evidente, se observó un aumento en la sobrevivencia por los extractos de *A. versicolor*, llegando a 17 d, además de no aumentar el volumen tumoral durante los primeros 10 d, mientras que el control sin tratamiento, vehículo y extracto de *M. anisopliae* tuvieron una sobrevivencia de 10 d. Los metabolitos secundarios producidos por *A. versicolor* y *M. anisopliae* asociados a *L. marginatus* presentaron actividad antitumoral contra células del linfoma murino L5178Y-R, mediante la modulación de genes asociados a vías de muerte, además de aumentar la sobrevivencia de los ratones en el modelo *in vivo* de linfoma.

## ABSTRACT

Lymphoma is a type of cancer of the lymphatic system that affects immune cells, causing them to lose their functionality and exhibit uncontrolled growth. It has been found antitumor activity of endophytic fungi from plants such as *Lophocereus marginatus* against various types of human and animal cancer. However, it is important to know its molecular mechanism, as well as its effectiveness *in vivo*. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antitumor *in vitro* and *in vivo* effect of endophytic fungi associated with *L. marginatus* in the L5178Y-R murine lymphoma model. For this, we obtained *L. marginatus*-derived *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus versicolor* ethyl acetate and hexane extracts and evaluated their effect on L5178Y-R lymphoma cells and human peripheral blood mononuclear cells viability by the colorimetric 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide reduction assay. Evaluation of gene expression was performed by densitometry of the genes GAPDH, Bax, Cas3, p53, PARP1, and Bcl-2 using endpoint PCR. On the other hand, L5178Y-R tumor-bearing mice were treated with extracts and survival and tumor volume were evaluated. *A. versicolor* and *M. anisopliae* ethyl acetate extracts showed lower IC<sub>50</sub> ( $13.51 \pm 1.62$  and  $9.168 \pm 1.21$   $\mu\text{g/mL}$  respectively), selectivity indices greater than 30. Regarding the modulation of gene expression, it was observed that *A. versicolor* ethyl acetate extracts inhibited the expression of Cas3, and PARP1, whereas *M. anisopliae* hexane extract increased the expression of Cas3, p53, and PARP1. The maximum tolerated dose test showed that the extract and vehicle did not cause liver damage. When treating tumor-bearing mice with extracts, we observed an increase in survival after using *A. versicolor* extracts, reaching 17 days, in addition to not increasing the tumor volume during the first 10 days, whereas the control without treatment, vehicle, and *M. anisopliae* extract had a survival of 10 days. Secondary metabolites produced by *A. versicolor* and *M. anisopliae* associated with *L. marginatus* had antitumor activity against murine lymphoma L5178Y-R by modulating genes associated with death pathways, in addition to increasing survival in the *in vivo* model of murine lymphoma.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa uno de los problemas de salud más importantes actualmente, es considerado una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El linfoma no Hodgkin es un tipo de cáncer que en el 2020 ocupó el onceavo lugar de incidencia a nivel mundial (GLOBOCAN 2020).

El origen y forma de actuar del cáncer es muy complejo y variable. Se han encontrado distintas moléculas con mayor efectividad para el tratamiento de ciertos tipos de cánceres, los cuales son una alternativa más especializada, eficiente y con menos reacciones secundarias que algunos tratamientos tradicionales (Seca y Pinto 2018).

Estas moléculas son principalmente encontradas en los metabolitos secundarios, estos son subproductos del metabolismo de los organismos con distintas características que les han permitido ser parte importante para la industria, la agricultura, la medicina, etc. (Yeshi et al. 2022). El uso de microorganismos en la producción de metabolitos secundarios es de gran importancia, ya que la mayoría de estos metabolitos suelen poseer una estructura distintiva, no obstante, el 40% de estos metabolitos no pueden ser sintetizados químicamente (Thirumurugan et al. 2018).

Los microorganismos endófitos de plantas son candidatos clave en la búsqueda de nuevos productores de metabolitos secundarios, ya que al ser parte de una planta están expuestos a distintas moléculas, condiciones de estrés y patógenos, lo que los lleva a generar o aumentar la producción de ciertos metabolitos que pueden ser aprovechados con fines biotecnológicos para la creación de nuevas tecnologías (Sánchez-Fernández et al. 2013).

Diversos estudios han demostrado el poder biológico y farmacéutico de los hongos endófitos como herramienta en la obtención de metabolitos con acción citotóxica en el control de distintos tipos de cáncer, como cánceres sólidos y líquidos de humanos y animales por hongos endófitos de *Lophocereus marginatus* (Ramírez-Villalobos et al. 2021) abriendo la puerta a un área de oportunidad para poder comprender de manera más profunda el mecanismo de acción de los extractos obtenidos por estos microorganismos.



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Cáncer.**

El cáncer representa un amplio grupo de células, las cuales durante su desarrollo presentan características anormales tales como crecimiento descontrolado en los distintos tejidos, presentar autocontrol en ellas mismas e invasión a tejidos adyacentes o distales. Este crecimiento anormal de células puede ocasionar tumores malignos además de una decadencia y posible pérdida de la función normal del tejido afectado (Torpy et al. 2010; De la Garza y Juárez 2013). La aparición de estas células anormales se asocia a mutaciones en el material genético de las mismas y las cuales pueden ser mutaciones heredadas o adquiridas por exposición a agentes ambientales, químicos o biológicos (Sánchez 2013).

#### **2.1.1. Características del cáncer.**

El cáncer presenta ocho características adquiridas durante el desarrollo de esta enfermedad. Estas incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los supresores de crecimiento, activación de invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune. También se ha encontrado que posee dos características denominadas como habilitadoras, las cuales corresponden a inestabilidad y mutación del genoma e inflamación promotora de tumores (Hanahan y Weinberg 2011). Recientemente, se han propuesto nuevas características que han surgido gracias al estudio y avances tecnológicos actuales, estas nuevas características abarcan desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes (Hanahan 2022).

#### **2.1.2. Linfoma.**

El término linfoma hace referencia a cánceres del sistema linfático que pueden afectar distintas áreas del organismo. Estos se originan de células inmunes a lo largo de sus etapas de diferenciación y representan uno de los principales tipos de cáncer que afectan a los pacientes alrededor del mundo (Torpy et al. 2010; Quintero 2014; Ferlay et al. 2021). El linfoma puede agruparse en dos categorías, el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin (Miller et al. 2019).

El linfoma de Hodgkin es una neoplasia que afecta a los ganglios linfáticos. Se caracteriza por presentar un tipo de células tumorales denominadas células de Reed-Sternberg (presentes en el linfoma de Hodgkin clásico) y linfocítico-histiocíticas (presentes en el linfoma de Hodgkin nodular linfocítico) (Pérez-Zúñiga et al. 2019; Quintero et al. 2019). Este tipo de linfoma es el menos común y con las mayores posibilidades de curación, además su mayor tasa de incidencia se da en la adolescencia-adulto joven y en mayores de 55 años (Quintero et al. 2019). El tratamiento para pacientes que padecen este tipo de linfoma varía respecto a la etapa en la que se encuentre el paciente y la subclase de linfoma que padezca. Para la subclase clásica el tratamiento común es quimioterapia multifarmacológica y en menor medida combinado con radioterapia, en caso de no ser lo suficientemente efectivos se puede utilizar trasplante de células madre o el uso brentuximab-vedotin, un conjugado anticuerpo fármaco. Por otra parte, para la subclase nodular linfocítica en una etapa temprana de la enfermedad, se suele usar solamente radiación, mientras que para una etapa avanzada de la enfermedad se usa quimioterapia con radiación, o bien, el anticuerpo monoclonal rituximab (Miller et al. 2019; Chu et al. 2021).

Por su parte, el linfoma no Hodgkin es el tipo de linfoma más agresivo y en las últimas décadas ha aumentado su incidencia. Este tipo de linfoma comprende distintos trastornos en la proliferación de linfocitos T, linfocitos B y células NK, manifestándose principalmente como linfadenopatías o tumores sólidos (Quintero 2014; Bowzyk Al-Naeb et al. 2018). La presencia de esta enfermedad puede estar asociada con factores como infecciones, medio ambiente, estado de inmunodeficiencia, inflamación crónica y algunos virus, como el virus de Epstein-Barr y el virus de Hepatitis C (Sapkota y Shaikh 2023). Se conocen al menos 50 subtipos de linfoma no Hodgkin y su clasificación es compleja y se encuentra en constante actualización, por lo que se les asignó una clasificación general de acuerdo con el pronóstico de la enfermedad que consta de indolente (linfoma de bajo grado) o agresivo (linfoma de alto grado) (Bowzyk Al-Naeb et al. 2018). Dentro de los linfomas no Hodgkin el más frecuente es el linfoma de células B. El tratamiento de este linfoma es complejo y varía según el grado y tipo de linfoma, etapa del tumor y características del paciente, sin embargo, en términos generales el

tratamiento para estos pacientes es quimioterapia junto con inmunoterapia, en ocasiones con radiación (Miller et al. 2019; Sapkota y Shaikh 2023).

## **2.2. Metabolitos bioactivos.**

Un metabolito es un producto intermediario en el metabolismo celular que posee varias funciones como energía, señalización, actividad sobre enzimas, defensa, entre otros (Jain et al. 2019). Los metabolitos pueden dividirse en primarios y secundarios. Los primeros desempeñan papeles funcionales o estructurales en la célula, mientras que los metabolitos secundarios son derivados del metabolismo primario y pueden no estar directamente implicados en las necesidades básicas y supervivencia de la célula o el organismo que comprende (Thirumurugan et al. 2018). Estos últimos han tenido gran interés en la biotecnología actual ya que se han identificado metabolitos con actividad antibiótica, antifúngica, antioxidante, insecticida y antitumoral, entre otras (Zaynab et al. 2018; Devi et al. 2020).

A lo largo de los años y el avance de técnicas de separación se han encontrado una amplia cantidad de metabolitos secundarios, por lo que se ha establecido una clasificación básica que comprende tres grandes grupos, los compuestos terpénicos, fenólicos y los que contienen nitrógeno (Agostini-Costa et al. 2012).

Existen diversas fuentes de metabolitos secundarios, incluyendo las plantas, las bacterias y los hongos por su eficiencia de producción, extracción, propiedades y cantidad de compuestos encontrados, los cuales actualmente tienen aplicaciones en la medicina, industria, alimentos y agricultura, entre otras (Thirumurugan et al. 2018; Devi et al. 2020; Gallardo y Seca 2022).

En los estudios actuales para la producción de metabolitos secundarios, dichos organismos poseen la ventaja del uso de distintas técnicas para manipular la expresión de ciertos metabolitos, como lo es el cultivo *in vitro* de células vegetales, aplicación de distintas condiciones de luz, estrés, condiciones de cultivo de los microorganismos, modificación genética, simbiosis o la exposición a ciertos patógenos, esto maximiza la eficiencia de recuperación y afinidad del compuesto deseado al propósito establecido (Kusvuran 2021; Kumari et al. 2022; Yeshi et al. 2022; Zhang et al. 2022).

### **2.2.1. Plantas.**

Los metabolitos secundarios son subproductos importantes de las plantas, algunos de estos juegan papel para la defensa y supervivencia de estas, siendo la etapa de crecimiento de la planta donde hay un mayor nivel en su producción (Agostini-Costa et al. 2012). Las plantas son de gran importancia en la actualidad para la producción de metabolitos secundarios ya que se han reportado hasta el 2018 un aproximado de 600,000 a 700,000 compuestos (Thirumurugan et al. 2018), además por la parte económica se busca el uso de estos en los residuos de origen vegetal como una alternativa para el aprovechamiento de desechos (Chiocchio et al. 2021).

### **2.2.2. Bacterias.**

Dentro del uso de bacterias como productores de metabolitos secundarios destacan los actinomicetos, los cuales, según los reportes, son responsables de producir más de 10,000 agentes antimicrobianos con aplicación farmacéutica, además de ser de gran importancia para la producción de bioplaguicidas, compuestos antitumorales, pigmentos, enzimas, entre muchos más (Selim et al. 2021).

### **2.2.3. Hongos.**

Los hongos son catalogados como cultivos farmacéuticamente útiles para la producción de metabolitos secundarios farmacéuticos (Devi et al. 2020). Además, se ha comprobado que los hongos endófitos son responsables de producir ciertos metabolitos con estructuras novedosas y exclusivas con gran potencial tecnológico (Sánchez-Fernández et al. 2013).

## **2.3. *Lophocereus marginatus*.**

*Lophocereus marginatus* es una cactácea arborescente que presenta tallos columnares ramificados por daños apicales, de color verde que puede alcanzar de 5 a 7 m de altura. Comúnmente es llamado “cactus órgano”. Produce flores blancas-rojizas que posteriormente forman nuevas yemas florales y espinas. Esta cactácea se encuentra distribuida desde el suroeste de Estados Unidos de América hasta la mayor parte de México (Arias et al. 2012; Arias y Aquino 2019).

### **2.3.1. Uso medicinal de *Lophocereus marginatus*.**

Existen registros sobre el uso de *L. marginatus* por parte de la población con fines medicinales (Casas 2002), incluyendo el tratamiento de diabetes e infecciones

gastrointestinales. Además, científicamente se ha comprobado que esta planta presenta efectos hipoglucemiantes (Andrade-Cetto y Heinrich 2005) potencial antimicrobiano y actividad cicatrizante (Quezada-Salinas et al. 2021). También se ha encontrado que esta planta produce un alcaloide denominado pilocereína (Romo de Vivar et al. 2007). Estudios recientes han demostrado que extractos obtenidos a partir de *L. marginatus* presentan actividad citotóxica ante distintas líneas celulares de linfoma murino L5178Y-R (Hernández-Martínez et al. 2016).

### **2.3.2. Hongos endófitos en *Lophocereus marginatus*.**

Se han reportado al menos 4 hongos aislados de tallos de *L. marginatus* con interés biotecnológico, estos son *Penicillium citrinum*, *Aspergillus versicolor*, *Metarhizium anisopliae* y *Cladosporium* sp. (Ramírez-Villalobos et al. 2021).

### **2.4. Vías de regulación.**

Existen diversos estudios donde metabolitos secundarios de distintos microorganismos han demostrado intervenir en diversas vías de regulación, teniendo un efecto antitumoral en distintas líneas cancerosas. Uno de los ejemplos más estudiados es el líquen, donde sus extractos han demostrado poseer actividad moduladora de la expresión de genes relacionados con la apoptosis, como lo son caspasas, p38, p53 y familia Bcl-2 en distintos tipos de cáncer, además de inhibir la proliferación, regulando las vías de señalización ERK1/2 y Akt, la modulación en vías relacionadas con invasión del cáncer regulando la cascada PI3K/Akt/mTOR, Paxillin/Rac-1 y STAT, entre otras (Solárová et al. 2020).

Se han realizado muchos estudios del efecto de los hongos endófitos con actividad antitumoral. En un estudio realizado por Sajna et al. (2020), se demostró que los extractos con acetato de etilo del micelio de *Aspergillus unguis* endófito de las macroalgas del género *Enteromorpha* sp. promueven la apoptosis en células HeLa. Además, el interés en estos metabolitos ha conducido también a su aislamiento y el estudio de las moléculas encontradas en su acción antitumoral, regulando la expresión génica, tal es el caso del paclitaxel, el cual es encontrado en los hongos endófitos *M. anisopliae*, *Tubercularia* sp., *Pestalotiopsis terminaliae*, *Aspergillus* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Botrytis* sp., entre otros. Una de sus formas de actuar es disminuyendo la expresión de Bcl-2 y aumentando la expresión de DR5 y caspasa 3 lo que mejora el efecto proapoptótico de TRAIL (ligando

inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) en células HeLa (Rai et al. 2022).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El linfoma es un conjunto de cánceres que parten del sistema linfático. En México, según cifras presentadas por INEGI (2023), en el año 2021 el 8% de las defunciones totales registradas corresponden a muertes por tumores malignos, ocupando el linfoma no Hodgkin la cuarta posición de muertes en niños de entre 0 y 14 años y ocupando la tercera posición en hombres de 15 a 29 años.

Los tratamientos tradicionales para el cáncer son muy agresivos, pueden afectar la calidad de vida de los pacientes y dejar efectos secundarios en los pacientes que los reciben. Debido a ello los esfuerzos de la comunidad científica para encontrar nuevas alternativas de tratamiento para los distintos tipos de cáncer ha ido en aumento en los últimos años, encontrándose que algunos extractos poseen compuestos bioactivos con actividad antitumoral hacia distintos tipos de cáncer. Microorganismos endófitos de *L. marginatus* han sido reportados que presentan actividad antitumoral en distintas líneas de cáncer, incluida el linfoma, por lo que presentan un área de oportunidad novedosa y prometedora para que junto con herramientas biotecnológicas se defina su mecanismo de acción y poderlos establecer como una propuesta de tratamiento.

En este trabajo se busca determinar el efecto antitumoral de extractos de microorganismos endófitos de *L. marginatus*, así como su evaluación a nivel de expresión génica.

#### **4. HIPÓTESIS**

Metabolitos secundarios producidos por hongos asociados a *Lophocereus marginatus* inducen la activación de genes relacionados con actividad antitumoral, en el modelo *in vitro* de linfoma murino L5178Y-R.



## **5. OBJETIVO DEL TRABAJO**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* de hongos endófitos asociados a *Lophocereus marginatus*, en el modelo de linfoma murino L5178Y-R.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Evaluar la actividad antitumoral *in vitro* de extractos de hongos endófitos de *Lophocereus marginatus* contra el linfoma murino L5178Y-R, producidos a nivel semi-piloto.
2. Evaluar el efecto *in vitro* de extractos de hongos endófitos de *Lophocereus marginatus* en la regulación de genes relacionados con vías de muerte en el linfoma murino L5178Y-R.
3. Evaluar el efecto *in vivo* de los extractos de hongos endófitos contra el linfoma murino L5178Y-R.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los hongos utilizados en este estudio fueron *Aspergillus versicolor* (PME-H005) y *Metarhizium anisopliae* (PME-H007) que son endófitos de *L. marginatus*, previamente aislados y caracterizados por el Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas (Ramírez-Villalobos et al. 2021).

### 6.1. Cultivo de microorganismos.

Los hongos proporcionados fueron cultivados en agar papa dextrosa (PDA, TM Media, Delhi, India) por un periodo de 10 d para PME-H007 y 12 d para PME-H005, a una temperatura de 28 °C.

### 6.2. Conservación de cepas.

La conservación de cepas de los microorganismos se realizó mediante el método de congelación a -70 °C con glicerol al 30%.

### 6.3. Obtención de extractos de hongos a escala semi-piloto.

#### 6.3.1. Fermentación del hongo a nivel semi-piloto.

A partir del cultivo en PDA se realizó una fermentación de cada hongo en matraces con 1 L de medio de cultivo; para el caso de PME-H005, la fermentación se llevó a cabo en caldo de malta (peptona de caseína, Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, EE. UU; extracto de malta, Merck, Darmstadt, Alemania; extracto de levadura, Difco Laboratories, UK) con un pH de 4.7, utilizando como inóculo fragmentos del hongo de 1 cm<sup>2</sup> y un tiempo de fermentación de 14 d sin agitación a una temperatura constante de 28 °C. Para el caso de PME-H007, se llevó a cabo en caldo papa dextrosa (PDB, TM media, Delhi) utilizando como inóculo fragmentos del hongo de 1 cm<sup>2</sup> y en agitación constante a 150 rpm a 28 °C durante 7 d.

#### 6.3.2. Recuperación de biomasa y sobrenadante.

Después de la fermentación, se realizó una filtración y se recuperó la biomasa y sobrenadante para cada hongo. El sobrenadante se almacenó en un frasco estéril, mientras que la biomasa fue secada en un horno a 40 °C durante 24 h, después de lo cual se realizó su molienda, utilizando un molino Hamilton Beach (modelo 80335R) y fue almacenada en un tubo estéril.

### **6.3.3. Recuperación de extractos.**

La biomasa de cada hongo se sometió a extracciones por el método Soxhlet (PME-H007) y maceración (PME-H005), utilizando hexano como solvente durante 48 h para ambos casos. En el sobrenadante se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo a una proporción de 1:1. Una vez obtenidos los extractos se procedió a su rotoevaporación (Buchi R-3000; Brinkman Instruments, Inc., EE. UU) y su reconstitución con dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) y almacenamiento a -20 °C.

### **6.4. Líneas celulares.**

La línea de linfoma murino L5178Y-R (ATCC: CRL-1722) fue proporcionada por el Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Como control se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas mediante centrifugación en Ficoll-Paque (Bøyum 1976). Ambas líneas celulares se mantuvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% a temperatura constante de 37 °C con atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.5. Actividad antitumoral *in vitro* de extractos contra el linfoma murino L5178Y-R.**

#### **6.5.1. Efecto de los extractos contra la línea celular de linfoma murino L5178Y-R.**

Se colocaron las células L5178Y-R a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pozo y para el caso de las PBMC a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pozo en placas de 96 pozos con medio RPMI y se incubaron durante 24 h, después de lo cual se aplicaron los tratamientos de cada extracto a concentraciones de 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.625 µg/mL junto con control positivo de sulfato de vincristina a la concentración de 0.05 µg/mL y se incubó a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. Posteriormente se realizó el ensayo de reducción del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), incorporando 15 µL de reactivo a cada pozo y se dejó incubando por 4 h más. Se añadió DMSO para disolver los cristales formados y se realizó la lectura de las placas en un lector de microplacas (MULTISKAN GO; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una longitud

de onda de 570 nm. A partir de las lecturas se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento celular, utilizando la siguiente fórmula (Quintanilla-Licea et al. 2016):

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(A_{570} \text{ en células tratadas} / A_{570} \text{ células no tratadas}) \times 100]$$

Una vez obtenido el porcentaje de inhibición se realizaron los cálculos correspondientes para la obtención de la concentración inhibitoria media IC<sub>50</sub> y el índice de selectividad (IS) para cada extracto.

### **6.5.2. Actividad antioxidante por ensayo de DPPH.**

Se realizó un ensayo de actividad antioxidante de los extractos obtenidos, utilizando el método 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) descrito por Sajna et al. (2020). Como control negativo se empleó DMSO y como estándar, ácido ascórbico a concentraciones de 10-100 µg/mL. Se colocaron en una microplaca 100 µL de extracto a diferentes concentraciones y 100 µL de DPPH para posteriormente incubar en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas y se procedió al cálculo de porcentaje de inhibición del radical DPPH.

### **6.5.3. Actividad hemolítica y anti-hemolítica.**

La actividad hemolítica de los extractos se determinó mediante el método descrito por Vieira et al. (2021). Se obtuvieron 20 mL de sangre de un voluntario sano en tubos con anticoagulante EDTA, después de lo cual se realizaron tres lavados a los glóbulos rojos con buffer de fosfatos salino (PBS) con pH de 7.2 y se prepararon eritrocitos en suspensión al 5% en PBS estéril. Posteriormente en tubos de 2 mL se agregaron por triplicado las concentraciones de los extractos a evaluar (250, 125, 62.5, 31.25 y 15.625 µg/mL) y la suspensión de eritrocitos. Como control positivo se utilizó agua destilada y como control negativo PBS. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min y se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 13,000 rpm. Para evaluar la actividad anti-hemolítica se utilizó el método descrito por (Rodríguez-Garza et al. 2023), donde a la solución de eritrocitos se le agregó dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) a la concentración de 150 mM y extracto, utilizando PBS como control negativo y eritrocitos con AAPH como control positivo, después de lo cual se incubó a 37 °C durante 5 h a 200 rpm y se centrifugó con las condiciones descritas anteriormente. Para ambos casos una vez centrifugada la

muestra se tomaron 200 µL del sobrenadante y se colocaron en una microplaca de 96 pozos para medir su densidad óptica a 540 nm.

Se calculó el porcentaje de hemólisis y anti-hemólisis mediante las siguientes fórmulas:

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

$$\% \text{ Inhibición de AAPH} = 1 - \left( \frac{DO_{540} \text{ tratamiento} - DO_{540} \text{ control negativo}}{DO_{540} \text{ control positivo} - DO_{540} \text{ control negativo}} \times 100 \right)$$

## **6.6. Efecto *in vitro* de extractos de hongos endófitos en la regulación de genes relacionados con vías de muerte en linfoma murino.**

### **6.6.1. Extracción de RNA.**

Se realizó una extracción de RNA por el método de TRIzol (Thermo Fisher Scientific, 2020) a células de linfoma murino L5178Y-R tratadas con la IC<sub>50</sub> de cada extracto durante 24 h. Una vez obtenido el RNA se conservó en isopropanol a -20 °C por 24 h.

### **6.6.2. Obtención de cDNA.**

Se realizó la obtención de cDNA de cada muestra utilizando el kit y protocolo ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega. Una vez obtenido el cDNA se almacenó a -20 °C.

### **6.6.3. Análisis de expresión de genes.**

Se realizó la prueba de PCR punto final para la detección y cuantificación por densitometría (ImageJ) de los genes asociados a vías de linfoma murino, utilizando como gen endógeno GAPDH y se midió la expresión de los genes BAX, Cas3, NF-kB, PARP1, Bcl-2 y p53 con las secuencias mostradas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1:** Secuencias de primers utilizados (pb: pares de bases; F: forward; R: reverse).

Gen	Abreviación	Secuencia (5'-3')	pb	Referencia
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	F: GGT ATC GTG GAA GGA CTC ATG AC R: ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC	188	Al-Zharani et al. 2021
Poli ADP ribosa polimerasas	PARP1	F: AGG CCC TAA AGG CTC AGA AT R: CTA GGT TTC TGT GTC TTG AC	470	Rahman et al. 2021
Proteína tumoral p53	p53	F: TGG CTC TGA CTG TAC CAC CAT CC R: CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA GC	491	Al-Zharani et al. 2021
Caspasa 3	Cas3	F: ATG GGA GCA AGT CAG TGG AC R: CGT ACC AGA GCG AGA TGA CA	84	Azimi et al. 2021
Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B	Bcl-2	F: GAG CGT CAA CAG GGA GA R: GCC AGG AGA AAT CAA ACA	164	Azimi et al. 2021
Proteína X asociada a Bcl-2	BAX	F: ACT AAA GTG CCC GAG CTG A R: ACT CCA GCC ACA AAG ATG GT	161	Azimi et al. 2021
Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas	NF-κB	F: AAC AAA ATG CCC CAC GGT TA R: GGG ACG ATG CAA TGG ACT GT	113	Rahman et al. 2021

## 6.7. Efecto *in vivo* de extractos de hongos endófitos contra el linfoma murino L5178Y-R.

### 6.7.1. Máxima dosis tolerada.

Se realizó la prueba de máxima dosis tolerada siguiendo las recomendaciones establecidas por el OECD/OCDE (2002). Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6 a 7 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en un ambiente sin estrés y libres de patógenos, a una temperatura de 24 °C con ciclos de luz y oscuridad, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum*. Cada extracto fue resuspendido en un vehículo conformado por 90% PEG-300, 5% DMSO y 5% etanol al 96% (Matias et al. 2018). Los extractos fueron administrados vía intraperitoneal a una única dosis de 100 y 1,000 mg/kg para cada extracto, además se evaluaron los grupos vehículo y control. El periodo de observación fue de 14 d y durante este periodo se monitoreó el peso y el score clínico de cada ratón. Se estableció el score clínico mostrado en la **Tabla 2**, de acuerdo con las recomendaciones del OCDE (2002):

**Tabla 2:** Score clínico.

Puntaje		0	1	2
Apariencia	Pérdida de peso	Normal	>10% pérdida de peso	15-19.9% pérdida de peso
	Pelaje	Normal	Pelaje áspero	Pelaje áspero y despeinado
	Condición corporal	Normal	Delgado	Perdida de grasa corporal, sin crecimiento, condición corporal < 2
	Postura del cuerpo	Normal	Encorvado	Incapaz de mantenerse en una postura erguida o caminar
	Movimiento	Normal	Reducido/lento	Letargo o ausencia de respuesta a la estimulación
Actividad	Proximidad con otros	Contacto cercano	Algo separado	Completamente separado

En caso de que existiera una pérdida de peso  $\geq 20\%$  o un score clínico  $\geq 3$  se procedió al sacrificio de los animales.

Para el sacrificio se administró al ratón pentobarbital sódico 25-40 mg/kg como anestesia, vía intraperitoneal. Una vez anestesiado el ratón, se realizó punción cardiaca para extraer una muestra de sangre y posteriormente se le realizó la eutanasia mediante dislocación cervical. Las muestras de sangre fueron almacenadas en tubos sin heparina y centrifugadas a 3,000 rpm por 5 min para separar el suero y realizar pruebas de función hepática (Sayyad et al. 2017).

#### **6.7.2. Efecto de los extractos en el modelo de tumor murino L5178Y-R.**

Se evaluó el efecto del tratamiento con cada extracto, utilizando el modelo de linfoma murino L5178Y-R descrito por Gómez-Flores et al. (2019). Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6 a 7 semanas de edad. Estos se mantuvieron en un ambiente sin estrés y libres de patógenos, a una temperatura de 24 °C, con ciclos de luz y oscuridad, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum*.

Para activar la línea celular se realizó la inoculación de  $1 \times 10^6$  células de linfoma murino L5178Y-R suspendidas en 200  $\mu$ L de PBS, a un ratón BALB/c hembra de 6 semanas de edad, vía intraperitoneal. Una vez transcurridos 10 d, se le realizó la eutanasia al ratón y la extracción del líquido ascítico. A este se le hicieron dos lavados con RPMI y se preparó una solución a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/mL en PBS y se procedió a la inoculación vía intramuscular de 200  $\mu$ L de la suspensión en la pata izquierda de ratones BALB/c hembras de 6 a 7 semanas de edad.

Al cabo de 7 d de la implantación, se seleccionaron los ratones que portaron el tumor y se trataron con los extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae*, además se contó con un grupo tratado con el vehículo utilizado y un grupo control. Se realizó el registro de la sobrevivencia y el volumen tumoral.

La sobrevivencia fue evaluada diariamente hasta un periodo máximo de 20 d y se registró el día de eutanasia de cada individuo de cada grupo.

El volumen tumoral fue monitoreado de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{(\text{largo} \times \text{ancho}^2)}{2}$$

### **6.8. Análisis estadístico.**

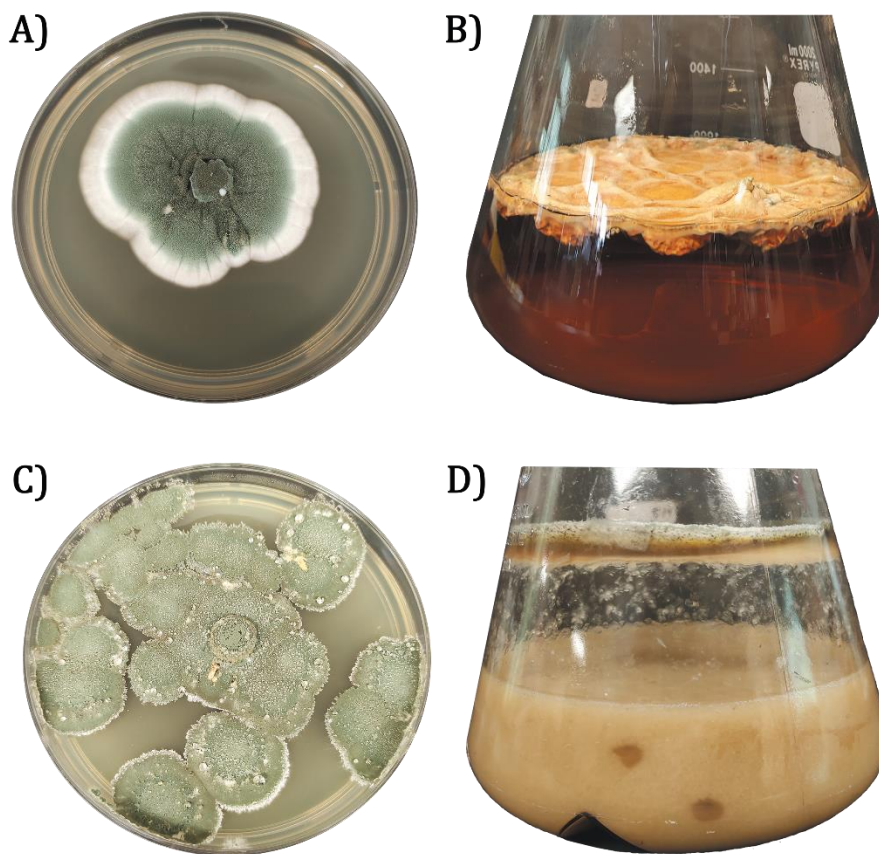
El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico GraphPad Prism 8. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) en los datos con distribución normal. Posteriormente se realizó la prueba de Tukey con una  $p < 0.05$  de significancia entre medias. Los datos de sobrevivencia se procesaron mediante el análisis de sobrevivencia Kaplan-Meier.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Actividad antitumoral *in vitro* de extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae* contra el linfoma murino L5178Y-R.

Los hongos se cultivaron en agar PDA y se tomaron fragmentos de este para la fermentación. En la **Figura 1** podemos observar la morfología del cultivo en placa y el cultivo líquido para cada hongo. En el caso de la fermentación de *A. versicolor* (B), podemos observar el crecimiento en la parte superior del medio debido a que se encontraba de manera estática, mientras que para el caso de *M. anisopliae* (D) se observa la biomasa dispersa en el medio debido a que se encontraba en constante agitación.



**Figura 1:** A) *A. versicolor* en agar PDA; B) Fermentación de *A. versicolor* al día 15 en CM; C) *M. anisopliae* en agar PDA; D) Fermentación de *M. anisopliae* al día 7 en PDB.

Una vez recuperada y procesada la biomasa se realizó la obtención de extracto hexánico y la obtención de extracto con acetato de etilo del sobrenadante, se obtuvieron los rendimientos descritos en la **Tabla 3**, donde podemos observar que en los extractos de acetato de etilo se obtuvo mejor rendimiento para el caso de *M. anisopliae*, mientras que en el caso de extractos hexánicos se obtuvo mejor rendimiento en *A. versicolor*.

**Tabla 3:** Rendimiento de extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae*.

<b>Rendimiento</b>	
<b><i>A. versicolor</i></b>	
Acetato de etilo	29.3 mg/L
Hexano	42.81 mg/g
<b><i>M. anisopliae</i></b>	
Acetato de etilo	100.1 mg/L
Hexano	21.11 mg/g

Los extractos obtenidos fueron evaluados por el método de reducción de MTT en células de linfoma murino L5178Y-R, utilizando células PBMC como control, donde se pudo observar que las células tratadas con los extractos de acetato de etilo de ambos hongos presentaban un IC<sub>50</sub> menor comparado con los extractos de hexano, además presentaron un IS mayor a 30 (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Actividad antitumoral *in vitro* de extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae*.

	<b>Inhibición de crecimiento L5178Y-R*</b>	<b>Inhibición de crecimiento PBMC*</b>	<b>Índice de selectividad</b>
<b><i>A. versicolor</i></b>			
Acetato de etilo	13.51±1.62	467.4±0.69	34.59
Hexano	70.52±1.6	180.8±1.57	2.56
<b><i>M. anisopliae</i></b>			
Acetato de etilo	9.168±1.21	348.0±1.23	37.95
Hexano	44.93±1.58	146.9±1.59	3.26

\*IC<sub>50</sub> (µg/mL)

Por otra parte, al evaluar la actividad antioxidante de los extractos de cada hongo se pudo observar que los extractos de acetato de etilo de ambos hongos poseen una mejor actividad antioxidante hacia el radical DPPH con valores IC<sub>50</sub> por debajo de los 140.2 µg/mL (**Tabla 5**). En cuanto a la actividad hemolítica, los extractos de hexano de ambos hongos presentaron hemólisis de eritrocitos, mientras que los extractos de acetato de etilo mostraron un efecto hemoprotector del eritrocito, evitando la hemólisis con una IC<sub>50</sub> menor a 27 µg/mL.

**Tabla 5:** Actividad biológica de extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae*.

	<b>Actividad antioxidante DPPH*</b>	<b>Hemólisis*</b>	<b>Anti- hemólisis (AAPH)*</b>
<b><i>A. versicolor</i></b>			
Acetato de etilo	140.2±1.4	>800	11.5±1.6
Hexano	>250	83.28±1.9	>250
<b><i>M. anisopliae</i></b>			
Acetato de etilo	111.7±1.5	>800	26.4±1.6
Hexano	>250	84.89±1.4	>250

\*IC<sub>50</sub> (µg/mL)

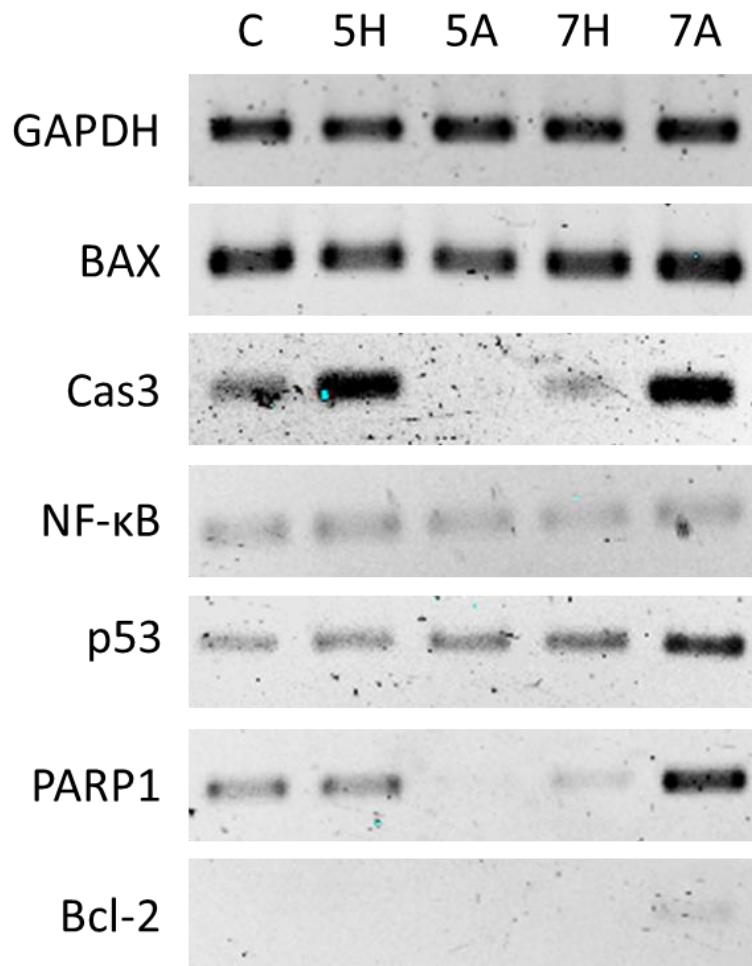
Con base a los resultados obtenidos en esta primera parte se decidió utilizar los extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* para el estudio *in vivo* ya que presentan una menor IC<sub>50</sub> en la línea celular L5178Y-R, mayor IS, además de su actividad hemoprotectora a concentraciones menores de 27 µg/mL.

### **7.2. Efecto *in vitro* de extractos de hongos endófitos de *Lophocereus marginatus* en la regulación de genes relacionados con vías de muerte en el linfoma murino.**

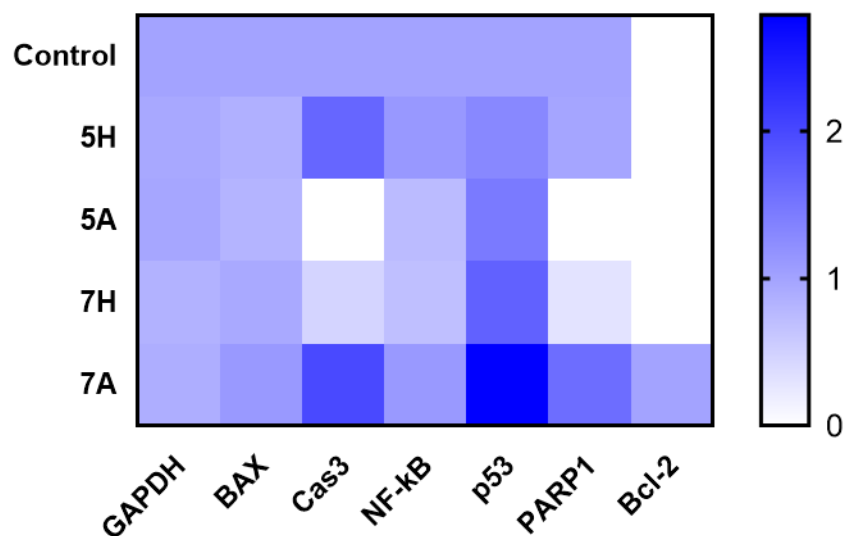
Se evaluó por PCR punto final la expresión de genes relacionados con vías de muerte. En la **Figura 2** se presentan las bandas obtenidas para cada gel y en la **Figura 3** se observa un mapa de calor con la expresión relativa de cada gen estudiado. Se puede apreciar en las células control (sin tratamiento) la expresión de los genes BAX, Cas3, NF-kB, p53 y PARP1, mientras que para Bcl-2 no se presentó expresión génica. Por otra parte, las

células tratadas con el extracto de acetato de etilo de *M. anisopliae* presentó la activación de Bcl-2 aunque en baja cantidad. Otra característica notable de este extracto es que aumentó la expresión casi al doble de Cas3 y p53 respecto al control, mientras que el extracto de acetato de *A. versicolor* inhibió la expresión de Cas3 y PARP1 de las células tratadas.

Todos los tratamientos aumentaron la expresión de p53 en las células tratadas respecto al control.



**Figura 2:** Expresión de genes en gel de agarosa al 1% de células de linfoma L5178Y-R tratadas con los distintos extractos (C: control sin tratamiento; 5H: *A. versicolor* extracto hexánico; 5A: *A. versicolor* extracto de acetato de etilo; 7H: *M. anisopliae* extracto hexánico; 7A: *M. anisopliae* extracto de acetato de etilo).



**Figura 3:** Mapa de calor de expresión génica de células L5178Y-R tratadas con extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae* (5H: *A. versicolor* extracto hexánico; 5A: *A. versicolor* extracto de acetato de etilo; 7H: *M. anisopliae* extracto hexánico; 7A: *M. anisopliae* extracto de acetato de etilo).

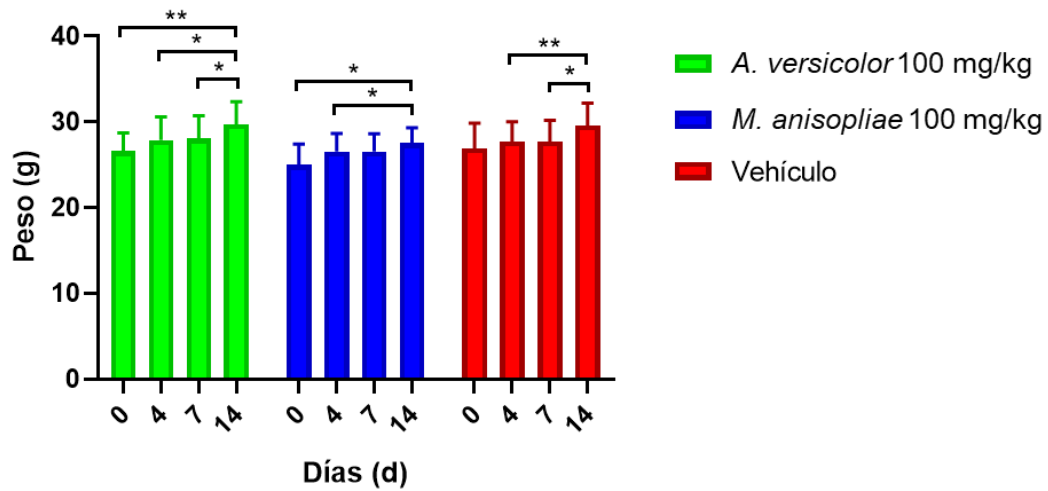
### 7.3. Efecto *in vivo* de los extractos de hongos endófitos contra el linfoma murino L5178Y-R.

#### 7.3.1. Máxima dosis tolerada.

La prueba de máxima dosis tolerada fue realizada utilizando los extractos de acetato de etilo de ambos hongos, según lo descrito en la sección 7.1. Se utilizaron las concentraciones de 100 y 1,000 mg/kg de peso del ratón y como vehículo una solución de 90% PEG-300, 5% DMSO y 5% etanol al 96%. Se realizó el monitoreo de los ratones durante 14 d, sin embargo, para el caso de la dosis de 1,000 mg/kg, la sobrevivencia de los ratones no superó la hora posterior a la administración. Por otra parte, los ratones tratados con vehículo y con a la concentración de 100 mg/kg presentaron el 100% de sobrevivencia a los 14 d, como se observa en la **Tabla 6**. No se observaron pérdidas de peso en los ratones tratados (**Figura 4**) y los resultados de las pruebas de función hepática no presentaron valores fuera de lo normal, según los rangos reportados por distintos autores y fueron similares a los obtenidos de un ratón control de la misma edad y cepa de los ratones utilizados (**Tabla 7**).

**Tabla 6:** Porcentaje de sobrevivencia a los 14 d de ratones BALB/c tratados con extracto de acetato de etilo y vehículo.

Sobrevivencia (%)	
<i>A. versicolor</i>	
1,000 mg/kg	0
100 mg/kg	100
<i>M. anisopliae</i>	
1,000 mg/kg	0
100 mg/kg	100
Vehículo	100



**Figura 4:** Variación de peso de los ratones tratados con extracto y vehículo durante 14 d. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Tabla 7:** Pruebas de función hepática realizada a ratones tratados con extracto de *A. versicolor*, *M. anisopliae*, vehículo y sin tratar.

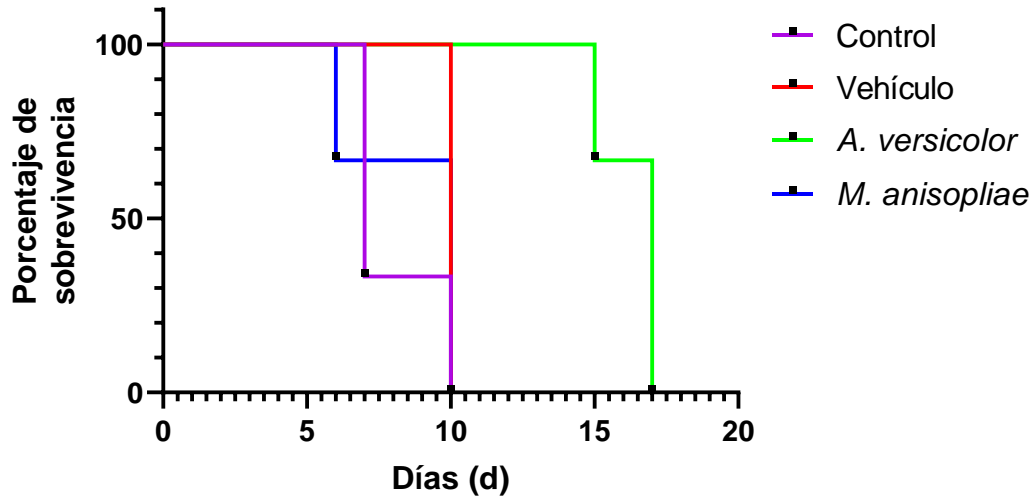
	<i>A. versicolor</i> 100 mg/kg	<i>M. anisopliae</i> 100 mg/kg	Vehículo	Control negativo	Valor de referencia
<b>Albúmina*</b>	3.1	3.3	3.3	3.4	3.1-5.3 <sup>a</sup>
<b>Proteínas totales*</b>	5.1	5.6	5.3	5.5	5.23±1.68 <sup>b</sup>
<b>Fosfatasa alcalina**</b>	361	428	365	399	362.90±226.60 <sup>b</sup>
<b>Aspartato aminotransferasa**</b>	137	341	277	122	67-381 <sup>a</sup>
<b>Alanina transaminasa**</b>	49	145	182	60	40-170 <sup>a</sup>

Unidades expresadas en: \* g/dL; \*\* U/L; <sup>a</sup> Santos et al. 2016; <sup>b</sup> Silva-Santana et al. 2020

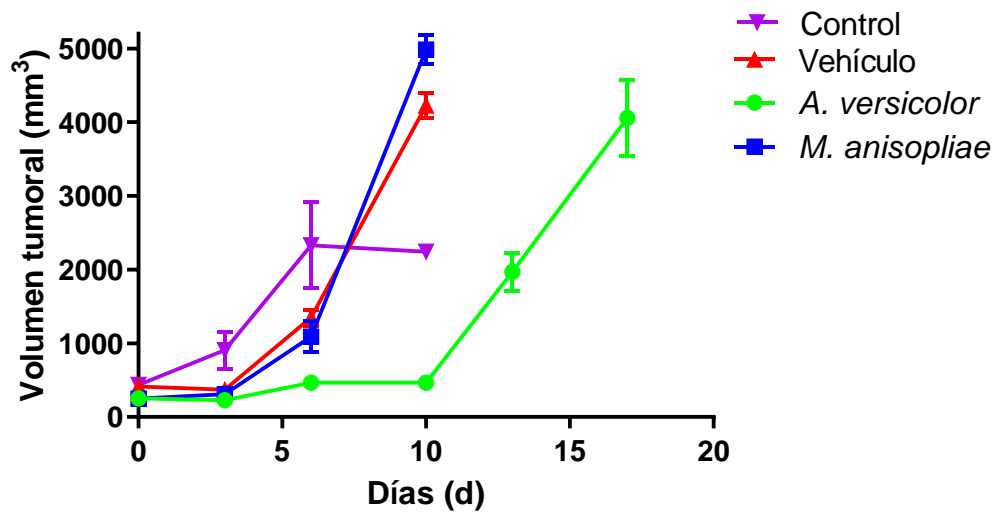
Dados estos resultados se puede decir que la dosis máxima de los extractos para poder ser administrada en el ratón es de 100 mg/kg, por lo que para el tratamiento con tumor se decidió administrar tres dosis de 30 mg/kg cada una.

### **7.3.2. Efecto de tratamiento con extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae* en ratones BALB/c que presentan el tumor L5178Y-R.**

Se realizó la administración de tres dosis de 30 mg/kg cada dos d por vía intraperitoneal, iniciando el esquema de tratamiento transcurridos los 7 d posteriores a la inoculación del tumor. Como se observa en la **Figura 5**, los ratones control, tratados con vehículo y con extracto de *M. anisopliae* presentaron una sobrevivencia máxima de 10 d, ya que exhibieron un tamaño de tumor mayor a 20 mm (**Figura 6**). Por otra parte, los ratones tratados con extracto de *A. versicolor* presentaron mayor sobrevivencia de forma significativa ( $p = 0.0449$ ), en comparación con los demás tratamientos, llegando hasta el día 17. Además, podemos observar en la **Figura 6** que el volumen tumoral de este grupo no presentó aumento significativo al día 10, en comparación con los demás tratamientos, sin embargo, si existieron diferencias significativas entre los tratamientos en el volumen tumoral al día 10 ( $p = < 0.0001$ ).



**Figura 5:** Supervivencia de ratones BALB/c hembras tratados con extracto de acetato de etilo de los hongos *A. versicolor* y *M. anisopliae*, vehículo y sin tratar.



**Figura 6:** Volumen tumoral de ratones BALB/c hembras tratados con extracto de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae*, vehículo y sin tratar. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



## 8. DISCUSIÓN

En los últimos años la tasa de morbimortalidad del cáncer ha ido en aumento, esto debido a la falta de tratamientos efectivos y a los diferentes mecanismos de esta enfermedad para evadirlos, con base en esto y dada la coevolución de los tratamientos y el cáncer, diversos estudios se han enfocado en la búsqueda de nuevas tecnologías, moléculas y estrategias para el tratamiento del cáncer, ya sea atacándolo directamente u optimizando las estrategias existentes para mejorar su efectividad (Lluch et al. 2014; Pucci et al. 2019).

En el presente estudio se produjeron y evaluaron *in vitro* e *in vivo* extractos de los hongos endófitos *A. versicolor* y *M. anisopliae*, obteniéndose buenos rendimientos en comparación con estudios anteriores con estos hongos endófitos de *L. marginatus* (Ramírez-Villalobos et al. 2023). Además, los extractos producidos de acetato de etilo y hexano obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> menores a los reportados anteriormente con extractos metanólicos. Esto puede deberse a la polaridad de los solventes utilizados y la afinidad hacia estos por parte de los compuestos presentes en los extractos. La selección de la variedad de solventes permite que la separación de los diferentes compuestos, dada su polaridad, aumente la selectividad en células tumorales, impactando directamente en la obtención de concentraciones menores en la inhibición del crecimiento en las células tumorales de linfoma y mayores para presentar un efecto nocivo en células sanas (Saetung et al. 2005; Alzeer et al. 2014).

Por otra parte, la IC<sub>50</sub> reportada para el caso de *A. versicolor* en el extracto de acetato de etilo fue de  $13.51 \pm 1.62$  µg/mL para la línea celular L5178Y-R, siendo comparable con lo reportado por Sajna et al. (2020) en extractos de acetato de etilo del género *Aspergillus* en células HeLa y MCF7 con IC<sub>50</sub> de 13.46 y 18.75 µg/mL respectivamente. También otros autores demostraron la actividad citotóxica de otras cepas de *A. versicolor* endófito y *M. anisopliae* contra distintos tipos de cáncer (Skrobek y Butt 2005; Quang et al. 2021). Cabe destacar que, aunque se ha reportado la actividad citotóxica de *A. versicolor* y *M. anisopliae* hacia distintas líneas de cáncer, los metabolitos que estos presenten pueden no ser los mismos ya que la producción de estos se ve alterada de acuerdo al ambiente nativo de cada hongo y la sinergia que estos metabolitos puedan tener entre cada uno de ellos al tratarse de extractos crudos. Estos resultados, demuestran el potencial farmacológico de

estos extractos ya que reportes anteriores muestran que extractos con IC<sub>50</sub> menores a 100 µg/mL pueden ser purificados posteriormente y presentar compuestos de mayor actividad, mejorando los rendimientos en la purificación y obtención de estos compuestos con actividad (Dowlath et al. 2020; Canga et al. 2022).

Las células pueden producir radicales libres como parte de su metabolismo. Estos radicales pueden producir daño oxidativo y aumentar el riesgo de padecer ciertas enfermedades como diabetes, trastornos cardiovasculares y algún tipo de cáncer (Masisi et al. 2016; Ibrahim et al. 2021). Una de las formas de combatir este daño oxidativo es a través de los antioxidantes, los cuales se encargan de prevenirlo y así evitar el daño que pueda ocasionar a la célula (Apak 2019). Observamos que el extracto de acetato de etilo de *A. versicolor* endófito de *L. marginatus* posee actividad antioxidante contra el radical DPPH (**Tabla 5**), la cual ya ha sido reportada en otros estudios con extractos de *A. versicolor* y le es conferida por los metabolitos que este posee siendo derivados de pirona producidos por *A. versicolor* los que han reportado una mayor capacidad antioxidante (Li et al. 2018; Shreadah et al. 2019; Khan y Javaid 2022; Hamed et al. 2023). Por otra parte, Shin et al. (2014) mostraron que 23 aislados distintos de *M. anisopliae* poseen actividad antioxidante contra el radical DPPH. La presencia de estos compuestos de actividad anti oxidante muestra potencial farmacéutico sinérgico, ya que al mezclarse con otros tratamientos quimioterapéuticos o radiactivos pudiera generarse un efecto protector en células sanas mejorando la actividad antitumoral e indirectamente la reducción de los efectos secundarios (Humne y Lokhande 2023).

La evaluación de la hemólisis es importante para determinar la citotoxicidad de un compuesto que pueda entrar en contacto con un sistema biológico (Sæbø et al. 2023). Se observó que los extractos de acetato de etilo de ambos hongos poseen actividad anti-hemolítica con valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 27 µg/mL, mientras que los extractos de hexano producen la hemólisis de eritrocitos. Esto nos indica que los extractos de acetato de etilo poseen compuestos que reducen el daño oxidativo ocasionado por el AAPH lo que impide la ruptura de la membrana del eritrocito (Nuruki et al. 2021). Además, estos extractos, presentan mayor capacidad antioxidante contra el radical DPPH, lo que nos indica que en estos se encuentran metabolitos con gran capacidad antioxidante. Es importante resaltar

que la aplicación de tratamientos quimioterapéuticos se realiza de manera intravenosa, por lo cual este efecto antihemolítico es importante para proteger eritrocitos y otras células del torrente sanguíneo, evitando de esta manera la presencia de anemia en algunos pacientes (Greco et al. 2020; Azab y Mostafa 2021; Ousaaid et al. 2022).

Los compuestos bioactivos pueden modular una o varias vías moleculares involucradas en la carcinogénesis (Cicero et al. 2017). Algunas de las vías que pueden regular estos compuestos en cáncer son apoptosis, metástasis y angiogénesis, entre otras (Jin et al. 2018; Maruca et al. 2019; Méresse et al. 2020).

Evaluamos la expresión de genes principalmente relacionados con vías de muerte, donde para el caso del extracto de acetato de etilo de *A. versicolor* podemos observar que se presenta una inhibición en la expresión de PARP1 y Cas3. Además, el extracto hexánico de *M. anisopliae* redujo también la expresión de estos dos genes respecto al control (**Tabla 4**). La inhibición de PARP1 ha sido estudiada ampliamente como candidato para el tratamiento de varios tipos de cáncer ya que se ha descubierto que sus inhibidores pueden sensibilizar en el tratamiento de la quimioterapia, así como evitar la proliferación de células defectuosas (Zaremba y Curtin 2012; Zhu et al. 2016), por lo que la inhibición de este gen puede ser un proceso clave para la acción citotóxica del extracto de acetato de etilo de *A. versicolor* hacia el linfoma murino.

Por otra parte, se ha visto que además de su papel en la apoptosis, caspasa 3 posiblemente este implicada en la angiogénesis (Feng et al. 2017) y proliferación tumoral (Huang et al. 2011) en algunos tipos de cáncer (Eskandari y Eaves 2022). En un estudio se demostró que al inhibir caspasa 3 en cáncer de colon se aumentó la sensibilidad a la quimioterapia, además de disminuir la metástasis e invasión del cáncer de colon (Zhou et al. 2018). Sin embargo, aún no se conoce si pudiera tener el mismo efecto en linfoma.

El aumento de caspasa 3 suele ser un signo de que la célula está efectuando apoptosis, ya sea por vía intrínseca o extrínseca (Eskandari y Eaves 2022; Silva et al. 2022) y recientemente se ha encontrado que en algunos casos puede existir activación de caspasa 3 mediada por GSDME provocando piroptosis (Fang et al. 2020; Hu et al. 2020; Bhat et al. 2023). El extracto de acetato de etilo de *M. anisopliae* indujo un aumento de casi el doble de la expresión de caspasa 3, p53 y PARP1 respecto al control, un aumento de la

expresión de Bax, además en este caso en particular se presentó expresión de Bcl-2, la cual corresponde a una proteína antiapoptótica, sin embargo, según la bibliografía esta puede estar expresada, pero mantiene una estrecha relación con Bax (una proteína proapoptótica) las cuales en conjunto regulan la apoptosis de la vía intrínseca actuando a nivel de la mitocondria, permitiendo la permeabilización de su membrana (Luo et al. 2020; Carpenter y Brady 2023).

Se ha reportado que los niveles de PARP1 y caspasa 3 aumentan cuando se está llevando a cabo un proceso apoptótico, principalmente por la vía intrínseca al existir un daño en el DNA (Hadisaputri et al. 2021). Además, la expresión de caspasa 3 también puede ser desencadenado por la activación de p53 y finalizar en apoptosis. La activación de estas tres proteínas está relacionada entre si (Akpolat et al. 2020; Wu et al. 2021) por lo que se sugiere que el extracto crudo de acetato de etilo de *M. anisopliae* pudiera tener el efecto antitumoral induciendo apoptosis por vía intrínseca.

Algo destacable es que todos los extractos aumentaron la expresión de p53 comparado con las células sin tratamiento, esto es beneficioso ya que cuando este gen supresor de tumores se ve regulado negativamente hay un mayor desarrollo y crecimiento del tumor, así como una reducción de la apoptosis (Wong 2011).

En el caso de NF- $\kappa$ B no existió mucha variación en la expresión en comparación con la célula control, este gen es generalmente asociado a metástasis, resistencia a tratamiento y desarrollo del cáncer, además un estudio en células de linfoma murino demostró al inhibir este gen y administrar un agente apoptótico aumentaba la apoptosis celular *in vitro* y alargaba la sobrevivencia *in vivo* (Lerma-Díaz et al. 2006; Xia et al. 2014).

Dado lo observado se puede decir que los extractos de hexano y acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* modulan la expresión de genes relacionados con vías de muerte en linfoma murino L5178Y-R.

En el experimento *in vivo* se observó que el tratamiento con extracto de acetato de etilo de *A. versicolor* no permitió el crecimiento del tamaño tumoral durante los primeros 10 d y aumentó la sobrevivencia de este grupo de ratones a comparación del grupo control sin tratamiento (**Figura 5** y **Figura 6**) llegando hasta los 17 d, lo cual representa un mayor

tiempo de supervivencia según lo reportado en estudios *in vivo* con la línea celular L5178Y utilizando vincristina, con una supervivencia máxima de 15 d (Almaguer et al. 2023). Este efecto puede deberse a lo encontrado en la inhibición de PARP1 y caspasa 3, sin embargo, es importante ampliar el estudio para entender el mecanismo en que el extracto actúa además de realizar un estudio *in vivo* de la expresión para confirmar si se tiene el mismo efecto molecular tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, en el caso del tratamiento con extractos de acetato de etilo de *M. anisopliae* y el grupo de vehículo no se observaron aumentos en la supervivencia a comparación del control sin tratamiento (**Figura 5**), por lo que se sugiere un nuevo estudio con un régimen de tratamiento mayor.

La eficacia *in vivo* de extractos de distintos hongos hacia diversos tipos de cáncer ha mostrado resultados prometedores como alternativa de tratamiento, ya que representan fuentes importantes de compuestos con poder bioactivo contra el cáncer (Motta et al. 2021; Pathak et al. 2022). Estudios *in vivo* en modelos de linfoma L5178Y han demostrado que extractos crudos como *Lophocereus schottii* pueden reducir el volumen tumoral y aumentar la supervivencia en ratones BALB/c (Orozco-Barocio et al. 2013).

## 9. CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos de los hongos *Aspergillus versicolor* y *Metarhizium anisopliae*, endófitos de *Lophocereus marginatus*, poseen actividad antitumoral contra el linfoma murino L5178Y-R, modulando la expresión génica de PARP1, caspasa 3, NF-κB y p53.

Los extractos de acetato de etilo poseen actividad hemoprotectora hacia eritrocitos humanos.

El extracto de acetato de etilo de *A. versicolor* prolonga la supervivencia en ratones BALB/c con tumor L5178Y-R, disminuyendo el tamaño tumoral durante el tratamiento.

## 10. PERSPECTIVAS

- a) Purificar y caracterizar los compuestos presentes en los extractos de acetato de etilo de *A. versicolor*.
- b) Evaluar los compuestos presentes en el extracto.
- c) Ampliar la lista de genes para estudiar otras vías de regulación.
- d) Obtener uno o varios compuestos que puedan ser usados como posibles tratamientos contra linfoma u otros tipos de cáncer.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Agostini-Costa TS, Vieira RF, Bizzo HR, Silveira Damaris, Gimenes MA. 2012. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu S, editor. Chromatography and Its Applications. Croacia: IntechOpen. p. 131–164.
- Akpolat M, Oz ZS, Gulle K, Hamamcioglu AC, Bakkal BH, Kececi M. 2020. X irradiation induced colonic mucosal injury and the detection of apoptosis through PARP-1/p53 regulatory pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 127:110134.
- Almaguer G, Almaguer-Vargas G, Molina EM, Becerril MA, Montejano B, Madrigal EO, Hernández A, Figueroa AH, Montejano E, Montejano JR. 2023. Antitumor Effect of Epigallocatechin Gallate and Vincristine in Mice with L5178Y Lymphomae. *Plants*. 12(21):3757.
- Alzeer J, Vummidi BR, Arafeh R, Rimawi W, Saleem H, Luedtke NW. 2014. The influence of extraction solvents on the anticancer activities of Palestinian medicinal plants. *J Med Plant Res*. 8(8):408–415.
- 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.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 99(3):325–348.
- Apak R. 2019. Current Issues in Antioxidant Measurement. *J Agric Food Chem*. 67(33):9187–9202.
- Arias S, Aquino D. 2019. FAMILIA CACTACEAE I. Instituto de Ecología, A.C.: México.
- Arias S, Gama S, Guzmán L, Vázquez B. 2012. Cactaceae. In: Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Medina R (eds). UNAM: México. pp. 1–235.



- Azab EF, Mostafa HS. 2021. Phytochemical analysis and antioxidant defense of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) against pancreatic cancer and AAPH-induced RBCs hemolysis. *Food Science and Technology*. 42:e06021.
- Azimi M, Mehrzad J, Ahmadi A, Ahmadi E, Ghorbani A. 2021. Apoptosis Induced by *Ziziphora tenuior* Essential Oil in Human Colorectal Cancer Cells. *Biomed Res Int*. 2021:1–9.
- Bhat AA, Thapa R, Afzal O, Agrawal N, Almalki WH, Kazmi I, Alzarea SI, Altamimi ASA, Prasher P, Singh SK, et al. 2023. The pyroptotic role of Caspase-3/GSDME signalling pathway among various cancer: A Review. *Int J Biol Macromol*. 242:124832.
- Bowzyk Al-Naeeb A, Ajithkumar T, Behan S, Hodson DJ. 2018. Non-Hodgkin lymphoma. *BMJ*. 362:k3204.
- BØYUM A. 1976. Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages. *Scand J Immunol*. 5(s5):9–15.
- Canga I, Vita P, Oliveira AI, Castro MÁ, Pinho C. 2022. In Vitro Cytotoxic Activity of African Plants: A Review. *Molecules*. 27(15):4989.
- Carpenter R, Brady MF. 2023. BAX Gene. *StatPearls*. [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555927/>.
- Casas A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. *Cactáceas y succulentas mexicanas*. 47(1):11–18.
- Chiocchio I, Mandrone M, Tomasi P, Marincich L, Poli F. 2021. Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. *Molecules*. 26(2):495.
- Chu Y, Zhou X, Wang X. 2021. Antibody-drug conjugates for the treatment of lymphoma: clinical advances and latest progress. *J Hematol Oncol*. 14:88.
- Cicero AFG, Fogacci F, Colletti A. 2017. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *Br J Pharmacol*. 174(11):1378–1394.

Devi R, Kaur T, Guleria G, Rana KL, Kour D, Yadav Neelam, Yadav AN, Saxena AK. 2020. Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. In: Rastegari A, Yadav A, Yadav N, editors. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. pp. 147–161.

Dowlath M, Karuppannan SK, Darul R, Mohamed K, Subramanian S, Arunachalam KD. 2020. Effect of Solvents on Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Cardiospermum halicacabum* (L.) Extracts. *Pharmacognosy Journal*. 12(6):1241–1251.

Elawady ME, Hamed AA, Alsallami WM, Gabr EZ, Abdel-Monem MO, Hassan MG. 2023. Bioactive Metabolite from Endophytic *Aspergillus versicolor* SB5 with Anti-Acetylcholinesterase, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities: In Vitro and In Silico Studies. *Microorganisms*. 11(4):1062.

Eskandari E, Eaves CJ. 2022. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*. 221(6):e202201159.

Fang Y, Tian S, Pan Y, Li W, Wang Q, Tang Y, Yu T, Wu X, Shi Y, Ma P, et al. 2020. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 121:109595.

Feng X, Yu Y, He S, Cheng J, Gong Y, Zhang Z, Yang X, Xu B, Liu X, Li CY, et al. 2017. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer Lett*. 385:12–20.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 149(4):778–789.

Gallardo E, Seca AML. 2022. Secondary Metabolites and Their Applications. *Applied Sciences*. 12(5):2317.

GLOBOCAN. 2020. El cáncer hoy. [Online]. Disponible en: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1).

- Gómez-Flores R, Quintanilla-Licea R, Hernández-Martínez CH, Samaniego-Escamilla M, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2019. Survival of Lymphoma-Bearing Mice by *Pachycereus marginatus* Cactus Extracts and Elucidation of Bioactive Compounds. *Nat Prod Commun.* 14(5):1–16.
- Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel BD, Watts JL, Håkansson J, Hansen PR, Svenson J. 2020. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep.* 10(1):1–13.
- Hadisaputri YE, Andika R, Sopyan I, Zuhrotun A, Maharani R, Rachmat R, Abdulah R. 2021. Caspase cascade activation during apoptotic cell death of human lung carcinoma cells A549 induced by marine sponge *Callyspongia aerizusa*. *Drug Des Devel Ther.* 15:1357–1368.
- Hanahan D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12(1):31–46.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 144(5):646–674.
- Hernández-Martínez HC, Gómez-Flores R, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Samaniego Escamilla MÁ, Monreal-Cuevas E, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2016. Antitumor activity of *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton Rose extracts against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells. *Journal of Medicinal Plants Research.* 10(36):635–639.
- Hu L, Chen M, Chen X, Zhao C, Fang Z, Wang H, Dai H. 2020. Chemotherapy-induced pyroptosis is mediated by BAK/BAX-caspase-3-GSDME pathway and inhibited by 2-bromopalmitate. *Cell Death Dis.* 11(4):281.
- Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O’Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, et al. 2011. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med.* 17(7):860–866.
- Humne VT, Lokhande MN. 2023. Compound synergy in natural crude extract: a novel concept in drug formulation. In: Meena S, Nandre V, Kodam K, Meena R, editors. *New Horizons in Natural Compound Research.* Academic Press. p. 167–178.

Ibrahim M, Oyebanji E, Fowora M, Aiyeolemi A, Orabuchi C, Akinnawo B, Adekunle AA. 2021. Extracts of endophytic fungi from leaves of selected Nigerian ethnomedicinal plants exhibited antioxidant activity. *BMC Complement Med Ther.* 21(1).

INEGI. 2023. Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer. Comunicado de prensa Num 77/23. [Online]. Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP\\_Cancer.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf).

Jain C, Khatana S, Vijayvergia R. 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. *Int J Pharm Sci Res.* 10(2):494–504.

Jin Y, Meng X, Qiu Z, Su Y, Yu P, Qu P. 2018. Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of *Cordyceps militaris*. *Saudi J Biol Sci.* 25(5):991–995.

Khan IH, Javaid A. 2022. Antagonistic activity of *Aspergillus versicolor* against *Macrophomina phaseolina*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 53(3):1613–1621.

Kumari K, Kumar S, Prashant, Jha AK, Kumar N. 2022. Biotechnological intervention in genetic improvement and regulation of secondary metabolites production in *Ocimum sanctum* L. *Ind Crops Prod.* 187:115329.

Kusvuran S. 2021. Microalgae (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) alleviates drought stress of broccoli plants by improving nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidative defense system. *Hortic Plant J.* 7(3):221–231.

De la Garza JG, Juárez P. 2013. El cáncer. *Steroids.* 118:1–8.

Lerma-Díaz JM, Hernández-Flores G, Domínguez-Rodríguez JR, Ortíz-Lazareno PC, Gómez-Contreras P, Cervantes-Munguía R, Scott-Algara D, Aguilar-Lemarroy A, Jave-Suárez LF, Bravo-Cuellar A. 2006. In vivo and in vitro sensitization of leukemic cells to adriamycin-induced apoptosis by pentoxifylline: Involvement of caspase cascades and IκBα phosphorylation. *Immunol Lett.* 103(2):149–158.

Tian-Xiao L, Dan-Dan M, Ying W, Jin-Lu A, Jia-Feng B, Xue-Wei J, Chun-Ping X. 2020. Antioxidant coumarin and pyrone derivatives from the insect-associated fungus *Aspergillus Versicolor*. *Nat Prod Res.* 34(10):1360–1365.

- Lluch A, Álvarez I, Muñoz M, Seguí MÁ, Tusquets I, García-Estévez L. 2014. Treatment innovations for metastatic breast cancer: Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology targeted to tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 89(1):62–72.
- Luo X, O’Neill KL, Huang K. 2020. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? *F1000Res*. 9:935.
- Maruca A, Catalano R, Bagetta D, Mesiti F, Ambrosio FA, Romeo I, Moraca F, Rocca R, Ortuso F, Artese A, et al. 2019. The Mediterranean Diet as source of bioactive compounds with multi-targeting anti-cancer profile. *Eur J Med Chem*. 181:111579.
- Masisi K, Beta T, Moghadasian MH. 2016. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chem*. 196:90–97.
- Matias M, Silvestre S, Falcão A, Alves G. 2018. Considerations and Pitfalls in Selecting the Drug Vehicles for Evaluation of New Drug Candidates: Focus on in vivo Pharmacotoxicological Assays Based on the Rotarod Performance Test. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 21(1):110–118.
- Méresse S, Fodil M, Fleury F, Chénais B. 2020. Fucoxanthin, a Marine-Derived Carotenoid from Brown Seaweeds and Microalgae: A Promising Bioactive Compound for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 21(23):9273.
- Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 69(5):363–385.
- Motta F, Gershwin ME, Selmi C. 2021. Mushrooms and immunity. *J Autoimmun*. 117:102576.
- Nuruki Y, Matsumoto H, Tsukada M, Tsukahara H, Takajo T, Tsuchida K, Anzai K. 2021. Method to Improve Azo-Compound (AAPH)-Induced Hemolysis of Erythrocytes for Assessing Antioxidant Activity of Lipophilic Compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 69(1):67–71.

OCDE. 2002. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Publishing: Paris.

OECD/OCDE. 2002. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. OECD Publishing: Paris.

Orozco-Barocio A, Paniagua-Domínguez BL, Benítez-Saldaña PA, Flores-Torales E, Velázquez-Magaña S, Nava HJA. 2013. Cytotoxic Effect of the Ethanolic Extract of *Lophocereus Schottii*: A Mexican Medicinal Plant. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines. 10(3):397–404.

Ousaaïd D, Ghouizi AE, Laaroussi H, Bakour M, Mechchate H, Es-Safi I, Kamaly OA, Saleh A, Conte R, Lyoussi B, et al. 2022. Anti-Anemic Effect of Antioxidant-Rich Apple Vinegar against Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia in Rats. Life. 12(2):239.

Pathak MP, Pathak K, Saikia R, Gogoi U, Ahmad MZ, Patowary P, Das A. 2022. Immunomodulatory effect of mushrooms and their bioactive compounds in cancer: A comprehensive review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 149:112901.

Pérez-Zúñiga JM, Aguilar-Andrade C, Álvarez-Vera JL, Augusto-Pacheco M, Báez-Islas E, Bates-Martín RA, Cervantes-Sánchez I, Espitia-Ríos ME, Estrada-Domínguez P, Jiménez-Alvarado R, et al. 2019. Linfoma de Hodgkin. Rev Hematol Mex. 20(2):124–130.

Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. 2019. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. Ecancermedicalscience. 13:961.

Quang TH, Phong NV, Anh DV, Hanh TTH, Cuong NX, Ngan NTT, Trung NQ, Oh H, Nam NH, Minh CV. 2021. Bioactive secondary metabolites from a soybean-derived fungus *Aspergillus versicolor* IMBC-NMTP02. Phytochem Lett. 45:93–99.

Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, Bautista-Martínez N, Espinoza-Mendoza M, Camacho-Tapia M, Andrade-Hoyos P, Martínez-Rosas R, Rodríguez-Mendoza J. 2021. Behavior and characterization of *Moneilema variolare* (Coleoptera: Cerambycidae), a new pest to *Pachycereus marginatus*. Phytoparasitica. 49(5):829–839.

Quintanilla-Licea R, Gómez-Flores R, Samaniego-Escamilla MÁ, Hernández-Martínez HC, Tamez-Guerra P, Morado-Castillo R. 2016. Cytotoxic Effect of Methanol Extracts and Partitions of Two Mexican Desert Plants against the Murine Lymphoma L5178Y-R. *Am J Plant Sci.* 7(11):1521–1530.

Quintero DI. 2014. Linfoma No Hodgkin Difuso de Células Grandes B. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica.* LXXI(610):333–338.

Quintero Y, Teruel A, Hernández C, Concepción Y, Romero A, Macia I. 2019. Caracterización del linfoma de Hodgkin en los pacientes adultos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* 35(3):1027.

Rahman MM, Reza A, Khan MA, Sujon KM, Sharmin R, Rashid M, Sadik M, Reza M, 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.

Rai N, Gupta P, Keshri PK, Verma A, Mishra P, Kumar D, Kumar A, Singh SK, Gautam V. 2022. Fungal Endophytes: an Accessible Source of Bioactive Compounds with Potential Anticancer Activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 194(7):3296–3319.

Ramírez-Villalobos JM, Gómez-Flores R, Velázquez-Flores PV, Morán-Santibáñez KS, Tamez-Guerra P, Pérez-González O, De la Garza-Ramos MA, Rodríguez-Padilla C, Romo-Sáenz CI. 2023. Effect of Culture Conditions of *Lophocereus marginatus* Endophytic Fungi on Yield and Anticancer and Antioxidant Activities. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2023, Vol 20, Page 3948. 20(5):3948.

Ramírez-Villalobos JM, Romo-Sáenz CI, Morán-Santibáñez KS, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Orozco-Flores AA, Romero-Arguelles R, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Gómez-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.* 18:9917.

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*. 13(4):958.

Romo de Vivar A, Pérez-Castorena AL, Arciniegas A, Villaseñor JL. 2007. Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae). *J Mex Chem Soc*. 51(3):160–172.

Sæbø IP, Bjørås M, Franzyk H, Helgesen E, Booth JA. 2023. Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*. 24(3):2914.

Saetung A, Itharat A, Dechsukum C, Wattanapiromsakul C, Keawpradub N, Ratanasuwan P. 2005. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment Graduate student in. *Songklanakarini J Sci Technol*. 27(2):469–478.

Sajna KV, Kamat S, Jayabaskaran C. 2020. Antiproliferative Role of Secondary Metabolites From *Aspergillus unguis* AG 1.1 (G) Isolated From Marine Macroalgae *Enteromorpha* sp. by Inducing Intracellular ROS Production and Mitochondrial Membrane Potential Loss Leading to Apoptosis. *Front Mar Sci*. 7:543523.

Sánchez C. 2013. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24(4):553–562.

Sánchez-Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC, Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP*. 16(2):132–146.

Santos EW, Oliveira DC, Hastreiter A, Silva GB, Beltran JS, Tsujita M, Crisma AR, Neves SMP, Fock RA, Borelli P. 2016. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 53(2):138–145.

Sapkota S, Shaikh H. 2023. Non-Hodgkin Lymphoma. StatPearls Publishing [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559328/>



- Sayyad M, Tiang N, Kumari Y, Goh BH, Jaiswal Y, Rosli R, Williams L, Shaikh MF. 2017. Acute toxicity profiling of the ethyl acetate fraction of *Swietenia macrophylla* seeds and in-vitro neuroprotection studies. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 25(2):196–205.
- Seca AML, Pinto DCGA. 2018. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. *Int J Mol Sci*. 19(1):263.
- Selim MSM, Abdelhamid SA, Mohamed SS. 2021. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(1):72.
- Shin TY, Bae SM, Choi JB, Woo SD. 2014. Simple and rapid screening of entomopathogenic fungi having radical-scavenging and anticancer activities. *J Asia Pac Entomol*. 17(3):543–547.
- Shreadah MA, El-Moneam NMA, El-Assar SA, Nabil-Adam A. 2019. Metabolomics and Pharmacological Screening of *Aspergillus versicolor* Isolated from *Hirtios erectus* Red Sea Sponge; Egypt. *Curr Bioact Compd*. 16(7):1083–1102.
- Silva FFV, Padín-Iruegas ME, Caponio VCA, Lorenzo-Pouso AI, Saavedra-Nieves P, Chamorro-Petronacci CM, Suárez-Peñaranda J, Pérez-Sayáns M. 2022. Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorigenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 23(19):11937.
- Silva-Santana G, Bax JC, Fernandes DCS, Bacellar DTL, Hooper C, Dias AASO, Silva CB, de Souza AM, Ramos S, Santos RA, et al. 2020. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus*. *Animal Model Exp Med*. 3(4):304–315.
- Skrobek A, Butt TM. 2005. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett*. 251(1):23–28.
- Solárová Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D, Solár P. 2020. Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. *Biomolecules*. 10(1):87.

- Thirumurugan D, Cholarajan A, Raja SSS, Vijayakumar Ramasamy. 2018. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In: Secondary Metabolites - Sources and Applications, Vijayakumar R, Raja S (eds). InTechOpen. pp. 3–21.
- Torpy JM, Lynm C, Glass RM. 2010. Cancer: The Basics. JAMA. 303(11):1108–1108.
- Vieira NSM, Oliveira ALS, Araújo JMM, Gaspar MM, Pereiro AB. 2021. Ecotoxicity and Hemolytic Activity of Fluorinated Ionic Liquids. Sustainable Chemistry. 2(1):115–126.
- Wong RSY. 2011. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 30(1):1–14.
- Wu W, Wei T, Li Z, Zhu J. 2021. p53-dependent apoptosis is essential for the antitumor effect of paclitaxel response to DNA damage in papillary thyroid carcinoma. Int J Med Sci. 18(14):3197.
- Xia Y, Shen S, Verma IM. 2014. NF- $\kappa$ B, an Active Player in Human Cancers. Cancer Immunol Res. 2(9):823–830.
- Yeshi K, Crayn D, Ritmejerýtè E, Wangchuk P. 2022. Plant Secondary Metabolites Produced in Response to Abiotic Stresses Has Potential Application in Pharmaceutical Product Development. Molecules. 27(1):313.
- Zaremba T, Curtin NJ. 2012. PARP Inhibitor Development for Systemic Cancer Targeting. Anticancer Agents Med Chem. 7(5):515–523.
- Zaynab M, Fatima M, Abbas S, Sharif Y, Umair M, Zafar MH, Bahadar K. 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microb Pathog. 124:198–202.
- Zhang X, Bingqian L, Zhang X, Wang C, Zhang Z, Sun P. 2022. Exogenous application of ethephon regulates flower abscission, shoot growth, and secondary metabolites in *Camellia sinensis*. Sci Hortic. 304:111333.
- Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. 2018. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. Int J Cancer. 143(4):921–930.
- Zhu X, Ma X, Hu Y. 2016. PARP1: A Promising Target for the Development of PARP1-based Candidates for Anticancer Intervention. Curr Med Chem. 23(17):1756–1774.