

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS Y MOLÉCULAS
BIOACTIVAS DE CULTIVOS LÍQUIDOS DE HONGOS ENDÓFITOS
AISLADOS DE *Lophocereus marginatus* (DC.) S. ARIAS & TERRAZAS
CONTRA EL LINFOMA MURINO L5178Y-R**

POR

JESICA MARÍA RAMÍREZ VILLALOBOS

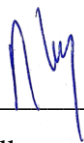
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

2024

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS Y MOLÉCULAS BIOACTIVAS DE
CULTIVOS LÍQUIDOS DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE *Lophocereus*
marginatus (DC.) S. ARIAS & TERRAZAS CONTRA EL LINFOMA MURINO

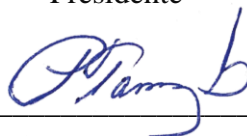
L5178Y-R

Comité de Tesis



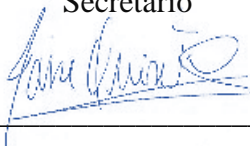
Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Presidente



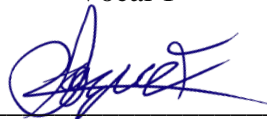
Dra. Patricia Tamez Guerra

Secretario



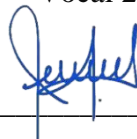
Dr. Ramiro Quintanilla Licea

Vocal 1



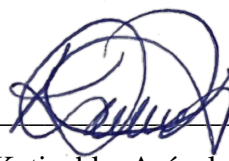
Dr. Alonso Alberto Orozco Flores

Vocal 2



Dra. María Julissa Ek Ramos

Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Nino

Subdirector de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS Y MOLÉCULAS BIOACTIVAS DE
CULTIVOS LÍQUIDOS DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE *Lophocereus*
marginatus (DC.) S. ARIAS & TERRAZAS CONTRA EL LINFOMA MURINO
L5178Y-R

Dirección de Tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Presidente



Dr. César Iván Romo Sáenz

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 Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONHACYT, México), a través de la beca al CVU 445572 que corresponde al Dr. César Iván Romo Sáenz.
- El Programa de Apoyo a la investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Folio PAICYT-UANL CN1235-20 del Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (CVU No. 725244), con la cual me fue posible desarrollar mis estudios de Doctorado.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores por darme la oportunidad y su confianza para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco de manera especial al Dr. César Iván Romo Sáenz, quien siempre me brindó su ayuda y asesoría a lo largo de todo el proyecto. Sin su apoyo, la culminación de este trabajo no habría sido posible. Además de ser mi asesor, se convirtió en un buen amigo. Gracias por todas las enseñanzas y por animarme a seguir adelante. Siempre estaré agradecida.

A la Dra. Patria Tamez, Dr. Ramiro Quintanilla, Dra. Julissa Ek y al Dr. Alonso Orozco por su valiosa asesoría a lo largo de todo el proyecto y por la revisión del documento.

Agradezco a la Dra. Karla Morán por su apoyo, enseñanzas y por su amistad.

Agradezco a la Dra. Orquídea por haber creído en mí y en mi potencial desde que la conocí. Además, por ser un ejemplo de dedicación y esfuerzo incansable.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología y Acarreadores de Drogas, Ángel, Joel, Maribel, Ana, Nancy, Yadira, Diego, Ricardo y Daniel, por todo el apoyo recibido y su amistad. En especial a Diana y Viridiana por su contribución en la parte experimental, fueron clave para la conclusión de este trabajo.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros y al personal del Laboratorio de Formulación de Biológicos Rosa, Queta, Nora, compañeros del posgrado, estudiantes de servicio social y becarios que, de alguna manera, contribuyeron a este proyecto. Especialmente a Angello por su disposición constante para brindarme su ayuda.

A mis compañeros de doctorado, Karla, Gabriel y Jesús, por ser parte de este proceso. En especial, a Servando, porque las risas, el compañerismo y la amistad nunca faltaron.

A mis amigas Fabiola García y Jemima Rangel por estar ahí para escucharme y brindarme aliento en los momentos en que más lo necesitaba. Su apoyo ha sido esencial para alcanzar este logro.

DEDICATORIAS

A Roberto, mi compañero de vida, le agradezco su apoyo incondicional. Quien ha estado presente en las alegrías, tristezas y en esos momentos en los que no veía la salida. Gracias por darme ánimos y creer en mí, incluso cuando yo misma no lo hacía.

A Matilda, el angelito perruno que llegó a mi vida en uno de los momentos más difíciles por los que he atravesado. Gracias por ser mi terapeuta emocional, compañera fiel y por llenarme de alegría todos los días.

A las demás integrantes de mi pequeña familia, Lía y Mancha, que sin duda alguna hacen que los problemas se olviden cuando llego a casa y me hacen tan feliz.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.2 Tratamientos para el cáncer.....	4
2.3 Linfoma.....	5
2.3.1 Linfoma murino L5178Y-R.....	6
2.4 Hongos endófitos.....	7
2.4.1 Hongos endófitos con actividad anticancerígena.....	8
2.4.2 Optimización de la producción de compuestos por hongos endófitos.....	8
2.4.3 Selección de plantas para el aislamiento de hongos endófitos.....	9
2.5 <i>Lophocereus marginatus</i>	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	16
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1 Colecta e identificación del material vegetal.....	17
6.2 Aislamiento, caracterización e identificación de hongos endófitos.....	17
6.2.1 Aislamiento de hongos endófitos de <i>L. marginatus</i>	17
6.2.2 Cultivos monospóricos.....	18
6.2.3 Descripción macroscópica.....	18
6.2.4 Descripción microscópica.....	19
6.2.5 Identificación molecular de hongos endófitos.....	19
6.3 Condiciones de cultivo y extracción de metabolitos.....	20
6.3.1 Condiciones iniciales para la extracción de metabolitos de hongos endófitos.....	20
6.3.2 Optimización de las condiciones de cultivo y extracción de metabolitos.....	21

6.3.2.1	Evaluación del tiempo de fermentación.....	21
6.3.2.2	Fermentación en diferentes condiciones de cultivo	21
6.3.2.3	Extracción de metabolitos con diferentes solventes y técnicas de extracción	23
6.3.2.3.1	Evaluación de diferentes solventes	23
6.3.2.3.2	Evaluación con diferentes técnicas de extracción.....	23
6.4	Evaluación de la actividad biológica de los extractos.....	23
6.4.1	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	23
6.4.2	Inhibición de crecimiento de células tumorales y sanas	24
6.4.2.1	Cálculo de índice de selectividad.....	24
6.4.3	Actividad antioxidante	25
6.4.4	Actividad hemolítica	25
6.4.5	Actividad anti hemolítica	26
6.5	Caracterización de extractos	26
6.5.1	Prueba de solubilidad	26
6.5.2	Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	27
6.5.3	Cromatografía en capa fina (CCF).....	29
6.5.4	Identificación de compuestos por cromatografía líquida acoplado a masas (LC-MS ²) 29	
6.6	Análisis estadístico.....	30
7.	RESULTADOS	32
7.1	Evaluación de la actividad citotóxica de extractos crudos de hongos endófitos de <i>L. marginatus</i> en el modelo de linfoma murino L5178Y-R <i>in vitro</i>	32
7.1.1	Aislamiento de hongos endófitos.....	32
7.1.2	Caracterización morfológica de los aislamientos.....	33
7.1.3	Evaluación inicial de la actividad anticancerígena	35
7.1.4	Evaluación de la actividad antioxidante.....	38
7.1.5	Identificación molecular de los aislamientos con actividad anticancerígena.....	39
7.2	Producción a mayor escala de cepas seleccionadas y evaluación de su actividad biológica.....	40
7.2.1	Evaluación del tiempo de fermentación.....	40
7.2.2	Fermentación en diferentes condiciones de cultivo	42
7.2.2.1	Extractos metanólicos	42
7.2.2.2	Extractos de acetato de etilo.....	48
7.2.3	Escalamiento de la producción para la obtención de extractos	53

7.2.4	Evaluación de diferentes solventes	54
7.2.5	Evaluación de diferentes técnicas de extracción	55
7.2.6	Evaluación de lotes producidos a mayor escala	56
7.3	Caracterización de extractos con mayor actividad.....	57
7.3.1	Prueba de solubilidad	57
7.3.2	Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	58
7.3.3	Evaluación de la actividad biológica de las fracciones colectivas	62
7.3.4	Identificación de compuestos mediante LC-MS ²	63
8.	DISCUSIÓN	70
9.	CONCLUSIONES.....	77
10.	PERSPECTIVAS	78
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Colecta de material vegetal en el estado de Nuevo León.	16
2	Oligonucleótidos utilizados para la identificación molecular de aislamientos seleccionados.	18
3	Medios de cultivo y condiciones experimentales para evaluar el rendimiento y la producción de metabolitos secundarios.	21
4	Gradiente de elución utilizado en la columna.	27
5	Características macroscópicas y microscópicas de hongos endófitos filamentosos sembrados en agar de papa y dextrosa (PDA).	33
6	Rendimientos de los extractos metanólicos y de acetato de etilo.	34
7	Inhibición de crecimiento de extractos de hongos endófitos contra la línea tumoral L5178Y-R y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).	35
8	IC ₅₀ (µg/mL) e índice de selectividad (IS) de la línea L5178Y-R y PBMCs al evaluar extractos metanólicos y de acetato de etilo de aislamientos seleccionados.	36
9	Actividad antioxidante (DPPH) de extractos metanólicos y de acetato de etilo.	37
10	Identificación molecular de hongos endófitos con actividad antitumoral basada en la secuenciación de la región ITS1-ITS4 y β-tubulina.	38
11	Rendimiento, IC ₅₀ (µg/mL) e IS de la línea L5178Y-R y PBMC al evaluar extractos metanólicos y acetato de etilo a diferentes tiempos de fermentación.	40
12	IC ₅₀ (µg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y PBMCs; IS y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.	47

13	IC ₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y PBMCs; IS y actividad antioxidante de extractos de acetato de etilo de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.	51
14	IC ₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y porcentaje de rendimiento de extractos <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> producidos a mayor escala.	52
15	IC ₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y porcentaje de rendimiento de extracciones al implementar diferentes solventes en cultivos líquidos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> .	53
16	IC ₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y porcentaje de rendimiento de extractos hexánicos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> al utilizar diferentes técnicas de extracción.	54
17	Rendimiento y actividad biológica de extractos de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> .	55
18	Resultados de las pruebas de solubilidad de extractos de acetato de etilo.	56
19	R _f calculado de extractos de acetato de etilo de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> en luz visible, UV 254 nm, UV 365 nm y yodo.	57
20	R _f calculado de fracciones colectivas de extractos de acetato de etilo de <i>A. versicolor</i> y <i>M. anisopliae</i> en luz visible, 254 nm, 365 nm y yodo utilizando como eluente acetato de etilo al 100%.	59
21	Rendimiento y valor IC ₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento en células tumorales y sanas de fracciones colectivas.	61
22	IC ₅₀ (μg/mL) de actividad antioxidante (DPPH), hemolítica y anti hemolítica de fracciones colectivas.	61
23	Lista de metabolitos anotados, reportados con actividad biológica de la FC-2 de <i>A. versicolor</i> PME-H005.	64
24	Lista de metabolitos anotados, reportados con actividad biológica de la FC-5 de <i>M. anisopliae</i> PME-H007.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Número de nuevos casos y número de muertes por cáncer a nivel mundial.	3
2	Línea de linfoma murino L5178Y-R.	6
3	<i>Lohocereus marginatus</i> (DC.) S. Arias & Terrazas.	11
4	Suplemento alimenticio a base de <i>L. marginatus</i> .	12
5	Aislamiento de hongos endófitos filamentosos.	31
6	Aislamientos de hongos filamentosos en diferentes medios de cultivo.	31
7	Hongos endófitos filamentosos aislados de <i>L. marginatus</i> .	32
8	Porcentaje de rendimiento de extractos metanólicos de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.	42
9	Peso seco de extractos metanólicos de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.	43
10	Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H002 en diferentes condiciones de cultivo.	45
11	Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H005 en diferentes condiciones de cultivo.	45
12	Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H007 en diferentes condiciones de cultivo.	46
13	Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H008 en diferentes condiciones de cultivo.	46
14	Porcentaje de rendimiento de extractos de acetato de etilo de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.	48

15	Peso seco de extractos de acetato de etilo de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.	48
16	Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos de acetato de etilo de la cepa PME-H005 en diferentes condiciones de cultivo.	50
17	Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos de acetato de etilo de la cepa PME-H007 en diferentes condiciones de cultivo.	50
18	Solubilidad de extractos de acetato de etilo.	56
19	Cromatografía de capa fina (CCF) de extractos crudos de acetato de etilo.	58
20	CCF de fracciones colectivas.	60
21	Clases químicas asignadas a los metabolitos identificados en las muestras.	62
22	Cromatograma de iones totales (TIC).	63

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

- AcEt:** Acetato de etilo.
- AE:** Fermentación en agitación inoculado con esporas.
- AM:** Fermentación en agitación inoculado con micelio.
- ANOVA:** Análisis de varianza.
- APPH:** 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro.
- CCF:** Cromatografía en capa fina.
- CK:** Caldo Czapeck.
- CM:** Caldo de malta.
- CTAB:** Bromuro de cetiltrimetilamonio.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- DO:** Densidad óptica.
- DPPH:** 1,1-difenil-2-picrilhidracil.
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- EE:** Fermentación estática inoculado con esporas.
- EM:** Fermentación estática inoculado con micelio.
- FC:** Fracción colectiva.
- GLOBOCAN:** Global Cancer Observatory.
- HL:** Linfoma de Hodgkin.
- IC₅₀:** Concentración que es necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50%.
- IS:** Índice de selectividad.
- ITS:** Espaciadores internos de transcritos del ADN ribosomal.
- LC-MS2:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
- MeOH:** Metanol.
- MTT:** 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio.
- NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
- NHL:** Linfoma no Hodgkin.
- PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica.
- PBS:** Buffer de fosfato salino.
- PDA:** Agar de papa y dextrosa.

PDB: Caldo de papa y dextrosa.

rpm: Revoluciones por minuto.

UV: Luz ultravioleta.

RESUMEN

Lophocereus marginatus es una especie de cactus que ha sido reportada con actividad antitumoral en modelos *in vitro* e *in vivo* de linfoma murino L5178Y-R. Sin embargo, no existen reportes previos acerca de la actividad anticancerígena de los hongos endófitos que habitan en esta especie. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antitumoral de extractos y moléculas bioactivas producidas por hongos endófitos de *L. marginatus* en un modelo de linfoma murino L5178Y-R *in vitro*. Los hongos endófitos de *L. marginatus* que presentaron actividad anticancerígena se caracterizaron e identificaron mediante la secuenciación de la región ITS1-ITS4 y β -tubulina. El grado de inhibición de crecimiento de extractos de acetato de etilo y metanólicos contra células tumorales L5178Y-R y células mononucleares de sangre periférica humana se evaluó mediante mediante la técnica colorimétrica de reducción del bromuro de (3[4,5 dimetil tiazol-2-il]) 2,5 difenil tetrazolio. Se determinaron las condiciones de fermentación y extracción en cepas seleccionadas para evaluar si estos parámetros influyen en la actividad y rendimiento de los extractos. Se realizó cromatografía en columna de extractos seleccionados y se caracterizaron las fracciones colectivas con mayor actividad mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS²). De los diez hongos endófitos aislados las cepas *Penicillium citrinum* PME-H002, *Aspergillus versicolor* PME-H005, *Metarhizium anisopliae* PME-H007 y *Cladosporium* sp. PME-H008, fueron seleccionadas por presentar buena actividad contra el linfoma (IC₅₀ < 250 μ g/mL). Las condiciones de cultivo como el tiempo de fermentación, el medio de cultivo, tipo de inóculo y la agitación, así como los solventes utilizados y el método de extracción tuvieron efecto en el rendimiento y la actividad de los extractos. Los extractos de aceto de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* fueron seleccionados para su caracterización por presentar actividad anticancerígena selectiva contra el linfoma (IC₅₀ < 13 μ g/mL, IS > 10) y ausencia de hemólisis (IC₅₀ > 800 μ g/mL). El análisis por LC-MS² reveló la presencia de compuestos reportados con actividad antitumoral y antioxidante. El análisis de la fracción colectiva (FC)-2 de *A. versicolor* mostró ácido azelaico, daidzeína, genisteína, calicosina, afrormosina, chalcona de naringenina, panaxatriol y piceatannol y la FC-5 de *M. anisopliae* mostró bisaboleno-1,4-endoperóxido, bisgerayafolina A, curcumol, destruxina B y maculosina. La evaluación de extractos de hongos endófitos de *L. marginatus* reveló su potencial como productores de compuestos bioactivos con actividad antitumoral selectiva contra linfoma murino L5178Y-R.

ABSTRACT

Lophocereus marginatus is a species of cactus that has been reported to have antitumor activity *in vitro* and *in vivo* models of the L5178Y-R murine lymphoma. However, there are no previous reports about the anticancer activity of the endophytic fungi that inhabit this species. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antitumor activity of extracts and bioactive molecules produced by the endophytic fungi *L. marginatus* in an *in vitro* L5178Y-R murine lymphoma model. The endophytic fungi from *L. marginatus* that presented anticancer activity were characterized and identified by sequencing the ITS1-ITS4 and β -tubulin region. The degree of growth inhibition of ethyl acetate and methanolic extracts against L5178Y-R tumor cells and human peripheral blood mononuclear cells was evaluated by the colorimetric reduction technique of the (3[4,5 dimethyl thiazol-2-yl]) 2,5 diphenyl tetrazolium. Fermentation and extraction conditions were determined in selected strains to evaluate if these parameters influence the activity and performance of the extracts. Column chromatography was performed on selected extracts and the collective fractions with the highest activity were characterized by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS²). Of the ten endophytic fungi isolated, the strains *Penicillium citrinum* PME-H002, *Aspergillus versicolor* PME-H005, *Metharrizium anisopliae* PME-H007 and *Cladosporium* sp. PME-H008, were selected for presenting good activity against lymphoma cells (IC₅₀ < 250 μ g/mL). Culture conditions, such as fermentation time, culture medium, type of inoculum and agitation, as well as the solvents used, and the extraction method have an effect on the yield and activity of the extracts. The ethyl acetyl extracts of *A. versicolor* and *M. anisopliae* were selected for characterization due to their selective anticancer activity against lymphoma cells (IC₅₀ < 13 μ g/mL; IS > 10) and absence of hemolysis (IC₅₀ > 800 μ g/mL). Analysis by LC-MS² revealed the presence of compounds reported with anticancer and antioxidant activity. Analysis of FC-2 from *A. versicolor* showed azelaic acid, daidzein, genistein, calycosin, afrormosin, naringenin chalcone, panaxatriol and piceatannol and FC-5 from *M. anisopliae* showed bisabolene-1,4-endoperoxide, bisgerayafolin A, curcumol, destruxin B, and maculosin. The evaluation of endophytic fungal extracts of *L. marginatus* revealed their potential as producers of bioactive compounds with selective antitumor activity against murine lymphoma L5178Y-R.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades que pueden afectar varios órganos del cuerpo, el cual se caracteriza por un crecimiento descontrolado y anormal de las células, así como la invasión potencial a tejidos normales (Kharwar et al. 2011). Se considera la segunda causa de muerte a nivel mundial. En el 2020 generó 9.9 millones de defunciones (IARC, 2023). Actualmente muchos de los tratamientos convencionales como las cirugías, quimioterapias y radioterapias presentan limitaciones, debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos, a la eliminación parcial de estas y a la resistencia de algunas células cancerosas a dichos productos (Ek-Ramos et al. 2019), además de los efectos secundarios que generan, ente ellos la mucositis, xerostomía, infecciones, hemorragias y úlceras (Alvarado et al. 2019). Por lo que la búsqueda de nuevas estrategias con efectos colaterales mínimos para el paciente se vuelve una necesidad (Rajamanikyam et al. 2017).

Los hongos endófitos son de gran importancia en la biotecnología, por la producción de compuestos farmacéuticos y metabolitos secundarios con actividad biológica, destacándose como una fuente potencial en la producción de nuevos compuestos con actividad anticancerígena o su potencial de inducir y/o producir ciertos metabolitos bioactivos homólogos a los de plantas superiores con los que interactúan a nivel metabólico (Chandra 2012). Desde el descubrimiento del hongo *Taxomyces andreanae* (Stierle et al. 1993) productor del Taxol a partir del Tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae: Pinales), se han aislado más de 100 compuestos con actividad anticancerígena a partir de hongos endófitos. Por otra parte, su rápido crecimiento, condiciones de cultivo, alta densidad celular, fácil manipulación genética y la posibilidad de escalar la producción de compuestos a nivel industrial los hace buenos candidatos para la obtención de nuevos fármacos (Barrales y de la Rosa 2014; Kharwar et al. 2011).

Se ha propuesto que el aislamiento de los hongos endófitos se realice de forma racional siguiendo diversas estrategias dependiendo del beneficio que se desee obtener, entre ellas la selección de plantas con antecedentes etnobotánicos (Ludwig 2015), así como aquellas con estrategias especiales para su supervivencia o que crezcan en ambientes extremos (Yu et al. 2010), lo que podría conducir al descubrimiento de endófitos productores de novedosos compuestos bioactivos. Tal es el caso de las plantas de zonas áridas, como las

cactáceas, las cuales establecen relaciones simbióticas con diferentes microorganismos, de los cuales se han aislado enzimas y compuestos biocidas. Sin embargo, el potencial biotecnológico de hongos aislados de estas especies vegetales es aún muy limitado (Pereira et al. 2017).

Por lo anterior, los hongos endófitos aislados de *Lophocereus marginatus*, una cactácea nativa de México que crece en ambientes áridos en estados como Nuevo León, Aguascalientes y Tamaulipas, podrían ser una fuente alternativa importante de compuestos bioactivos con actividad anticancerígena, ya que estudios previos demuestran que los extractos de este cactus presentan actividad citotóxica *in vitro* contra células de linfoma murino L5178Y-R y melanoma B16F10; así como actividad antitumoral en modelos *in vivo* de linfoma murino (Samaniego 2016; Gómez-Flores et al. 2019; Quintanilla-Licea et al. 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad de distribución global que puede afectar varios órganos del cuerpo, el cual se caracteriza por un crecimiento descontrolado de células anormales, así como la alteración dinámica del genoma y la presencia de dimorfismo celular. La progresión del cáncer deteriora el proceso biológico normal de las células sanas mediante la invasión de tejidos cercanos, angiogénesis y por su capacidad de llegar a generar metástasis e invadir tejidos distantes (Mansoori et al. 2017; Kharwar et al. 2011).

Esta enfermedad se ha referido como la “Patología del Siglo” ya que es una de las principales causas de muerte en todo el mundo tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. A pesar de los avances en el área médica se espera que los casos y muertes por cáncer aumenten rápidamente a medida que las poblaciones adopten estilos de vida que predispongan el desarrollo del cáncer, tal como el consumo de tabaco y/o alcohol, inactividad física, exceso de peso corporal y malos hábitos alimenticios, los cuales se han incrementado en los últimos años en la población humana (Falzone et al. 2018; Torre et al. 2016).

De acuerdo con la base de datos del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) en 2020 se reportaron un aproximado de 19 millones de nuevos casos de cáncer y 9.9 millones de muertes a nivel mundial, siendo el cáncer de mama el que presentó mayor número de nuevos casos y el de pulmón el mayor número de muertes (Figura 1) (IARC, 2023).

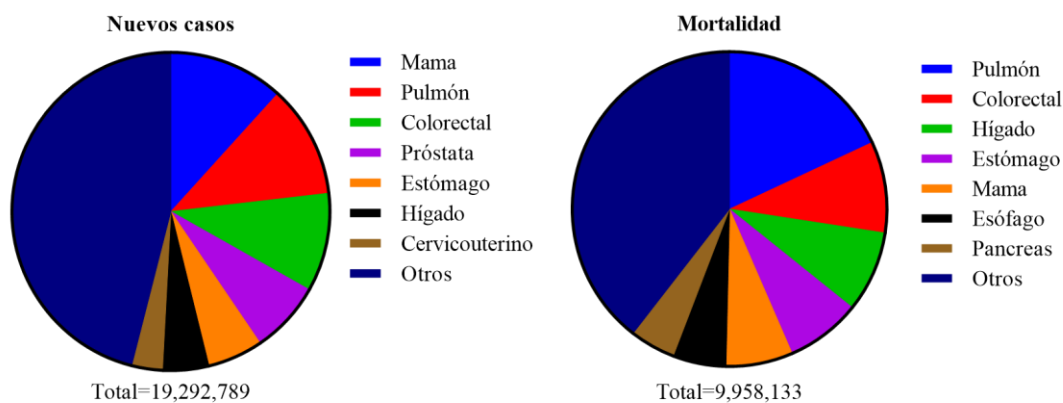


Figura 1. Número de nuevos casos y número de muertes por cáncer a nivel mundial (modificado de IARC 2023).

2.2 Tratamientos para el cáncer

Durante las últimas dos décadas, el paradigma para el tratamiento del cáncer ha evolucionado de agentes citotóxicos relativamente inespecíficos a terapias cada vez más selectivas. Los tratamientos que comprenden la mayoría de los regímenes terapéuticos utilizados clínicamente incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapias biológicas (inmunoterapia y terapia hormonal) y terapia dirigida (denominada “medicina personalizada”), siendo la quimioterapia la columna vertebral del tratamiento actual (Cardoso 2018; Vanneman y Dranoff 2012).

No obstante, la quimioterapia está asociada con diversos efectos secundarios. Los efectos inmediatos pueden ser observados en piel, cabello, médula ósea, tracto gastrointestinal y riñones, sin embargo, todos los órganos pueden verse afectados, incluyendo órganos esenciales como; corazón, pulmones y cerebro. De forma crónica puede favorecer la carcinogénesis, infertilidad y resistencia a las drogas oncológicas (Mansoori et al. 2017; Bedi et al. 2018).

Actualmente, la resistencia a los anticancerígenos es un serio problema en el área del cáncer. Alrededor del 90% de las fallas en el tratamiento por quimioterapia se dan durante la invasión y metástasis de células cancerosas resistentes a las drogas (Schirmacher 2019). Por lo cual diversos estudios se han enfocado en el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas que permitan combatir la resistencia genética que presentan algunos tipos de cáncer, por lo cual actualmente muchas pruebas clínicas están en proceso para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de tumores hematológicos y tumores sólidos (Falzone et al. 2018).

2.3 Linfoma

Los linfomas son un grupo heterogéneo de tumores malignos del sistema hematopoyético, que se caracterizan por la proliferación aberrante de células linfoides maduras o sus precursores. Generalmente se presenta como una adenopatía indolora, con síntomas sistémicos de fiebre, pérdida de peso inexplicable y sudores nocturnos que ocurren en etapas más avanzadas de la enfermedad (Lewis et al. 2020). Los linfomas se pueden dividir en dos entidades principales: el linfoma no Hodgkin (NHL) (alrededor del 90% de los linfomas) y el linfoma de Hodgkin (HL) (alrededor del 10% de los linfomas) (Armitage et al. 2017). Estos presentan diferencias significativas entre los procesos de la enfermedad. El HL tiende a ser más prevalente en adultos jóvenes, así como en adultos mayores de 55 años. En cambio, el NHL suele identificarse con mayor frecuencia en individuos mayores de 60 años. El HL se caracteriza por la presencia de células de Reed Sternberg, la inflamación como un síntoma común y la tasa de supervivencia es mayor en comparación con el NHL (Holdsworth et al. 2021).

El NHL se ubica como el onceavo cáncer más frecuente en hombres y mujeres en todo el mundo y en México, con un estimado de 544, 352 de nuevo casos reportados y 259, 793 de muertes a nivel mundial, mientras que para México se reportaron 6,840 nuevos casos y 3,071 muertes en el 2020 (IARC 2023). Este tipo de cáncer se vuelve más común a medida que las personas envejecen. Las personas de piel blanca tienen más probabilidades de desarrollar NHL y los hombres tienen más probabilidades que las mujeres de desarrollar linfoma (CDC 2023). En este tipo de tumor se ven afectados principalmente los linfocitos B, que constituyen aproximadamente el 86% de todos los NHL y en menor medida las células T y las células asesinas naturales (NK), representando alrededor del 14%. La tasa de supervivencia a cinco años es alrededor del 72%, pero varían según el subtipo y la edad. La supervivencia es notablemente menor en los países de ingresos bajos y medios (Miranda-Filho et al. 2019; CDC 2023).

El tratamiento para el NHL se determina según el tipo de linfoma, su etapa, las características histopatológicas y los síntomas presentes. Los enfoques terapéuticos más comunes abarcan la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, trasplante de células madre y en ocasiones intervención quirúrgica. Entre los fármacos que se utilizan para el tratamiento por

quimioterapia se encuentran la vincristina, doxorubicina, dexrazoxano, ciclofosfamida, metotrexato y etopósido los cuales se suelen utilizar en combinación con otros tipos de tratamientos como la radiación y la inmunoterapia. Sin embargo, puede haber efectos adversos después del tratamiento, lo cual varía según el tipo de quimioterapia aplicada y si se recurrió a la radiación o la cirugía como medidas complementarias. Entre los efectos secundarios habituales de la quimioterapia se encuentran la mielosupresión, la fiebre neutropénica y la inmunosupresión (Sapkota y Shaikh 2023).

2.3.1 Linfoma murino L5178Y-R

La línea celular L5178Y-R (Figura 2) deriva de un tumor inducido en el timo de ratones DBA/2 tratado con 3-metilcolantreno y se ha mantenido por pases *in vivo* en su huésped singénico. Las células son resistentes a los rayos X, pero sensibles a la radiación ultravioleta, al calor y a algunos fármacos antineoplásicos potenciales como el cis-diclorobis (ciclopentilamina) platino (II) (Cis-PAD), por lo que son ideales para evaluaciones de actividad citotóxica (Szumiel 1979; Quintanilla-Licea et al. 2016). Así mismo, se ha empleado para la evaluación de modelos murinos *in vivo* debido a su versatilidad para inducir ascitis como tumores sólidos. Además, destaca por su potencial para establecerse en diversos tipos de huéspedes, no solo en la cepa DBA/2 (huésped singénico natural), sino también en cepas como Swiss, C57BL/6 y ratones BALB/c (Plonka et al. 2005; Gomez-Flores et al. 2019).

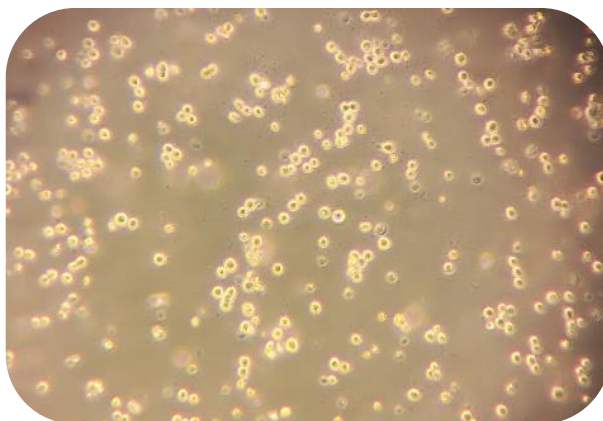


Figura 2. Línea de linfoma murino L5178Y-R.

2.4 Hongos endófitos

Los hongos endófitos se definen como los hongos que pasan la totalidad o parte de su ciclo de vida colonizando inter y/o intracelularmente dentro de los tejidos sanos de las plantas hospedaras, generalmente asintomáticas (Zhao et al. 2010). Estos microorganismos son importantes en el micro-ecosistema de las plantas, ya que ayudan de forma significativa el crecimiento y desarrollo de sus hospederos. Los endófitos producen compuestos bioactivos exclusivos para su hospedero, que incrementan la adaptabilidad de la planta hacia factores estresantes bióticos y abióticos, además de contribuir a la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica contra algunos microorganismos patógenos de la planta (Ali et al. 2018).

Actualmente los hongos endofíticos son considerados como fuente potencial de nuevos productos naturales que pueden ser explotados en medicina, agricultura e industria (Ratnaweera y de Silva 2017). Algunos de los compuestos que producen son esteroides, xantonas, fenoles, isocoumarinas, derivados de perileno, quinonas, furandiones, terpenoides, depsipéptidos, citocalasina, policétidos, alcaloides, péptidos, proteínas, lípidos, shikimates, glucósidos, isoprenoides entre otros. Estos pueden ser utilizados como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, inmunomoduladores, antidiabéticos, antioxidantes, antiinflamatorios o anticancerígenos (Rajamanikyam et al. 2017).

Por otro lado, las ventajas de emplear hongos endófitos como fuente de metabolitos resaltan en la facilidad que presentan de ser almacenados de forma indefinida sin perder su viabilidad, su alta producción de biomasa en tanques de fermentación. La producción de metabolitos de interés farmacológico o industrial mediante el uso de hongos endófitos representa mayor eficiencia en comparación con la gran cantidad de plantas maduras procesadas, necesarias para lograr el mismo rendimiento del producto final, reduciendo con esto, costos y tiempo de producción. Las variaciones en las condiciones de cultivo pueden ser exploradas para optimizar la producción de los compuestos ya que también es relativamente fácil la manipulación genética y adaptación metabólica de estos organismos. Debido a estas características se puede aumentar significativamente la productividad en un proceso industrial (Pandey et al. 2018; Kharwar et al. 2011; Li et al. 2018).

2.4.1 Hongos endófitos con actividad anticancerígena

Los productos naturales obtenidos de hongos endófitos son una fuente importante de compuestos anticancerígenos que tienen impacto en la medicina moderna. A partir de que se descubrió que el hongo endófito *Taxomyces andreanae* aislado del Tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae: Pinales) era productor de Taxol, un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer comercializado como Paclitaxel, 200 hongos endófitos de 40 géneros y diferentes órdenes, principalmente Ascomycota y Deuteromycota, han sido reportados como productores de Taxol, los cuales han sido aislados de plantas taxonómicamente diversas (Newman y Cragg 2020; Barrales y de la Rosa 2014; Kharwar et al. 2011).

Además del Taxol se han aislado al menos 100 metabolitos secundarios de 19 diferentes clases de compuestos químicos que presentan propiedades anticancerígenas (Bano et al. 2016). Entre los que se encuentran el baccatin III, podofilotoxina, camptotecina, vinblastina, vincristina, fomoxantona A y B, brefeldin, macrosporin, altersolanol, rosoloactona, esclerotiorina, allantopirona A entre otros (Uzma et al. 2018). Los metabolitos que se han logrado identificar han mostrado actividad anticáncer mediante diferentes mecanismos de acción tales como apoptosis, inhibición de proteínas quinasas involucradas en las vías de transducción de señales e inhibición de la histona desacetilasa (Deshmukh et al. 2019).

2.4.2 Optimización de la producción de compuestos por hongos endófitos

Para lograr una producción económicamente viable de metabolitos secundarios con interés biotecnológico por parte de los endófitos, es esencial aumentar tanto la actividad biológica de las cepas fúngicas como los rendimientos de los compuestos bioactivos (Mohinudeen et al. 2019). No obstante, varios estudios han reportado la disminución de la producción y rendimiento de estos metabolitos después del subcultivo de los hongos, lo que puede deberse a diversas razones. Una de ellas es la ausencia de señales provenientes del hospedero cuando los hongos se encuentran en cultivos axénicos. Este fenómeno resulta en el silenciamiento de los genes responsables de la producción de compuestos, mediado por cambios epigenéticos como la metilación o modificación de histonas (Naik et al. 2019). Otras posibles causas incluyen la falta de precursores necesarios (presentes en el hospedero) para la producción de metabolitos, la ausencia de otros endófitos microbianos que coexistan o estimulen, así como

la carencia de condiciones ambientales adecuadas. Todos estos factores pueden limitar la aplicabilidad comercial de esta tecnología (Mishra et al. 2021).

Para resolver esta problemática se han propuesto diferentes estrategias, esto incluye la mejora de las condiciones de fermentación, lo cual podría resultar en un incremento sostenible, consistente y reproducible en el rendimiento, con la opción de ser ampliado a nivel industrial. (Kusari y Spiteller 2011). Se ha demostrado que la modificación de los diferentes factores de cultivo como la composición del medio, el pH, la temperatura, oxígeno, el contenedor en donde se realiza la fermentación entre otros, es la manera más sencilla para incrementar la producción de metabolitos secundarios (Bode et al. 2002). Otras de las estrategias propuestas consisten en el uso de elicitores o precursores químicos para favorecer la producción de metabolitos específicos, el co-cultivo con otros organismos endófitos, así como modificaciones genéticas y epigenéticas (Gakuubi et al. 2022; Toghueo et al. 2020; Mohinudeen et al. 2019).

2.4.3 Selección de plantas para el aislamiento de hongos endófitos

La interacción de los endófitos con el huésped implica una continua interacción metabólica entre el hongo y la planta, lo que puede resultar en la producción de compuestos parecidos, mediante rutas metabólicas similares para la producción de metabolitos secundarios. Por tal motivo la selección de las especies vegetales para el aislamiento de los hongos endófitos es de suma importancia cuando se desea encontrar compuestos con determinada actividad biológica (Chandra 2012).

La distribución de ciertas poblaciones de hongos endófitos puede estar restringida a una especie o familia de plantas, así como al genotipo de la especie, por lo cual la presencia de una población específica de hongos podría determinar la producción de diversos metabolitos secundarios (Jia et al. 2016). Por lo que, debido al vasto número de especies de plantas en el mundo, se han ideado diferentes estrategias seleccionar a las plantas de donde aislar endófitos con actividad biológica (De Carvalho et al. 2019):

1. Las plantas que crecen en áreas de gran biodiversidad también tienen la posibilidad de albergar mayor diversidad de endófitos.
2. Plantas que crecen en hábitats especiales, como ambientes ecológicos deteriorados y

que posean características especiales para la supervivencia, dado que esta podría deberse a la presencia de endófitos.

3. Las plantas rodeadas de plantas infectadas con patógenos pero que no muestran síntomas tienen mayor probabilidad de alojar endófitos productores de compuestos antimicrobianos.
4. Plantas que han sido seleccionadas para uso humano en la medicina tradicional, con actividad biológica ya comprobada.

2.5 *Lophocereus marginatus*

Lophocereus marginatus, también llamada *Pachycereus marginatus* o *Stenocereus marginatus*, es una especie de cactus perteneciente a la familia Cactaceae, tribu Pachycereeae, se conoce popularmente como chilayo, cactus órgano o pipa (Figura 3). La especie endémica de México crece salvaje en estados con clima seco y cálido como Aguascalientes, Ciudad de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas. Se distingue por presentar crecimiento arbustivo o arborescente, con ramificación densa o escasa y tallos columnares que pueden llegar a medir hasta seis metros de altura. Su importancia económica radica en su uso para alimentación local a través de sus frutos y semillas, así como en la medicina tradicional para tratar infecciones gastrointestinales. Además, se emplea como forraje durante la temporada de sequía y tiene aplicaciones en la construcción de cercas vivas, vigas para techos y como fuente de leña (Hernández et al. 2004; Gomez-Flores et al. 2019; Arias y Terrazas 2006).

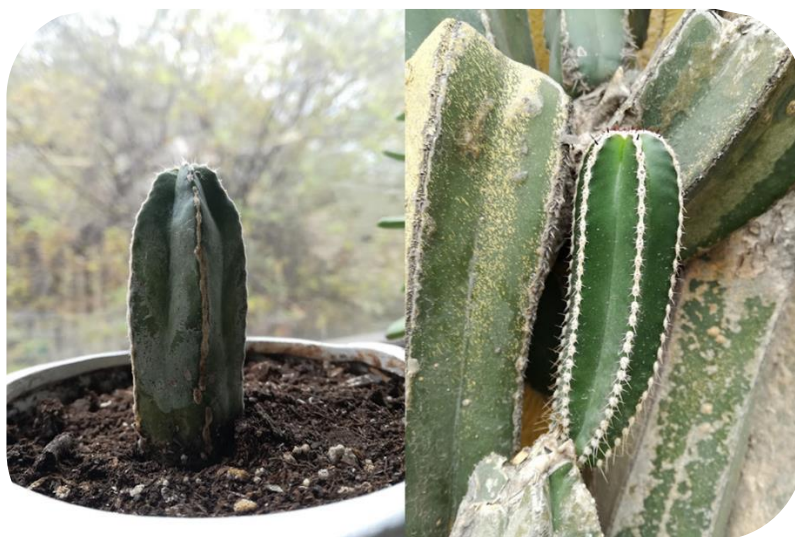


Figura 3. *Lohocereus marginatus* (DC.) S. Arias & Terrazas

En cuanto a la actividad biológica de *L. marginatus* se ha reportado que el extracto metanólico del tallo inhibe el crecimiento y la formación de biopelículas de *Helicobacter pylori* en un modelo *in vitro*, donde los metabolitos secundarios responsables de la actividad podrían ser flavonas, lactonas sesquiterpénicas y alcaloides (Moreno et al. 2015). La

actividad anticancerígena fue reportada por Hernández-Martínez et al. (2016), quienes evaluaron la actividad citotóxica de los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y la fracción acuosa-metanólica encontrando 84%, 85%, 84% y 82% de citotoxicidad contra células de linfoma L5178Y-R y 39%, 51%, 48% y 42% en células de melanoma B16F10 respectivamente. Gomez-Flores et al. (2019) evaluaron en un modelo de linfoma murino L5178Y-R la supervivencia de ratones con tumor, así como el daño hepatotóxico del extracto de *L. marginatus* al ser administrado vía oral, encontrando que la concentración de 0.5 mg / kg causó un 60% de supervivencia a los 60 días, sin alterar el parénquima y enzimas hepáticas (bilirrubina, oxaloacético glutámico, transaminasa, transaminasa pirutica glutámica y fosfatasa alcalina), en comparación con 40% de supervivencia inducida por vincristina (0.05 mg/kg), mientras que ningún ratón con tumor sobrevivió sin tratamiento. Adicionalmente, evaluaron la actividad citotóxica de los compuestos bioactivos lofenol, β -sitosterol y ácido palmítico, los cuales fueron obtenidos a partir del extracto n-hexánico de *L. marginatus*, presentando 89%, 73% y 83% de citotoxicidad contra células L5178Y-R respectivamente.

Actualmente *L. marginatus* se comercializa como suplemento alimenticio (Figura 4) aprobado por Cofepris para el control de diferentes tipos de cáncer, teniendo testimonios de personas con quistes, cáncer de mama e inclusive algunos con diagnóstico de fase terminal, que al consumir este producto presentaron mejoría (No. de registro MX/a/2014/011793).



Figura 4. Suplemento alimenticio a base de *L. marginatus*.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento se espera que el número de casos vaya en aumento a medida que las personas adopten estilos de vida que elevan el riesgo de padecer esta enfermedad, reportándose en el 2020 una tasa de hasta 9.9 millones de muertes según reportes de la base de datos GLOBACAN. Actualmente, los tratamientos convencionales presentan efectos secundarios severos en la mayoría de los pacientes, así como resistencia de las células cancerosas hacia las drogas que se utilizan clínicamente con mayor frecuencia. Por tal motivo, existe una constante necesidad de encontrar nuevos compuestos antitumorales que presenten efectos colaterales mínimos para el paciente. Los hongos endófitos al ser considerados como una fuente importante para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticancerígena representan una alternativa para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos en el control de esta enfermedad. Es por esto que, en el presente estudio, se evaluaron y caracterizaron los extractos y compuestos bioactivos de hongos endófitos de la cactácea *Lophocereus marginatus* con actividad antitumoral en el modelo de linfoma murino L5178Y-R.

4. HIPÓTESIS

Extractos y moléculas bioactivas de cultivos líquidos de hongos endófitos de *L. marginatus* (DC.) S. Arias & Terrazas presentan actividad citotóxica *in vitro* contra el linfoma murino L5178Y-R.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad citotóxica de extractos y moléculas bioactivas de cultivos líquidos de hongos endófitos aislados de *L. marginatus* (DC.) S. Arias & Terrazas contra el linfoma murino L5178Y-R.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la actividad citotóxica de extractos crudos de hongos endófitos de *L. marginatus* en el modelo de linfoma murino L5178Y-R *in vitro*.
2. Establecer la producción a mayor escala de cepas seleccionadas y evaluar su actividad biológica.
3. Caracterizar mediante LC-MS² las fracciones con mayor actividad citotóxica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Colecta e identificación del material vegetal

Se colectaron tallos de *Lophocereus marginatus* en diferentes municipios de Nuevo León, México de febrero a julio de 2020 (Tabla 1). El cactus fue identificado por la M.Sci. María del Consuelo González de la Rosa, Jefa del Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, con número de voucher 025588. Para su colecta los tallos de plantas sanas se cortaron y almacenaron en bolsas plásticas estériles para su transporte. El material vegetal se lavó con agua corriente para eliminar la suciedad adherida, para después ser procesada en el laboratorio.

Tabla 1. Colecta de material vegetal en el estado de Nuevo León en 2020.

Fecha	Municipio	Localidad
17 de febrero	General Escobedo	Los cavacitos
25 mayo	San Nicolas de los Garza	Centro de San Nicolas de los Garza
17 julio	Monterrey	Barrio estrella Cedros

6.2 Aislamiento, caracterización e identificación de hongos endófitos

6.2.1 Aislamiento de hongos endófitos de *L. marginatus*

El material vegetal se lavó con agua corriente para eliminar la suciedad. Posteriormente se realizaron cortes transversales del tallo, los cuales se sometieron a un protocolo de desinfección por inmersión en las siguientes soluciones: etanol al 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio comercial al 2.5% por 3 minutos, etanol al 70% por 30 s, agua estéril por 1 minutos (dos veces) y 0.01 M buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.4 por 1 minuto (Bezerra et al. 2013).

Para el aislamiento de los hongos endófitos se emplearon dos técnicas. En la primera, el tejido vegetal previamente desinfectado se cortó en trozos pequeños de aproximadamente $\sim 0.5 \text{ cm}^2$, los cuales se colocaron en la superficie de placas de Petri con agar de papa dextrosa (PDA: BD Difco, Ciudad de México, México) con y sin 0.05 g/L de Rosa de

Bengala, agar dextrosa Sabouraud (BD Difco) con y sin 0.05 g/L de Rosa de Bengala, agar agua y agar V8 adicionados con una solución de 10,000 U/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), para inhibir el crecimiento bacteriano (Kusari et al. 2009). En la segunda técnica el tejido vegetal desinfectado se trituró en PBS 1× con la ayuda de un mortero estéril, se realizaron diluciones seriadas a partir de la muestra (1:10, 1:100 y 1:1000) y 100 µL de cada una de las diluciones se inocularon por extensión en placas de Petri con los medios de cultivo mencionados anteriormente. Para asegurar que los aislamientos obtenidos corresponden a hongos endófitos, se incluyeron controles negativos que consistieron en 100 µL de la última solución de lavado empleada en el protocolo de desinfección. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante cuatro semanas y las colonias observadas se transfirieron a nuevas placas de PDA (Huang et al. 2001).

6.2.2 Cultivos monospóricos

Para garantizar la pureza de los aislamientos se establecieron cultivos monospóricos; para lo cual se realizaron suspensiones de las esporas en Triton X-100 al 0.1%, se realizó el conteo de las esporas en cámara de Neubauer y se ajustó la suspensión a 50 esporas/mL y 100 µL de esta suspensión se inocularon por extensión en placas de PDA. Las placas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por una semana, con la ayuda de un bisturí se cortaron las colonias y se transfirieron a nuevas placas de PDA, de tal manera que las colonias procedieron de una sola espora. A partir del cultivo monospórico se tomaron esporas para su preservación en una solución de glicerol al 30% y las muestras se almacenaron a -70°C (Cañedo y Ames 2004), hasta su uso.

6.2.3 Descripción macroscópica

Para la descripción macroscópica de los hongos aislados se realizaron resiembras a partir de los cultivos monospóricos en placas de PDA. Los hongos se incubaron por siete días a 28°C , después de lo cual se registró el crecimiento radial en milímetros a los tres y siete días de crecimiento, así como la forma, borde, tipo de micelio y el color anverso y reverso (Tibpromma et al. 2018).

6.2.4 Descripción microscópica

Para la descripción microscópica se realizaron micro cultivos de los hongos. Para lo cual se cortaron cuadros de PDA de un centímetro cuadrado aproximadamente y se colocaron sobre un portaobjetos estéril en una caja de Petri. El cuadro de agar fue inoculado con las esporas de los hongos. Posteriormente se colocó encima del cuadro de agar un cubreobjetos limpio. Se humedeció un trozo de algodón con agua estéril y se colocó dentro de la caja para proporcionar humedad. Los hongos se dejaron incubando por siete días para después teñir el portaobjetos y el cubreobjetos con azul de algodón de lactofenol, distinguiéndose la forma de las esporas y el tipo de hifas mediante observación en un microscopio óptico (Carl Zeiss) (Viramontes y Portillo 2010).

6.2.5 Identificación molecular de hongos endófitos

Para la identificación molecular de los aislamientos seleccionados se realizó la amplificación por PCR y secuenciación de los siguientes marcadores moleculares universales: espaciadores internos de transcritos del ADN ribosomal (ITS) y el gen de la β -tubulina (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la identificación molecular de aislamientos seleccionados.

Región	Secuencia	nt	Referencia
ITS1	5'-TCC GAT GGT GAA CCT GCG G-3'	600	Chen et al. 2010
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'		Chen et al. 2010
β -tubulina	5'-TGGGCYAARGGYCACTACACYGA-3' 5'-TCAGTGA ACTCCATCTCRT CCAT-3'	1000	Meyer et al. 2007

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cultivos monospóricos utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) (Valdés et al. 2015). El ADN purificado fue sometido a una PCR con los marcadores moleculares en un volumen de 50 μ L, utilizando Ruby Taq Master mix 2X (Jena Bioscience, Alemania), 100 ng del templado de ADN y 0.25 μ M de cada oligonucleótido.

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización de 95 °C por cinco minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 45 s y 72 °C por 90 s, seguido por una extensión final de 72 °C por ocho minutos para los marcadores ITS1-ITS4 (White et al. 1990). Para β -tubulina consistió en un ciclo de desnaturalización de 95 °C por dos minutos, 34 ciclos de 95 °C por 10 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, seguido por una extensión final de 72 °C por cinco minutos (Meyer et al. 2007). El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1% y se purificó utilizando el kit Agarose Gel Extraction (Jena Bioscience). El producto se secuenció utilizando el equipo ABI PRISM 310 TM Genetic Analyzer en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca Morelos. Para la identificación de los hongos las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron utilizando el programa BioEdit (versión 7.0.5.3). El análisis de las secuencias se realizó mediante la base de datos BLAST nucleotide del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI) y se obtuvo el porcentaje de identidad para cada aislamiento. Las secuencias de ADN se depositaron en el NCBI y se obtuvieron los números de acceso.

6.3 Condiciones de cultivo y extracción de metabolitos

6.3.1 Condiciones iniciales para la extracción de metabolitos de hongos endófitos

Los aislamientos se reactivaron en PDA y se incubaron de 7 a 14 días a 28 ± 2 °C. Para la extracción de los metabolitos secundarios un fragmento de micelio fresco de aproximadamente 0.8 cm² se inoculó de forma individual en matraces de 250 mL con 125 mL de caldo de papa y dextrosa (PDB) y se incubó por 30 días a 150 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente, después de lo cual, el micelio y el sobrenadante se separaron por filtración. El micelio se secó a 40 °C por 24 h y después se sometió al proceso de extracción por maceración con metanol (MeOH) en una relación 1:20, para después dejarse agitando a 150 rpm a temperatura ambiente y en oscuridad por 48 h. El extracto crudo se pasó por papel filtro para separar el solvente de la materia orgánica. El sobrenadante obtenido se extrajo mediante extracción líquido-líquido con acetato de etilo (AcEt) en una relación 1:1. Para separar la fase orgánica se utilizó un embudo de separación. Los solventes se removieron mediante presión reducida a 35 °C en un

rotavapor (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). El rendimiento de la extracción se calculó mediante la siguiente fórmula (Kusari et al. 2009):

$$\text{Rendimiento biomasa (\%)} = \frac{\text{Peso de la biomasa seca}}{\text{Peso del extracto seco}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento sobrenadante (\%)} = \frac{\text{Cantidad de medio}}{\text{Peso del extracto seco}} \times 100$$

Para la obtención de los extractos acuosos el sobrenadante se liofilizó en viales ámbar de cinco mililitros en el equipo FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry System (Labconco Corporation, Missouri, MO, EE. UU). Los extractos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 25 mg/mL y se determinó la actividad biológica (inhibición de crecimiento células tumorales y sanas y la actividad antioxidante).

6.3.2 Optimización de las condiciones de cultivo y extracción de metabolitos

Se seleccionaron cuatro cepas de hongos (PME-H002, PME-H005, PME-H007 y PME-H008) por presentar mayor actividad contra el linfoma y se sometieron a diferentes condiciones de cultivo y métodos de extracción para optimizar la producción de compuestos con actividad anticancerígena.

6.3.2.1 Evaluación del tiempo de fermentación

Se evaluaron distintos tiempos de fermentación con la finalidad de identificar cuándo se obtenía la mayor actividad anticancerígena. Los aislamientos fueron cultivados y extraídos a las mismas condiciones mencionadas con anterioridad con excepción del tiempo de extracción, el cual se llevó a cabo a los 7 d, 14 d, 21 d y 28 d.

6.3.2.2 Fermentación en diferentes condiciones de cultivo

Los aislamientos se fermentaron en diferentes condiciones de cultivo para optimizar la producción y el rendimiento de metabolitos con actividad anticancerígena (Tabla 3). Los hongos se reactivaron en PDA y después se inocularon en los siguientes medios de cultivo: PDB (con pH 5.7±0.2), caldo Czapeck (CK) (30 g/L de sacarosa, 2 g/L de NaNO₃, 1 g/L

de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de MgSO_4 , 0.5 g/L de KCl, 0.01 g/L de FeSO_4 ; pH=7.3) y caldo de malta (CM) (13 g/L de maltosa, 5.5 g/L de peptona de caseína y 0.5 g/L de extracto de levadura; pH 4.7 ± 0.2). A todos los medios se les añadieron 10,000 U/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina (DB Difco). Se implementaron además diferentes tipos de inóculo y condiciones de agitación, para lo cual matraces de 250 mL que contenían 125 mL de los medios de cultivo se inocularon con un fragmento de micelio fresco de aproximadamente 0.8 cm^2 o con esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL. Los matraces inoculados se fermentaron durante una semana sin y con agitación (150 rpm) a temperatura ambiente y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La extracción de los metabolitos de la biomasa y el sobrenadante se realizó como se describió anteriormente.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones experimentales para evaluar el rendimiento y la producción de metabolitos secundarios.

Medios de cultivo		Condiciones experimentales	
Descripción	Abreviación	Descripción	Abreviación
Caldo de papa y dextrosa	PDB	Agitación a 150 rpm + fragmento de micelio (0.8 cm^2)	AM
Caldo de malta	CM	Agitación a 150 rpm + 1×10^6 esporas/mL	AE
Caldo Czapeck	CK	Estático + fragmento de micelio (0.8 cm^2)	EM
		Estático + 1×10^6 esporas/mL	EE

Se realizó la evaluación de la actividad biológica y se seleccionaron las cepas de hongos, así como las condiciones de cultivo en donde se observó mayor actividad anticancerígena y porcentaje de rendimiento. Posteriormente, se realizó el escalamiento de la fermentación en matraces de dos litros con un litro de medio de cultivo. Se volvió a evaluar la actividad biológica para asegurar que el escalamiento no alteraba la producción de metabolitos.

6.3.2.3 Extracción de metabolitos con diferentes solventes y técnicas de extracción

Para esta siguiente fase, se seleccionaron los extractos metanólicos de dos cepas de hongos por presentar mayor rendimiento, para la evaluación de diferentes solventes y técnicas de extracción, con la finalidad de aumentar el rendimiento y la actividad biológica de los extractos.

6.3.2.3.1 Evaluación de diferentes solventes

Los extractos metanólicos se sometieron a particionamiento con diferentes solventes orgánicos mediante extracciones continuas, utilizando un extractor Soxhlet, para lo cual, los extractos se colocaron en cartuchos de celulosa y 500 mL de solventes con polaridad creciente (*n*-hexano, cloroformo y metanol) se fueron añadiendo de forma consecutiva a intervalos de 24 h. Al finalizar la extracción los extractos fueron filtrados con papel filtro Whatman N° 1, para después eliminar el solvente mediante roto vaporación (Samaniego 2016). Posteriormente se evaluó la actividad biológica de los extractos obtenidos. Se seleccionaron los extractos que presentaron mayor actividad biológica y rendimiento.

6.3.2.3.2 Evaluación con diferentes técnicas de extracción

Una vez identificado el solvente más conveniente para la obtención de los metabolitos, se procedió a evaluar las diferencias entre la extracción por maceración y Soxhlet. Esto con la finalidad de identificar el método que ofreciera mayor rendimiento y actividad. Para lo cual, se realizó la extracción con *n*-hexano a partir de 25 g de biomasa de los hongos. Una vez obtenidos los extractos, se realizaron las pruebas para evaluar la actividad biológica.

6.4 Evaluación de la actividad biológica de los extractos

6.4.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular de linfoma murino L5178Y-R (ATTC CRL-1722) la cual fue obtenida del banco de células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB, UANL. Como control sano se utilizaron las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), obtenidas a partir de muestras de sangre de donantes voluntarios,

mediante un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EE. UU) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el mantenimiento de las células se utilizó el medio RPMI-1640 (Life Technologies., Grand Island, NY, EE. UU) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS; Life Technologies Inc.) y solución de antibióticos y antifúngicos al 1% (Life Technologies Inc.). Las células se colocaron en frascos de 25 cm³ y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y 55% de humedad relativa (Quintanilla-Licea et al. 2016).

6.4.2 Inhibición de crecimiento de células tumorales y sanas

Para evaluar el potencial de extractos y fracciones para inhibir el crecimiento de células tumorales y sanas se utilizó la técnica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Affymetrix, Cleveland, OH, EE. UU.), para lo cual las células L5178Y-R y PBMC se cultivaron a una densidad de 1×10^4 y 1×10^5 células/pozo (190 µL) respectivamente en placas de 96 pozos (Corning, NY, EE. UU.) por 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se añadieron 10 µL de diferentes concentraciones (3 a 500 µg/mL) de los tratamientos y se dejaron incubando por 48 h a las condiciones mencionadas anteriormente. Después se adicionaron 15 µL de MTT a los pozos (concentración final 0.5 mg/mL) y las placas se incubaron de 3 a 4 horas. El medio de cultivo se decantó y los cristales de formazán que se formaron se disolvieron con 150 µL de DMSO a cada pozo, para después medir la densidad óptica (DO) a 570 nm en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). El porcentaje de inhibición de crecimiento se calculó mediante la siguiente fórmula (Quintanilla-Licea et al. 2016):

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = 100 - \frac{\text{DO 570 células tratadas}}{\text{DO 517 células no tratadas}} \times 100$$

6.4.2.1 Cálculo de índice de selectividad

Para determinar el índice de selectividad (IS), primero se calculó la concentración letal media (IC₅₀) de los tratamientos mediante una regresión no lineal. Se utilizaron los valores IC₅₀ de los tratamientos para las líneas tumorales y sanas para determinar el IS mediante la siguiente fórmula (Singh et al. 2019):

$$IS = (IC_{50} \text{ células sanas}) / (IC_{50} \text{ células tumorales})$$

6.4.3 Actividad antioxidante

Para evaluar el potencial antioxidante de los extractos y fracciones activas se realizó la prueba del 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.). Se tomaron 100 μ L de las muestras a diferentes concentraciones (15.6 a 250 μ g/mL) y 100 μ L de la solución de DPPH (88 μ M) y se colocaron en placas de 96 pozos. Las placas se incubaron por 30 min en oscuridad, para después medir la DO a 517 nm en un lector de microplacas (Naranjo et al. 2011). Como control negativo (CN) se utilizó DMSO y como positivo ácido ascórbico. Para determinar el porcentaje de actividad antioxidante se utilizó la formula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{\text{DO 517 CN} - \text{DO 517 tratamiento}}{\text{DO 517 CN}} \times 100$$

6.4.4 Actividad hemolítica

Para evaluar la actividad hemolítica de los extractos o fracciones, se utilizó una suspensión de eritrocitos al 5%, para la cual se utilizó sangre de donantes sanos. La sangre se colectó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y después se centrifugó a 400 rpm a 17 °C por cuatro minutos. Se retiró el sobrenadante, para después adicionar PBS 1X al tubo y se homogenizo, posteriormente se centrifugó a las mismas condiciones descritas anteriormente, este proceso se realizó en tres ocasiones para eliminar el plasma del paquete celular. Después de la última centrifugación se descartó el sobrenadante y el paquete celular se diluyó con PBS hasta obtener una solución del 5% (Elizondo-Luévano et al. 2020).

Para la prueba de hemólisis 250 μ L de la suspensión de eritrocitos al 5% se añadieron a microtubos que contenían un mililitro de diferentes concentraciones de las muestras (15.6 a 800 μ g/mL) diluidas en PBS. Las muestras se dejaron incubando por 30 min a 37 °C en oscuridad. Después los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por cinco minutos. Se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se colocaron en placas de 96 pozos. Las placas se leyeron a una DO de 540 nm en un lector de microplacas. Como control positivo (CP) se utilizaron eritrocitos con agua destilada para producir hemólisis y como CN eritrocitos sin

los extractos. El porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente formula (Elizondo-Luévano et al. 2023):

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{\text{DO 540 tratamiento}}{\text{DO 540 CP}} \times 100$$

6.4.5 Actividad anti hemolítica

Para la evaluación de la actividad anti hemolítica (efecto citoprotector) se utilizó una suspensión de eritrocitos al 5% la cual se obtuvo como se describió anteriormente. Se añadieron 250 μL de la suspensión de eritrocitos a microtubos que contenían diferentes concentraciones de los extractos (3.9 a 250 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen de 415 μL y después se añadieron 335 μL de una solución del radical 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (APPH) a una concentración de 150 mM diluido en PBS. Las muestras se incubaron en obscuridad con agitación (200 rpm) a 37 °C por cinco horas. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a 4 °C por cinco minutos. Se tomaron 200 μL de los sobrenadantes y se colocaron en placas de 96 pozos. Como CP se utilizaron eritrocitos tratados con APPH para generar el daño oxidativo y como CN eritrocitos sin el APPH. Las placas fueron leídas a una DO de 540 nm en un lector de microplacas. El cálculo de la actividad anti hemolítica se realizó con la siguiente formula (Elizondo-Luévano et al. 2020):

$$\text{Anti hemólisis (\%)} = 1 - \frac{\text{DO 540 tratamiento} - \text{DO540 CN}}{\text{DO 540 CP} - \text{DO540 CN}} \times 100$$

6.5 Caracterización de extractos

Para la caracterización de los extractos se seleccionaron los que presentaron mayor inhibición de crecimiento en células tumorales, con IS > 10 y que no presentaran hemólisis.

6.5.1 Prueba de solubilidad

Para las pruebas de solubilidad se tomaron muestras de los extractos y se colocaron en tubos de vidrio, para después adicionar un mililitro de los siguientes solventes: agua,

metanol, acetato de etilo, cloroformo (CHCl_3) y hexano. Los tubos se agitaron vigorosamente y se registró si eran solubles o insolubles en los diferentes solventes. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron los solventes que fueron utilizados como eluentes para el fraccionamiento en columna.

6.5.2 Fraccionamiento por cromatografía en columna

El fraccionamiento de los extractos se realizó por cromatografía en columna (Rodríguez 2021). Para lo cual se utilizó una columna de vidrio de 40 cm, preparada con 20 g de sílica gel fase normal con un tamaño de partícula de 0.063 a 0.200 mm (Merk, Darmstadt, Alemania) y cloroformo como solvente de empaquetamiento. Se utilizaron 500 mg de la muestra previamente disuelta en cloroformo (1 a 5 mL), que se colocó en la parte superior de la columna. La muestra se incorporó en la columna para después iniciar con las eluciones utilizando los solventes que aparecen en la Tabla 4. Las fracciones se colectaron en frascos de vidrio cada cinco mililitros manteniendo un goteo de 15 a 20 gotas por minuto, obteniéndose al final 94 fracciones de cada extracto. Los solventes se dejaron evaporar a 28 ± 2 °C, hasta obtener fracciones secas.

Tabla 4. Gradiente de elución utilizado en la columna.

Volumen total (mL)	Solvente	Relación (%)	Fraciones
20	CHCl ₃	100	1-4
40	CHCl ₃ - AcEt	90:10	5-8
60	CHCl ₃ - AcEt	80:20	9-12
80	CHCl ₃ - AcEt	70:30	13-16
100	CHCl ₃ - AcEt	60:40	17-20
120	CHCl ₃ - AcEt	50:50	21-24
140	CHCl ₃ - AcEt	40:60	25-28
160	CHCl ₃ - AcEt	30:70	29-32
180	CHCl ₃ - AcEt	20:80	33-36
200	CHCl ₃ - AcEt	10:90	37-40
220	AcEt	100	41-44
240	AcEt - MeOH	90:10	45-48
260	AcEt - MeOH	80:20	49-52
280	AcEt - MeOH	70:30	53-56
300	AcEt - MeOH	60:40	57-60
320	AcEt - MeOH	50:50	61-64
340	AcEt - MeOH	40:60	65-68
360	AcEt - MeOH	30: 70	69-72
380	AcEt - MeOH	20:80	73-76
400	AcEt - MeOH	10:90	77-80
490	MeOH	100	81-94

6.5.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

Para determinar el perfil de metabolitos de las fracciones se realizó cromatografía en capa fina (TLC) de cada tercera fracción. Para lo cual se emplearon cromatoplasmas de sílica gel fase normal de 5 × 10 cm con indicador de fluorescencia sobre aluminio (TLC Silica Gel 60 F254; Merck). Las muestras se disolvieron en una pequeña cantidad de solvente y se colocaron con la ayuda de un capilar en los extremos de la cromatoplasma a una distancia de un centímetro del borde inferior. La placa se introdujo a continuación en una cámara cromatográfica que contenía 10 mL de la fase móvil (eluyente). Cuando el solvente llegó a una distancia de 0.5 cm del borde superior se dio por concluida la separación. Las placas se dejaron secar por al menos 24 h, para posteriormente hacer el revelado mediante luz visible y; radiación de luz ultravioleta de onda corta (UV 254 nm) y onda larga (UV 365 nm) mediante una lámpara de luz UV portátil. Después se revelaron con vapores de yodo dentro de una cámara. Se determinó la relación entre las distancias recorridas por los compuestos y por el eluyente desde el origen de la placa para determinar el valor R_f utilizando la siguiente fórmula (Samaniego 2016):

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}}$$

Las fracciones que presentaron perfiles cromatográficos parecidos se unieron para formar fracciones colectivas (FC). Se determinó el peso de cada una de las FC y se calculó el rendimiento (%) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto seco al inicio}}{\text{Peso de la FC}} \times 100$$

6.5.4 Identificación de compuestos por cromatografía líquida acoplado a masas (LC-MS²)

Se seleccionaron las FC que presentaron mayor actividad biológica para identificar los compuestos presentes en ellas. Para lo cual, las muestras fueron analizadas mediante LC-MS² en el Laboratorio Especializado en Metabolómica y Proteómica (MetPro) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) ubicado en Baja California, México.

El análisis de las muestras se realizó en un sistema Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.). Las moléculas se separaron a través de una columna ProtID-Chip-43 II (C18, 43 mm, 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm, equipada con una columna de enriquecimiento de 40 nL). Las fases móviles consistieron en H₂O con un 0.1% de ácido fórmico como solución A y acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico como solución B. El efluente de la columna se introdujo en un espectrómetro de masas 6530 Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies Inc.) para adquirir los datos de las masas de los compuestos a través de una interfaz HPLC-Chip Cube MS, empleando ionización por nanospray en modo positivo.

El procesamiento y análisis de los datos obtenidos se realizó mediante paquetes de software de acceso abierto y plataformas en línea como Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu> revisado 20 octubre de 2023) para la anotación estructural y para los metabolitos que no fueron recuperados mediante coincidencia espectral, se utilizó la herramienta in silico MolDiscovery y Dereplicator incorporadas en la plataforma GNPS. Como herramienta complementaria, se utilizó el paquete CSI:FingerID del software SIRIUS. Las clases químicas de los metabolitos identificados se determinaron utilizando la aplicación web Classyfire (<http://classyfire.wishartlab.com> revisado 26 de octubre de 2023).

6.6 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU) y el IBM® SPSS® versión 20 (SPSS, Chicago, IL. EE. UU.). Los resultados se expresaron como la media ± SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. Se determinó la distribución de los datos obtenidos mediante la prueba de normalidad de Pearson. Los datos con una distribución normal con tratamientos de más de dos grupos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la comparación de medias de Tukey. Los que no siguieron una distribución normal se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de Dunnet. Para los tratamientos con menos de dos grupos el análisis se realizó mediante la prueba *t* de Student. Para determinar la correlación entre los factores de

fermentación y extracción, con la actividad y el rendimiento de los extractos se utilizó la prueba de correlación de Pearson. Todos los análisis se realizaron con un valor $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la actividad citotóxica de extractos crudos de hongos endófitos de *L. marginatus* en el modelo de linfoma murino L5178Y-R *in vitro*.

7.1.1 Aislamiento de hongos endófitos.

Para el aislamiento de hongos endófitos filamentosos de *L. marginatus* se sembraron las muestras de tejido (tallos) en diferentes medios de cultivo (Figura 5). Se aislaron un total de 10 hongos filamentosos, en donde la mayoría (60%) se obtuvieron del medio PDA (Figura 6).

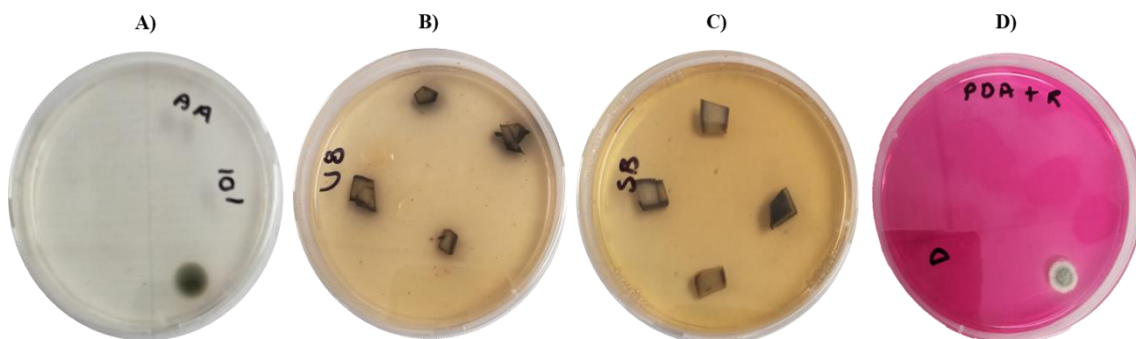


Figura 5. Aislamiento de hongos endófitos filamentosos. A) Agar agua con diluciones del tejido vegetal triturado. B) Agar V8 con fragmentos del tejido vegetal. C) Agar dextrosa Sabouraud con fragmentos del tejido vegetal. D) PDA + Rosa de Bengala con diluciones del tejido vegetal triturado.

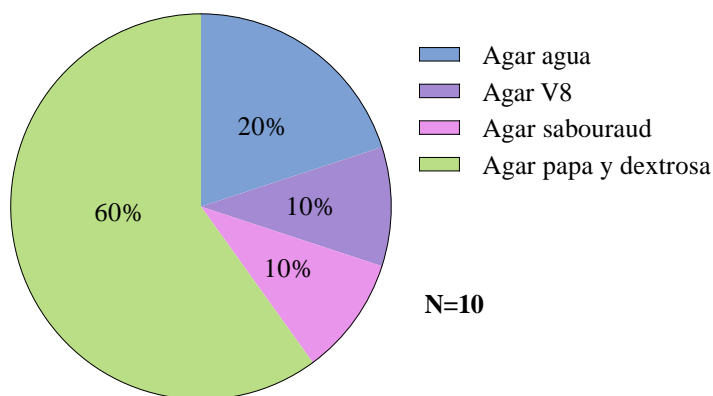


Figura 6. Aislamientos de hongos filamentosos en diferentes medios de cultivo. Gráfica de pastel que muestra el porcentaje de aislamientos que fueron obtenidos a partir de cada uno de los medios de cultivo que fueron utilizados.

7.1.2 Caracterización morfológica de los aislamientos

La caracterización morfológica de los aislamientos se realizó a partir de cultivos monospóricos. Las características macroscópicas y microscópicas se pueden observar en la Tabla 5 y la Figura 7. Se encontró que la mayoría de los hongos filamentosos presentaron forma circular, borde filamentososo y micelio plano, el crecimiento radial a los 3 d fue de 5.1 a 8.5 mm mientras que a los siete días fue de 9.9 a 22.6 mm. La coloración de los hongos fue muy variada. Con respecto a las características microscópicas la mayoría de las hifas fueron septadas y las esporas de forma globosa.

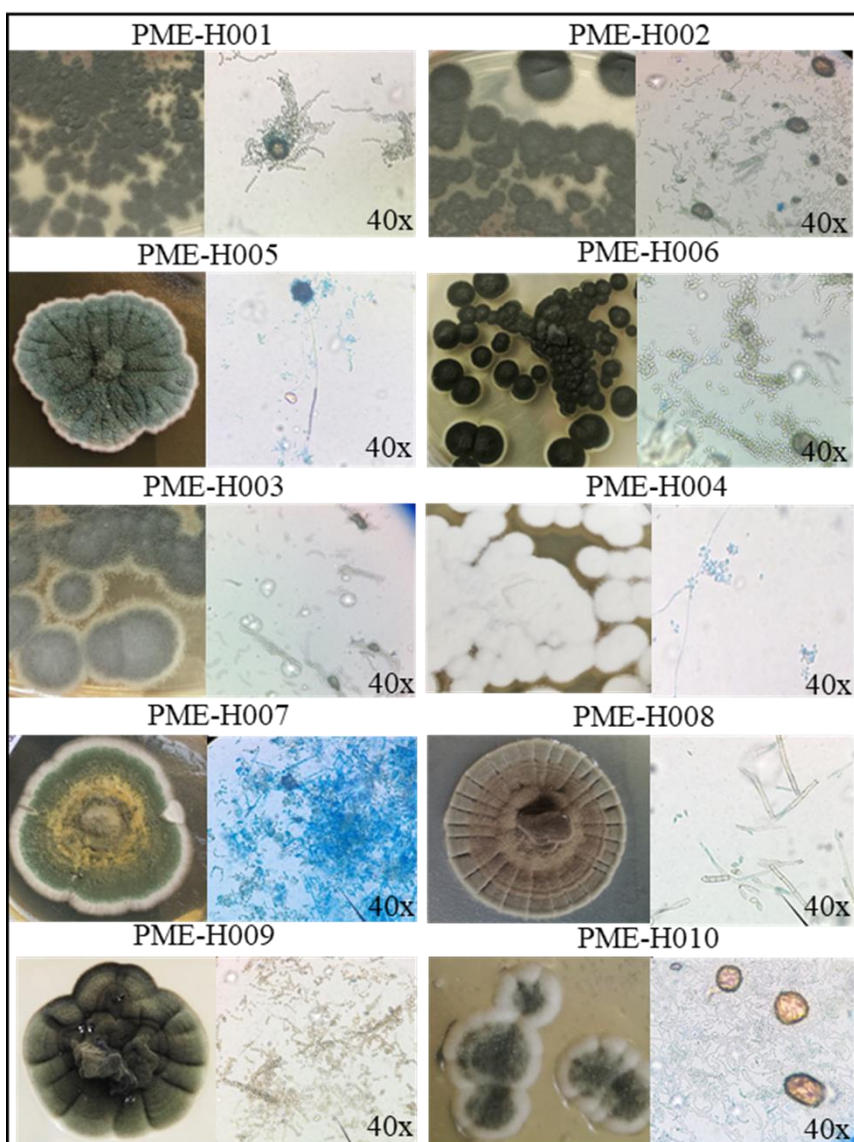


Figura 7. Hongos endófitos filamentosos aislados de *L. marginatus*.

Tabla 5. Características macroscópicas y microscópicas de hongos endófitos filamentosos sembrados en PDA.

Aislamiento	Macroscópico					Microscópico		
	Crecimiento radial (mm)		Forma	Borde	Tipo de Micelio	Color inferior/superior*	Tipo de hifa	Forma de espora
	3 d	7 d						
PME-H001	7.3	9.9	Circular	Filamentoso	Plano	#838B83/ #F0E68C- EEF3E2	Septada	Globosa
PME-H002	8.5	17.5	Circular	Filamentoso	Plano	#838B83/ #F0E68C- EEF3E2	Septada	Globosa
PME-H003	8.6	14.2	Circular	Filamentoso	Plano	#838B83/ #FFFFFF2- 85B5B5	Septada	Globosa
PME-H004	4.6	21.6	Circular	Filamentoso	Plano	#FFFFFF/ #FCF8DC	Septada	Fusiforme
PME-H005	8.1	17.9	Circular	Irregular	Plano	#838B83/ #FFC125- FEF0C9	Septada	Globosa
PME-H006	5.8	17.9	Circular	Entero	Plano	#2F4F4F- FFFFFF/ #FDFCDC	Septada	Globosa
PME-H007	6.2	22.6	Circular	Filamentoso	Plano	#006400- FFFFFF/ #CD9B10- EEDC82	Cenocítica	Elipsoidal
PME-H008	5.1	15.2	Circular	Entero	Plano	#2F4F4F- EBECE4/ #FEFEF2	Septada	Fusiforme
PME-H009	1.9	11.2	Circular	Ondulado	Plano	#8B814/ #545454	Septada	Citriforme
PME-H010	0.4	5	Circular	Ondulado	Plano	#8B8878- CDC8B1/ #EED8AE	Septada	Globosa

*El color de las colonias fue definido con la carta de colores de la página <http://www.webusable.com/coloursTable.htm> (revisado 10 de febrero de 2021).

7.1.3 Evaluación inicial de la actividad anticancerígena

Los aislamientos obtenidos fueron fermentados en PDB para después realizar la extracción metanólica a partir de la biomasa y con acetato de etilo a partir del sobrenadante. Obteniéndose rendimientos de 4.4% a 20.2% para los extractos metanólicos y de 0.006% a 0.399% para los de acetato de etilo (Tabla 6). Los extractos acuosos consistieron en el sobrenadante liofilizado.

Tabla 6. Rendimientos de los extractos metanólicos y de acetato de etilo.

Aislamiento	Metanol	Acetato de etilo
PME-H001	5.2%	0.012%
PME-H002	5.2%	0.012%
PME-H003	4.4%	0.09%
PME-H004	20.2%	0.004%
PME-H005	12%	0.006%
PME-H006	4.7%	0.007%
PME-H007	8.9%	0.010%
PME-H008	5.6%	0.399%
PME-H009	7%	0.006%
PME-H010	5.1%	0.012%

Para la evaluación inicial de la actividad anticancerígena, los extractos acuosos, de acetato de etilo y metanólicos de los 10 aislamientos se evaluaron a concentraciones de 250 y 25 $\mu\text{g/mL}$ contra la línea celular L5178Y-R. Se encontró, que los extractos acuosos presentaron menor inhibición (< 50%) a la concentración más alta evaluada (250 $\mu\text{g/mL}$), en comparación con los extractos de acetato de etilo y metanólicos que presentaron valores de hasta 93.4% y 94.3% respectivamente (Tabla 7). Se seleccionaron 10 extractos con >80% inhibición de crecimiento del linfoma y se evaluaron a 250 $\mu\text{g/mL}$ en las células no tumorales PBMCs. Se seleccionaron los extractos que presentaron menor inhibición en las células sanas (<50%) (Tabla 7). Además, se seleccionaron un total de seis extractos pertenecientes a los aislamientos PME-H002, PME-H005, PME-H007 y PME-H008, para continuar con las siguientes etapas del trabajo.

Tabla 7. Inhibición de crecimiento de extractos de hongos endófitos a 250 y 25 µg/mL contra la línea tumoral L5178Y-R y PBMC.

Aislamiento	Extracto	L5178Y-R		PBMC
		250 µg/mL	25 µg/mL	250 µg/mL
PME-H001	Acuoso	32.9±6.1	0.9±7.2	-
	Metanólico	77.6±11.5	10.2±7.6	-
	Acetato de etilo	85.1±1.9*	11.4±2.3	56.8±4.8
PME-H002	Acuoso	24.7±3.6	7.2±8.4	-
	Metanólico	83.6±3.8*	12.1±4.2	10.5±3.4**
	Acetato de etilo	85.3±1.3	0	55.3±5.6
PME-H003	Acuoso	40±3.1	8.9±12	-
	Metanólico	0.86±8	0	-
	Acetato de etilo	86.7±0.2*	0	81±2.3
PME-H004	Acuoso	38.2±6.2	9.2±10	-
	Metanólico	0.86±8.8	0	-
	Acetato de etilo	74.2±5	0	-
PME-H005	Acuoso	19.3±6.2	3.4±7.8	-
	Metanólico	87±0.4*	69.1±5.8	32.7±11**
	Acetato de etilo	91.6±1*	5.2±9.3	29.7±5.3**
PME-H006	Acuoso	12.1±5.6	0	-
	Metanólico	6.6±6.7	0	-
	Acetato de etilo	1.6±5.9	0	-
PME-H007	Acuoso	43±7.5	0	-
	Metanólico	93.9±0.8*	32.9±7.1	22.8±1.5**
	Acetato de etilo	92.8±2.3*	63.6±3.7	42.3±15**
PME-H008	Acuoso	15.3±7.9	0	-
	Metanólico	94.3±0.5	0	42.8±7.5**
	Acetato de etilo	0	0	-
PME-H009	Acuoso	14.7±6.6	6.4±12	-
	Metanólico	3.6±6.8	0	-
	Acetato de etilo	14.7±6.2	0	-
PME-H010	Acuoso	16.4±5.1	7.1±10	-
	Metanólico	3.2±4.2	4.6±7.4	-
	Acetato de etilo	93.4±1.3*	12.1±1.3	63.4±6.7

* Extractos con mayor actividad (>80%) contra la línea tumoral. ** Extractos que presentaron menor inhibición (< 50%) en las células sanas.

Para la siguiente etapa los seis extractos seleccionados se evaluaron a diferentes concentraciones (31 a 250 $\mu\text{g/mL}$) contra la línea L5178Y-R y PBMCs para determinar el valor IC_{50} y el IS (Tabla 8). Se encontró que el extracto de acetato de etilo del aislamiento PME-H005 presentó la mayor toxicidad contra las células L5178Y-R y el IS más alto con IC_{50} de 23.2 $\mu\text{g/mL}$ y un $\text{IS} > 10.7$, al compararse con las células sanas.

Tabla 8. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e IS de la línea L5178Y-R y PBMC al evaluar extractos metanólicos y acetato de etilo de aislamientos seleccionados.

Aislamiento	Extracto	L5178Y-R		PBMC
		IC_{50}	SI*	IC_{50}
PME-H002	Metanólico	176 \pm 1.7bcd	>1.4	>250
PME-H005	Metanólico	166.2 \pm 1.8bc	>1.5	>250
	Acetato de etilo	23.2 \pm 1.3a	>10.7	>250
PME-H007	Metanólico	132.9 \pm 1.5b	1.6	215.8 \pm 1.6cd
	Acetato de etilo	140.6 \pm 1.7b	1.7	230.5 \pm 0.1d
PME-H008	Metanólico	101 \pm 1.5b	>2.4	>250

*IS = IC_{50} de PBMC/ IC_{50} de la línea de linfoma. Los valores con letras diferentes dentro de las columnas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

7.1.4 Evaluación de la actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y de acetato de etilo se realizó la prueba utilizando el radical DPPH. A la concentración más alta evaluada (250 $\mu\text{g/mL}$) el extracto metanólico del aislamiento PME-H002 fue el que presentó mayor actividad con 33.9%. Todos los extractos presentaron valores $\text{IC}_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$. El ácido ascórbico utilizado como control positivo presentó una IC_{50} de 7.1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 9).

Tabla 9. Actividad antioxidante (DPPH) de extractos metanólicos y acetato de etilo.

Aislamiento	Extracto	Porcentaje (250 $\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
PME-H002	Metanólico	33.9 \pm 3.4c	>250
PME-H005	Metanólico	12.5 \pm 1.8b	>250
PME-H005	Acetato de etilo	0.7 \pm 1.1a	>250
PME-H007	Metanólico	13.7 \pm 6.7b	>250
PME-H007	Acetato de etilo	26.4 \pm 4.3c	>250
PME-H008	Metanólico	11.7 \pm 3.7b	>250
Ácido ascórbico	NA*	83.9 \pm 0.1d	7.1 \pm 1.1

Los valores con letras diferentes dentro de las columnas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

7.1.5 Identificación molecular de los aislamientos con actividad anticancerígena

Se realizó la identificación molecular de los hongos endófitos que mostraron inhibición de crecimiento en la línea tumoral L5178Y-R (Tabla 10). Se realizó la secuenciación de las regiones amplificadas ITS1-ITS4 y β -tubulina, las cuales fueron revisadas manualmente y analizadas mediante la herramienta Blast del NCBI para realizar la identificación de los hongos al comparar las cepas de referencia con las secuencias de los aislamientos. El aislamiento PME-H002 fue identificado como *Penicillium citricum* con 99.2 % de identidad, PME-H005 se identificó como *Aspergillus versicolor* con 99% (ITS1-ITS4) y 96.1% (β -tubulina), PME-H007 como *Metarhizium anisopliae* (98.9%), el aislamiento PME-H008 solo pudo ser identificado hasta género (*Cladosporium* sp.).

Tabla 10. Identificación molecular de hongos endófitos con actividad anticancerígena basada en la secuenciación de la región ITS1-ITS4 y β -tubulina.

Aislamiento	Marcador molecular	Comparación con base de datos NCBI	% Identidad	Clasificación
PME-H002	ITS1-ITS4	<i>Penicillium citrinum</i> (MT597829.1)	99.2%	<i>Penicillium citrinum</i> (OQ034576.1)
PME-H005	ITS1-ITS4	<i>Aspergillus tabacinus</i> (MT635280.1)	99%	<i>Aspergillus versicolor</i> (OQ048310.1)
	β -tubulina	<i>Aspergillus versicolor</i> (XM_040811307.1)	96.1%	
PME-H007	ITS1-ITS4	<i>Metarhizium anisopliae</i> (HQ722915.1)	98.9%	<i>Metarhizium anisopliae</i> (OQ034573.1)
PME-H008	ITS1-ITS4	<i>Cladosporium</i> sp. (MT820353.1)	97.6%	<i>Cladosporium</i> sp. (OQ034531.1)

7.2 Producción a mayor escala de cepas seleccionadas y evaluación de su actividad biológica

7.2.1 Evaluación del tiempo de fermentación

Se evaluaron diferentes tiempos de fermentación para determinar si aumentaba o disminuía la actividad anticancerígena de las cepas de hongos que fueron seleccionados. La cantidad de extracto obtenido por cada 125 mL de medio fue mucho mayor para los extractos metanólicos en comparación con los de acetato de etilo. Se observó que solo las cepas *A. versicolor* y *M. anisopliae* conservaron la actividad citotóxica, donde los extractos de acetato de etilo presentaron la mayor actividad con valores IC_{50} de 23.2 $\mu\text{g/mL}$ y un IS >10.7 a los 28 d para *A. versicolor* 5 y 2.8 $\mu\text{g/mL}$ y SI de 46.2 a los 21 d para *M. anisopliae* (Tabla 11).

Tabla 11. Rendimiento, IC₅₀ (µg/mL) e IS de la línea L5178Y-R y PBMCs al evaluar extractos metanólicos y acetato de etilo en diferente tiempo de fermentación.

Cepa	Extracto	Día	Rendimiento mg/125 mL	L5178Y-R IC ₅₀	PBMCs IC ₅₀	IS*
<i>P. citrinum</i> PME-H002	Metanol	7	104	>250	-	-
		14	39	>250	-	-
		21	27	>250	-	-
		28	27	>250	-	-
<i>A. versicolor</i> PME-H005	Acetato etilo	7	7	47.7±1.3ab	>250	>5.2
		14	9	26.6±1.3a	78.2±0.04a	2.9
		21	6	120.7±1.6bc	>250	>2
		28	5	23.2±1.3a	>250	>10.7
	Metanol	7	126	237.6±1.3d	>250	>1
		14	104	>250	-	-
		21	543	>250	-	-
		28	101	>250	-	-
<i>M. anisopliae</i> PME-H007	Acetato etilo	7	12	2.9±1.7a	156±0.8b	53.7
		14	26	4±1.5a	129.6±1.5ab	32.4
		21	20	2.8±1.6a	129.6±1.7ab	46.2
		28	10	3±1.5a	220.3±1.8c	73.4
	Metanol	7	43	188±1.3cd	>250	>1.3
		14	50	>250	-	-
		21	20	>250	-	-
		28	26	162.4±1.2cd	>250	>1.5
<i>Cladosporium sp.</i> PME-H008	Metanol	7	89	>250	-	-
		14	56	>250	-	-
		21	131	>250	-	-
		28	73	>250	-	-

*IS = IC₅₀ de PBMC/IC₅₀ de la línea de linfoma. Los valores con letras diferentes dentro de las columnas son significativamente diferentes (p ≤ 0.05) utilizando la prueba de Tukey. Fermentación en PDB a 150 rpm.

7.2.2 Fermentación en diferentes condiciones de cultivo

Las cepas se sometieron a un proceso de fermentación durante 7 días, ya que en los experimentos previos se observó actividad anticancerígena favorable en este periodo de tiempo. Se evaluaron los medios de cultivo PDB, CK y CM utilizando las siguientes condiciones: en agitación inoculado con fragmento de micelio (AM), en agitación inoculado con 1×10^6 esporas/mL (AE), estático inoculado con fragmento de micelio (EM), estático inoculado con 1×10^6 esporas/mL (EE). Se obtuvieron extractos metanólicos y de acetato de etilo, se determinó el rendimiento y se evaluó la actividad anticancerígena y antioxidante (DPPH).

7.2.2.1 Extractos metanólicos

Los rendimientos obtenidos se compararon con las condiciones iniciales (control) que se utilizaron para la fermentación de los hongos (PDB AM). Los mejores rendimientos se obtuvieron con el medio CK para todas las cepas evaluadas. Con *P. citrinum* se aumentó el rendimiento de forma altamente significativa ($p < 0.01$) en agitación inoculado con esporas (AE) en comparación con el control (Figura 8A). Para *A. versicolor* el medio CK aumentó el rendimiento ($p < 0.01$) con 33.5% cuando se mantuvo de forma estática inoculado con micelio (EM) en comparación con el control (Figura 8B). Con la cepa *M. anisopliae* el mayor rendimiento se obtuvo inoculando esporas en condiciones estáticas (EE) con un valor de 26.6% (Figura 8C). Finalmente, con la cepa *Cladosporium* sp. la inoculación con esporas sin agitación (EE) logró el mayor rendimiento con 50.3%, sin embargo, no fue significativamente más alto que el control (Figura 8D). El rendimiento de los extractos no presentó una correlación con la actividad biológica de los mismos.

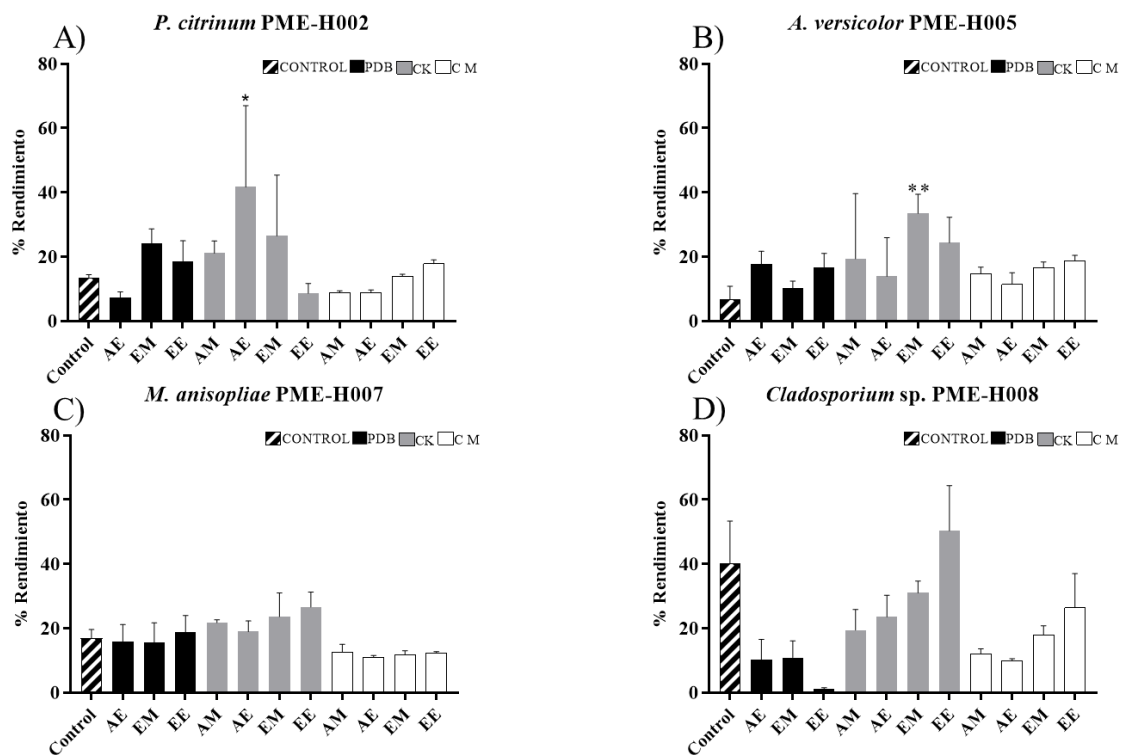


Figura 8. Rendimiento (%) de extractos metanólicos de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo. A) PME-H002. B) PME-H005. C) PME-H007 D) PME-H008. Los datos son la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnett, comparado con el control (PDB AM). PDB: Caldo de papa y dextrosa. CK: Caldo Czapek. CM: Caldo de malta. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

Con respecto a la cantidad de extracto seco obtenido, se encontró que para *P. citrinum* no se observó un aumento significativo con respecto al control (Figura 9A). Al utilizar el medio CK en agitación, se obtuvo mayor cantidad de extracto seco de forma significativa ($p < 0.05$), independientemente del tipo de inoculo para las cepas PME-H005 (>160 mg) (Figura 5B) y PME-H008 (>95 mg) (Figura 9D). Finalmente, para la cepa PME-H007 el medio CM en agitación e inoculado con micelio (AM) permitió mayor obtención de extracto de forma altamente significativa ($p < 0.01$) con 162.7 mg (Figura 9C).

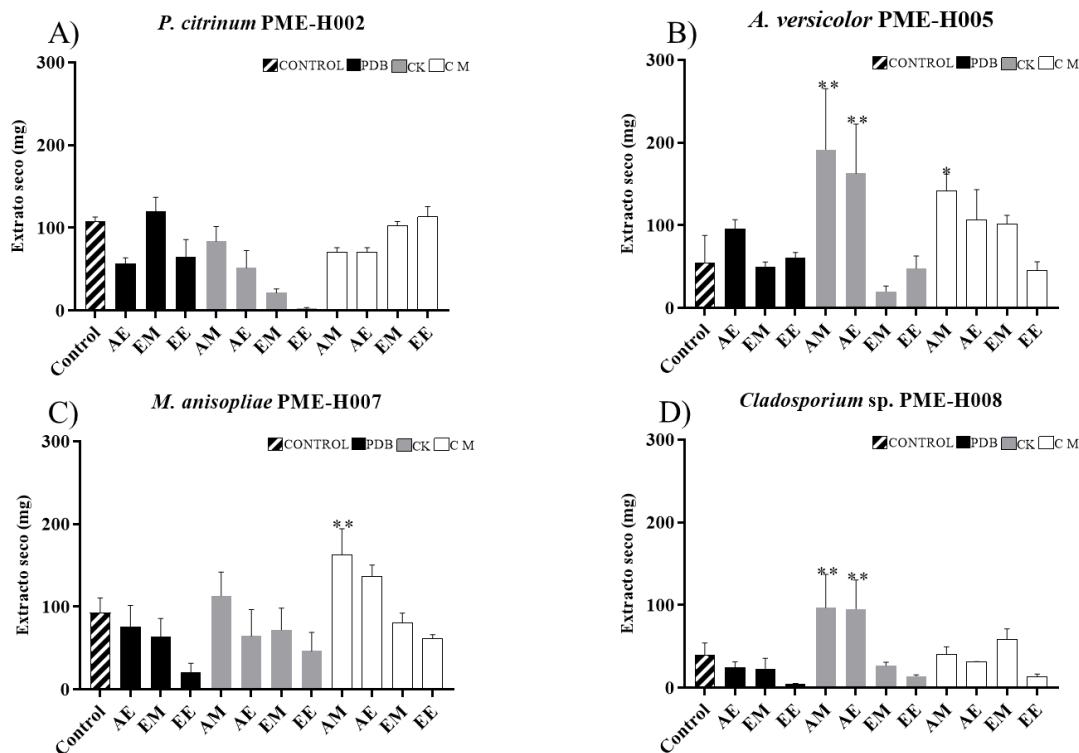


Figura 9. Peso seco de extractos metanólicos de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo. A) PME-H002. B). PME-H005. C) PME-H007 D) PME-H008. Los datos son la media \pm SD de ensayos con tres replicas independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control (PDB AM). Caldo de papa y dextrosa. CK: Caldo Czapek. CM: Caldo de malta. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

Para evaluar la inhibición de crecimiento de extractos metanólicos contra la línea de linfoma y determinar la IC_{50} , se evaluaron concentraciones de 15 a 250 $\mu\text{g/mL}$. Se encontró que la combinación de factores influye en la actividad de los extractos. Los extractos evaluados inhibieron el crecimiento de las células tumorales de manera dependiente a la dosis a medida que se aumentó la concentración del extracto (Figura 10-13). A la concentración más alta (250 $\mu\text{g/mL}$) la cepa con mayor actividad ($p < 0.05$) fue *A. versicolor* con 91.1% de inhibición cuando se cultivó en CM inoculado con esporas sin agitación (EE) (Figura 11C). Los valores IC_{50} calculados, así como el IS de los extractos con mayor actividad ($IC_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$) se observan en la Tabla 12. Los cuales fueron seleccionados para ser evaluados contra la línea sana PBMCs y calcular el valor IS y finalmente determinar la actividad antioxidante mediante DPPH. Para la cepa de *P.*

citrinum se obtuvo la IC₅₀ más baja con el medio CK inoculado con esporas en agitación (AE) con 185.8 µg/mL. Con *A. versicolor* la inhibición de las células tumorales aumentó al utilizar el medio CM en condiciones estáticas con valores IC₅₀ de 69.6 y 49.6 µg/mL para los matraces inoculados con micelio y esporas respectivamente. La cepa *M. anisopliae* solo presentó actividad antitumoral considerable con el medio PDB en agitación inoculado con micelio, con IC₅₀ de 84.5 µg/mL. Con ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas se logró aumentar de forma considerable la IC₅₀ de inhibición de crecimiento del linfoma con la cepa *Cladosporium* sp. Los extractos que presentaron IC₅₀ por debajo de 250 µg/mL (7 de 48) fueron seleccionados para ser evaluados contra la línea no tumoral PBMCs y determinar el SI. Los extractos seleccionados presentaron valores IC₅₀ superiores a 250 µg/mL que fue la concentración más alta evaluada. Se utilizaron las IC₅₀ de inhibición de crecimiento de las células tumorales y no tumorales para calcular la SI, encontrando que los extractos presentaron valores mayores de 1 a 5. Donde la cepa que presentó mayor selectividad fue *A. versicolor* con una SI de 5 cuando se cultivó en CM de forma estática inoculado con esporas. Con la vincristina (control positivo) se obtuvo una inhibición de 85% en las células de linfoma y 11.2% en las PBMCs. Con respecto a la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos, no se observó actividad significativa ya que todos los extractos presentaron valores IC₅₀ mayores a 250 µg/mL (Tabla 12).

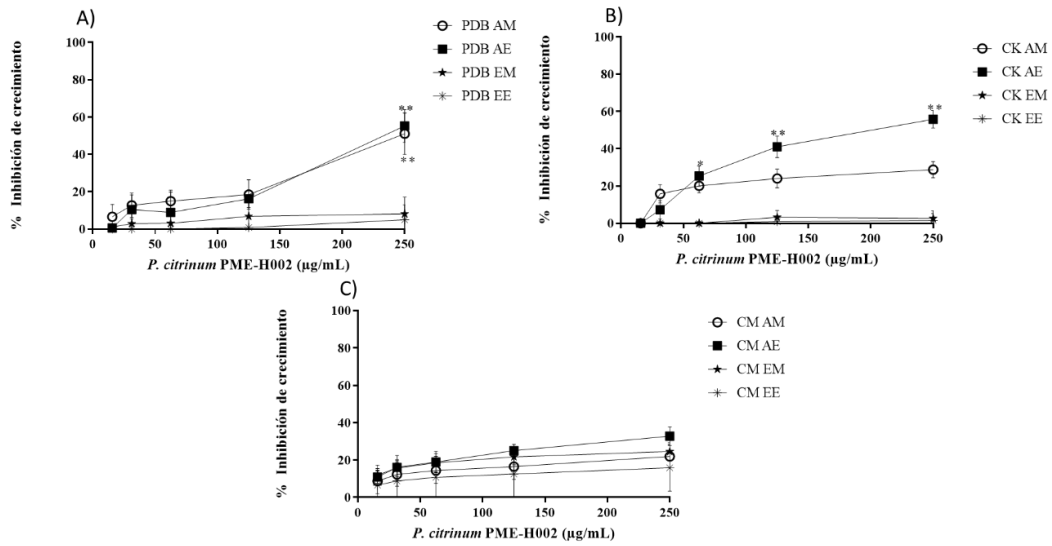


Figura 10. Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H002 en diferentes condiciones de cultivo. A) PDB. B) CK. C) CM. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control no tratado. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

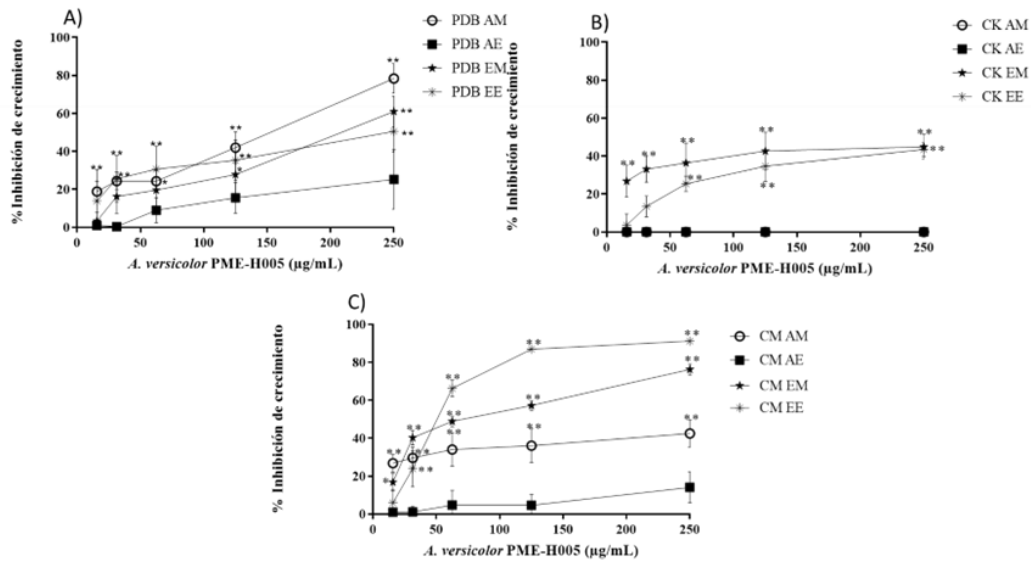


Figura 11. Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H005 en diferentes condiciones de cultivo. A) PDB. B) CK. C) CM. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control no tratado. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

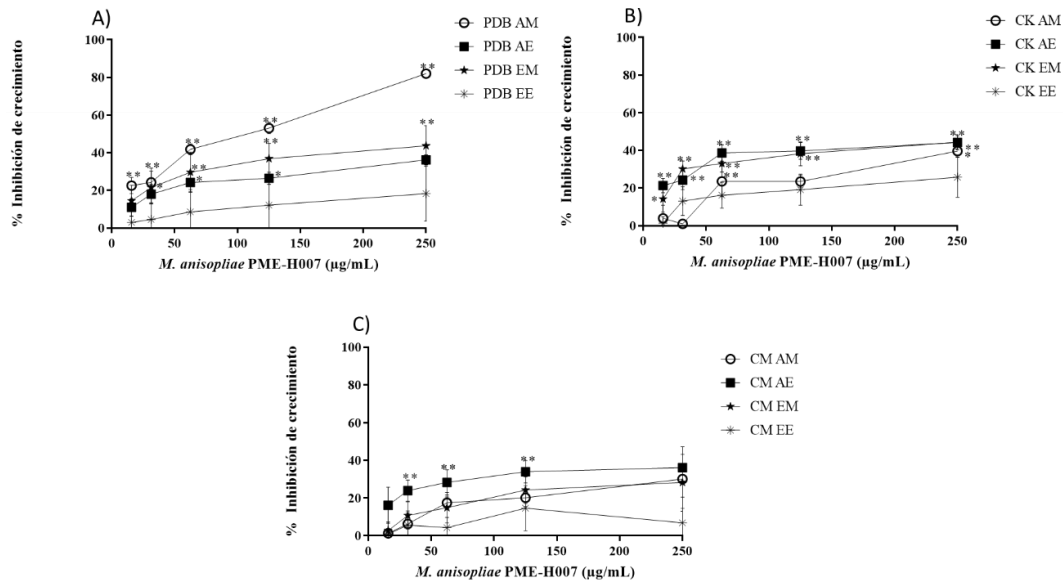


Figura 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H007 en diferentes condiciones de cultivo. A) PDB. B) CK. C) CM. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control no tratado. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

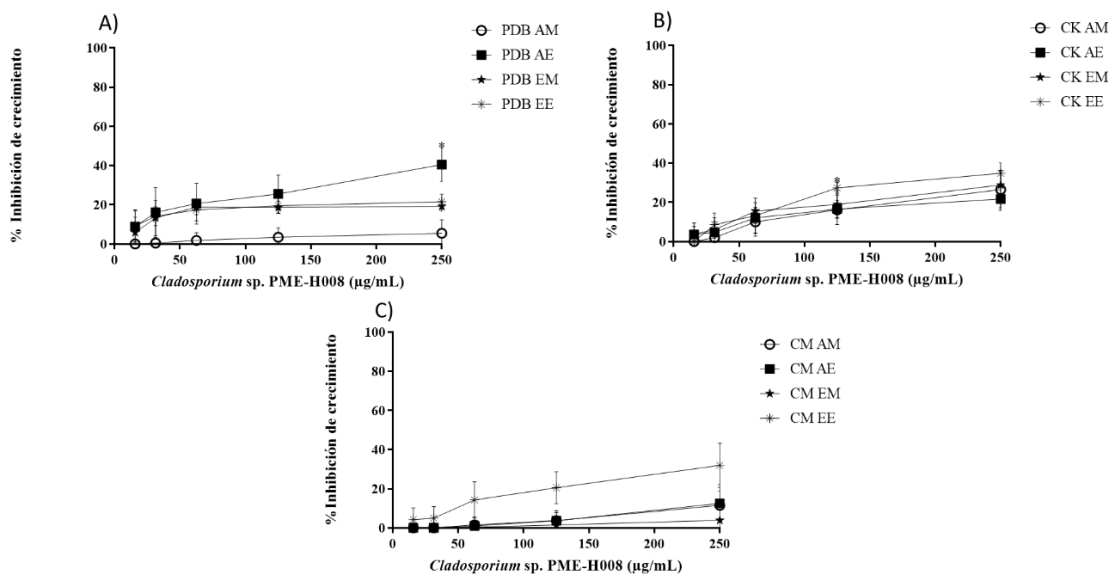


Figura 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos metanólicos de la cepa PME-H008 en diferentes condiciones de cultivo. A) PDB. B) CK. C) CM. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control no tratado. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

Table 12. IC₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y PBMCs; índice de selectividad y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.

Cepa	Medio	Inóculo	Agitación	L5178Y-R IC ₅₀	PBMCs IC ₅₀	IS*	DPPH IC ₅₀
<i>P. citrinum</i> PME-H002	PDB	Espora	150 rpm	234±1.5c	>250	>1	>250
	CK	Espora	150 rpm	185.8±1.5bc	>250	>1.3	>250
<i>A. versicolor</i> PME-H005	PDB	Micelio	150 rpm	123.5±1.3ab	>250	>2	>250
	PDB	Micelio	Estático	203.2±1.3bc	>250	>1.2	>250
	CM	Micelio	Estático	69.67±1.5a	>250	>3.5	>250
	CM	Espora	Estático	49.62±1.8a	>250	>5	>250
	PDB	Micelio	150 rpm	84.56±1.5a	>250	>2.9	>250

*IS = IC₅₀ de PBMCs/IC₅₀ de la línea de linfoma. Los valores con letras diferentes dentro de las columnas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey. PDB: Caldo de papa y dextrosa. CK: Caldo Czapek. CM: Caldo de malta.

7.2.2.2 Extractos de acetato de etilo

La obtención de los extractos de acetato de etilo solo fue realizada para las cepas de *A. versicolor* y *M. anisopliae*. Los rendimientos registrados, así como la cantidad de extracto seco obtenido se compararon con las condiciones iniciales (control) que se utilizaron para la fermentación de los hongos (PDB AM) (Figura 14 y 15). Ambas variables se comportaron de forma proporcional. Los extractos de acetato de etilo presentaron rendimientos y cantidad de extracto seco mucho menores en comparación con los extractos metanólicos. Se encontró que para la cepa PME-H005 el mayor rendimiento ($p < 0.01$) se obtuvo con el medio PDB en agitación inoculado con esporas (AE) con 0.028% y 35 mg de extracto seco (Figura 14A y 15A). Para PME-H007 la inoculación en el medio CM aumentó el rendimiento y la cantidad de extracto de forma significativa ($p < 0.01$) independientemente del tipo de inóculo con valores mayores al 0.04% y 50 mg (Figura 14B y 15B). Se encontró que para la cepa de *M. anisopliae* existe una correlación positiva débil entre el rendimiento de los extractos y su actividad biológica ($R = 0.629$).

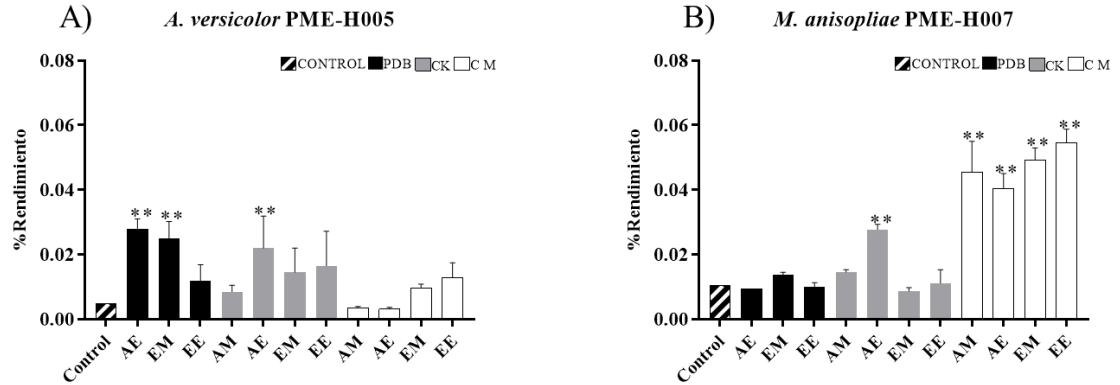


Figura 14. Rendimiento (%) de extractos de acetato de etilo de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo. A) PME-H005. B) PME-H007. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control (PDB AM). PDB: Caldo de papa y dextrosa. CK: Caldo Czapek. CM: Caldo de malta. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

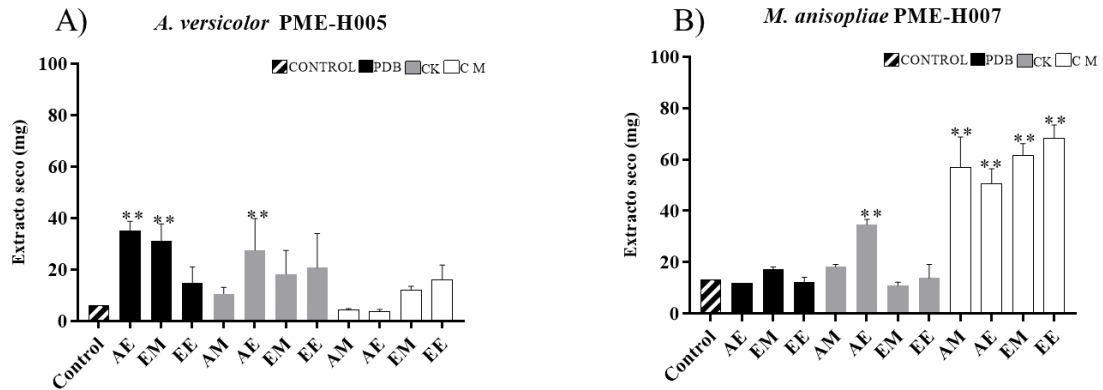


Figura 15. Peso seco de extractos de acetato de etilo de cepas de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo. A) PME-H005. B) PME-H007. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control (PDB AM). PDB: Caldo de papa y dextrosa. CK: Caldo Czapek. CM: Caldo de malta. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: estático e inoculado con micelio. EE: estático e inoculado con esporas.

La evaluación de la inhibición de crecimiento de extractos de acetato de etilo contra el linfoma se realizó de la misma manera que con los extractos metanólicos, pero utilizando concentraciones más bajas (0.04 a 250 $\mu\text{g/mL}$). Se encontró que todos los extractos inhibieron de forma dependiente a la dosis al igual que con los extractos metanólicos (Figura 16 y 17). Los extractos de acetato de etilo presentaron en general mayor actividad anticancerígena en comparación con los metanólicos. Los valores IC_{50} , así como el IS de los extractos con mayor actividad ($\text{IC}_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$) se observan en la Tabla 13. Se seleccionaron un total de 13 extracto de los 24 evaluados para determinar la inhibición en células sanas (PBMCs) y la actividad antioxidante. Se observó que para *A. versicolor* la combinación de factores influye en la actividad. El valor IC_{50} más bajo fue de 6.9 $\mu\text{g/mL}$ con una $\text{IS} > 35.9$ cuando se cultivó en medio CK inoculado con micelio en agitación (AM), alcanzando una inhibición de 86.5 % de las células de linfoma a la concentración más alta evaluada (Figura 16B). Para *M. anisopliae* se encontró que la agitación aumenta la actividad anticancerígena de los extractos de forma significativa ($p = 0.041$). Donde el extracto con mayor actividad presentó un valor IC_{50} 4.2 $\mu\text{g/mL}$ con una $\text{IS} > 59.5$, que corresponde al cultivo del hongo en medio CK de forma estática inoculado con micelio (EM), con el cual se obtuvo una inhibición máxima de la línea tumoral del 79% (Figura 17B). Con respecto a la actividad antioxidante se encontró que solo dos de los trece extractos evaluados presentaron una inhibición considerable del radical DPPH ($\text{IC}_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$). Para *A. versicolor* se obtuvo un valor IC_{50} de 246.9 $\mu\text{g/mL}$ cuando se inoculo el hongo en medio CM de forma estática inoculado con esporas (EE), mientras que para *M. anisopliae* el medio PDB inoculado con micelio sin agitación (EM) favoreció la producción de compuestos antioxidantes ($\text{IC}_{50} = 117.3 \mu\text{g/mL}$) (Tabla 13).

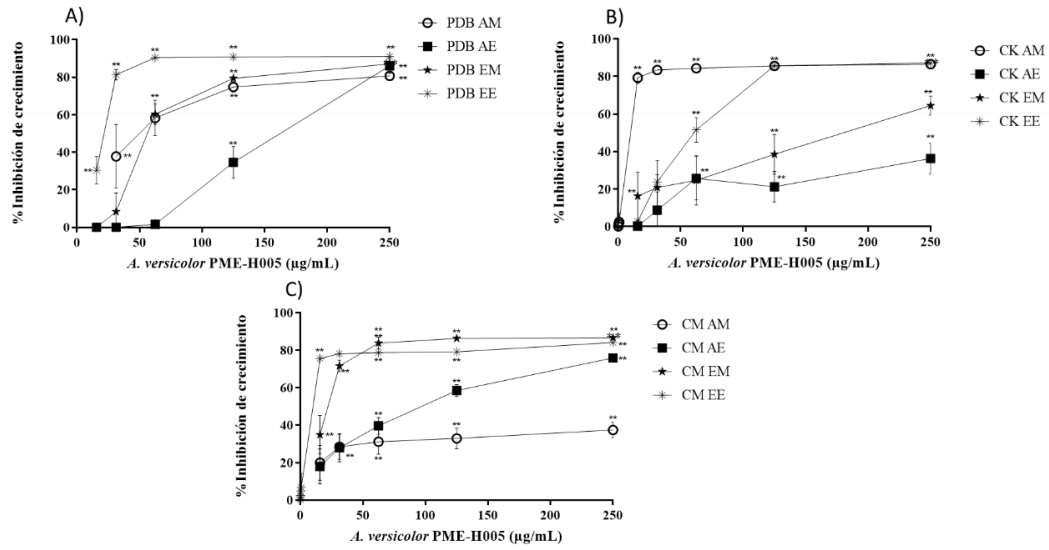


Figura 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos de acetato de etilo de la cepa PME-H005 en diferentes condiciones de cultivo. A) PDB. B) CK. C) CM. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control no tratado. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

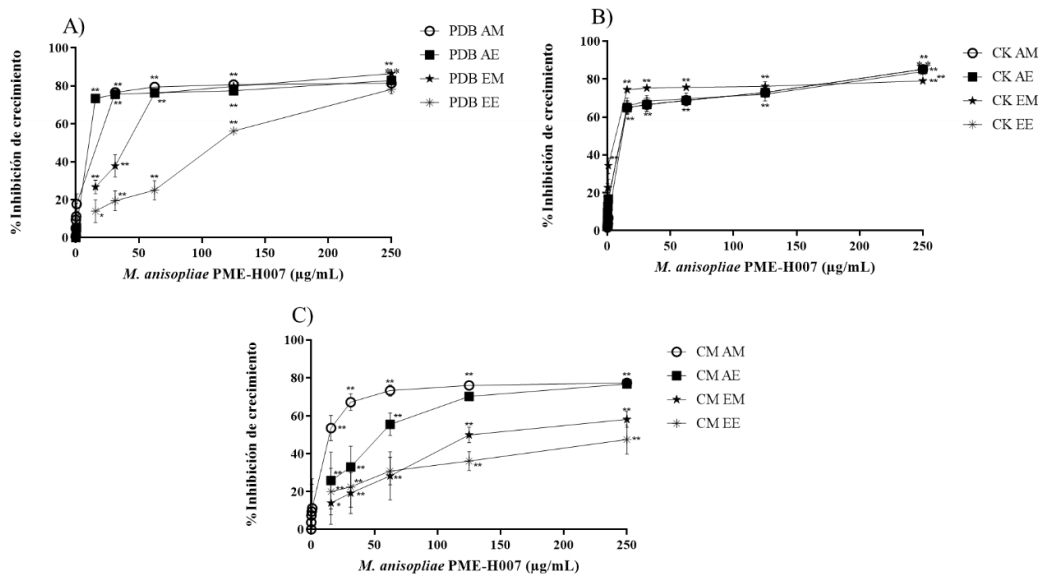


Figura 17. Porcentaje de inhibición de crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R con extractos de acetato de etilo de la cepa PME-H007 en diferentes condiciones de cultivo. A) PDB. B) CK. C) CM. Los datos representan la media \pm SD de tres repeticiones y tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante la prueba de Dunnet, comparado con el control no tratado. AM: Agitación e inoculado con micelio. AE: Agitación e inoculado con esporas. EM: Estático e inoculado con micelio. EE: Estático e inoculado con esporas.

Tabla 13. IC₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y PBMCs; índice de selectividad y actividad antioxidante de extractos de acetato de etilo de hongos endófitos en diferentes condiciones de cultivo.

Cepa	Medio	Inóculo	Agitación	L5178Y-R IC ₅₀	PBMCs IC ₅₀	IS*	DPPH IC ₅₀
<i>A. versicolor</i> PME-H005	PDB	Micelio	150 rpm	47.7±1.3c	>250	>5.2	>250
	PDB	Espora	Estático	20.2±1.7b	119.7±1.3ab	5.9	>250
	CK	Micelio	150 rpm	6.9±1.3a	>250	>35.9	>250
	CM	Micelio	Estático	20.5±1.4b	141.8±1.5b	6.8	>250
	CM	Espora	Estático	7.9±1.3a	165.4±1.6b	20.8	246.9±1.9
<i>M. anisopliae</i> PME-H007	PDB	Micelio	150 rpm	6.6±1.3a	156.2±1.4b	18.9	>250
	PDB	Espora	150 rpm	9.3±1.2ab	>250	>26.8	>250
	PDB	Micelio	Estático	36.7±1.6c	>250	>6.8	117.3±1.9
	CK	Micelio	150 rpm	13.4±1.3ab	65.98±1.4a	4.8	>250
	CK	Espora	150 rpm	10.3±1.3ab	>250	>24.2	>250
	CK	Micelio	Estático	4.2±1.2a	>250	>59.5	>250
	CK	Espora	Estático	10.8±1.3ab	>250	>23.1	>250
CM	Micelio	150 rpm	13.9±1.2ab	>250	>17.9	>250	

*IS = IC₅₀ de PBMCs/IC₅₀ de la línea de linfoma. Los valores con letras diferentes dentro de las columnas son significativamente diferentes (p ≤ 0.05) utilizando la prueba de Tukey. PDB: Caldo de papa y dextrosa. CK: Caldo Czapek. CM: Caldo de malta.

7.2.3 Escalamiento de la producción para la obtención de extractos

El escalamiento para la producción de hongos se realizó con las cepas *A. versicolor* PME-H005 y *M. anisopliae* PME-H007 por presentar mayor actividad contra el linfoma. Consistió en fermentar los hongos en matraces de 2 L con 1 L de medio. La cepa *A. versicolor* se cultivó en medio CM inoculado con micelio y mantenido de forma estática de 7 a 14 días. Mientras que para *M. anisopliae* la fermentación se realizó en PDB utilizando micelio como inóculo en agitación (150 rpm). Para la obtención de los extractos metanólicos se utilizó extracción mediante Soxhlet. Se encontró que los extractos mantuvieron la actividad anticancerígena al realizarse el escalamiento a excepción del extracto metanólico de *M. anisopliae* el cual presentó una $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 14).

Tabla 14. IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de inhibición de crecimiento de linfoma y rendimiento (%) de extractos *A. versicolor* y *M. anisopliae* producidos a mayor escala.

Cepa	Extracto	Rendimiento (%)	L5178Y-R IC_{50}	PBMCs IC_{50}	IS*
<i>A. versicolor</i> PME-H005	Acetato de etilo	0.008	21.7±1.5a	126.1±1.4b	6.3
	Metanol	26.3	86.8±1.2b	>250	>2.7
<i>M. anisopliae</i> PME-H007	Acetato de etilo	0.015	8.2±1.4a	206.9±1.9c	25.2
	Metanol	20.4	>250	-	-

*IS = IC_{50} de PBMCs/ IC_{50} de la línea de linfoma. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

7.2.4 Evaluación de diferentes solventes

El cultivo de los hongos se realizó como se menciona en la sección 7.2.3. Los extractos metanólicos de *A. versicolor* y *M. anisopliae* se sometieron a particiones mediante Soxhlet para determinar con que solvente se obtenía el extracto con mayor actividad. Se encontró que para *A. versicolor* la partición de cloroformo presentó la IC₅₀ más baja con 43.5 µg/mL. Sin embargo, se seleccionó la partición hexánica (IC₅₀=61 µg/mL) para continuar con la producción a mayor escala debido a que no presentó diferencias significativas con la partición de cloroformo y el rendimiento era superior. Mientras que para *M. anisopliae* solo la partición hexánica presentó buena actividad (IC₅₀=74.3 µg/mL) (Tabla 15).

Tabla 15. IC₅₀ (µg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y rendimiento (%) de extracciones al implementar diferentes solventes en cultivos líquidos de *A. versicolor* y *M. anisopliae*.

Extracto	<i>A. versicolor</i> PME-H005		<i>M. anisopliae</i> PME-H007	
	L5178Y-R IC ₅₀	Rendimiento (%)	L5178Y-R IC ₅₀	Rendimiento (%)
Partición hexano	61±1.3ab	27.8	74.3±1.5b	16
Partición cloroformo	43.5±1.4a	3.1	>250	1.3
Partición metanólica	>250	35.6	>250	58.2

Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

7.2.5 Evaluación de diferentes técnicas de extracción

El cultivo de los hongos se realizó como se menciona en la sección 7.2.3. La producción de los extractos obtenidos a partir de la biomasa se realizó utilizando hexano. Se evaluaron dos técnicas de extracción la maceración en frío y la extracción por Soxhlet que implica aumento de la temperatura en el proceso (60 °C). Esto con la finalidad de determinar si los metabolitos presentes en los extractos se ven afectados por la temperatura. Se encontró que para *A. versicolor* se obtuvo mayor actividad de forma significativa ($p = 0.023$) y el doble de rendimiento al utilizar Soxhlet para la extracción, mientras que para *M. anisopliae* se obtuvo mayor actividad de forma altamente significativa ($p > 0.01$) al utilizar maceración, pero se obtuvo menor rendimiento (Tabla 16).

Tabla 16. IC₅₀ (μg/mL) de inhibición de crecimiento de linfoma y rendimiento (%) de extractos hexánicos de *A. versicolor* y *M. anisopliae* al utilizar diferentes técnicas de extracción.

Cepa	<i>A. versicolor</i> PME-H005		<i>M. anisopliae</i> PME-H007	
	L5178Y-R IC ₅₀	Rendimiento (%)	L5178Y-R IC ₅₀	Rendimiento (%)
Maceración	21.6±1.6c	4.5	4±1.6a	3.4
Soxhlet	16.6±1.8b	9	18.6±1.7bc	5.8

Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

7.2.6 Evaluación de lotes producidos a mayor escala

El cultivo de los hongos se realizó como se mencionó en la sección 7.2.3. Para la producción de lotes a mayor escala se obtuvieron extractos de acetato de etilo y hexano. Se implementó la técnica de extracción Soxhlet para los extractos hexánicos de *A. versicolor* y maceración para *M. anisopliae*. Se evaluó la inhibición de crecimiento de los extractos en células tumorales y sanas, así como actividad antioxidante (DPPH), actividad hemolítica y anti hemolítica (Tabla 17). La mejor actividad anticancerígena se obtuvo con los extractos de acetato de etilo de las dos cepas con $IC_{50} < 13 \mu\text{g/mL}$ y valor IS >19 , presentaron actividad antioxidante ($IC_{50} < 140 \mu\text{g/mL}$), no se observó actividad hemolítica a concentraciones de $800 \mu\text{g/mL}$ y mostraron efecto protector en los eritrocitos a concentraciones menores a $27 \mu\text{g/mL}$. Mientras que los extractos hexánicos presentaron hemólisis de los eritrocitos a concentraciones $< 83 \mu\text{g/mL}$ por lo que se descartaron para los experimentos posteriores.

Tabla 17. Rendimiento y actividad biológica de extractos de *A. versicolor* y *M. anisopliae*.

Cepa	<i>A. versicolor</i> PME-H005		<i>M. anisopliae</i> PME-H007	
	Hexano	Acetato de etilo	Hexano	Acetato de etilo
Rendimiento (%)	4.2	0.002	2.1	0.010
L5I78Y-R IC_{50}^{*a}	58.4±1.5c	12.9±1.6a	39.2±1.7b	6.4±0.8a
PBMC IC_{50}^{*b}	180.8±1.5a	>250	147±1.5a	>250
IS	3	>19.2	3.7	>39
DPPH IC_{50}^{*b}	>250	140.2±1.4a	>250	111.7±1.5a
Hemólisis IC_{50}^{*b}	83.28±1.9a	>800	84.89±1.4a	>800
Anti- hemólisis IC_{50}^{*b}	>250	11.5±1.6a	>250	26.4±1.6b

* IC_{50} en $\mu\text{g/mL}$. ^a Los valores con letras diferentes entre las filas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey. ^b Los valores con letras diferentes entre las filas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de *t* de Student.

7.3 Caracterización de extractos con mayor actividad

Se seleccionaron los extractos de acetato de etilo de las cepas *A. versicolor* PME-H005 y *M. anisopliae* PME-H007 por presentar mayor inhibición de crecimiento en células tumorales, con IS > 10, por no presentar hemólisis y tener efecto hemo protector.

7.3.1 Prueba de solubilidad

Los resultados de las pruebas de solubilidad de los extractos de acetato de etilo se observan en la Tabla 18. Ambos extractos se comportaron de forma muy parecida, fueron solubles en cloroformo, acetato de etilo y metanol (Figura 18). Por lo que estos solventes fueron seleccionados para realizar el fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna.

Tabla 18. Resultados de las pruebas de solubilidad de extractos de acetato de etilo.

Solvente	<i>A. versicolor</i> PME-H005		<i>M. anisopliae</i> PME-H007	
	Solubilidad	Observaciones	Solubilidad	Observaciones
Hexano	No	Ninguna	No	Ninguna
Cloroformo	Si	Ligero precipitado rojizo	Si	Ligero precipitado café
Acetato de etilo	Si	Ligero precipitado rojizo	Si	Ninguna
Metanol	Si	Ninguna	Si	Ligero precipitado blanco
Agua	No	Ninguna	No	Ninguna

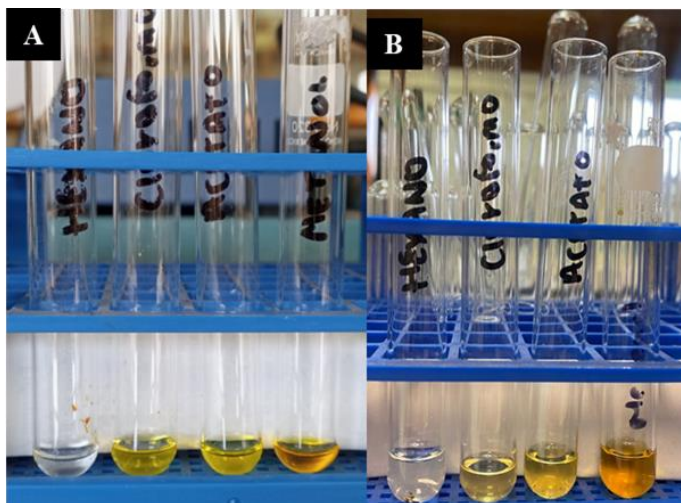


Figura 18. Solubilidad de extractos de acetato de etilo. A) *A. versicolor*. B) *M. anisopliae*.

7.3.2 Fraccionamiento por cromatografía en columna

Los extractos secos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* fueron disueltos en acetato de etilo y se sometieron a una cromatografía en capa fina (CCF) para ver la distribución de los compuestos en los extractos crudos. Se obtuvo el *R_f* de los compuestos observados en luz visible, revelados con luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm), así como yodo (Tabla 19 y Figura 19).

Tabla 19. *R_f* calculado de extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* en luz visible, UV 254 nm, UV 365 nm y yodo.

Cepa	Eluente	Luz visible	UV 254 nm	UV 365 nm	Yodo
		0.8823	0.8823	0.8823	0.8823
		0.3411	0.8352	0.8352	0.8352
		-	0.7764	0.7764	0.7764
		-	0.0352	0.7411	0.6941
<i>A. versicolor</i>	Acetato de etilo	-	-	0.6941	0.6470
PME-H005	100%	-	-	0.6470	0.3411
		-	-	0.3411	0.0823
		-	-	0.2470	0.0352
		-	-	0.0823	-
		-	-	0.0352	-
		-	0.9523	0.9523	0.9523
		-	0.2321	0.8452	0.4940
<i>M. anisopliae</i>	Cloroformo/	-	0.5238	0.7916	0.4285
PME-H007	acetato de etilo	-	-	0.75	0.375
	50%/50%	-	-	0.3452	0.3452
		-	-	0.2023	0.2261
		-	-	0.1130	0.2023

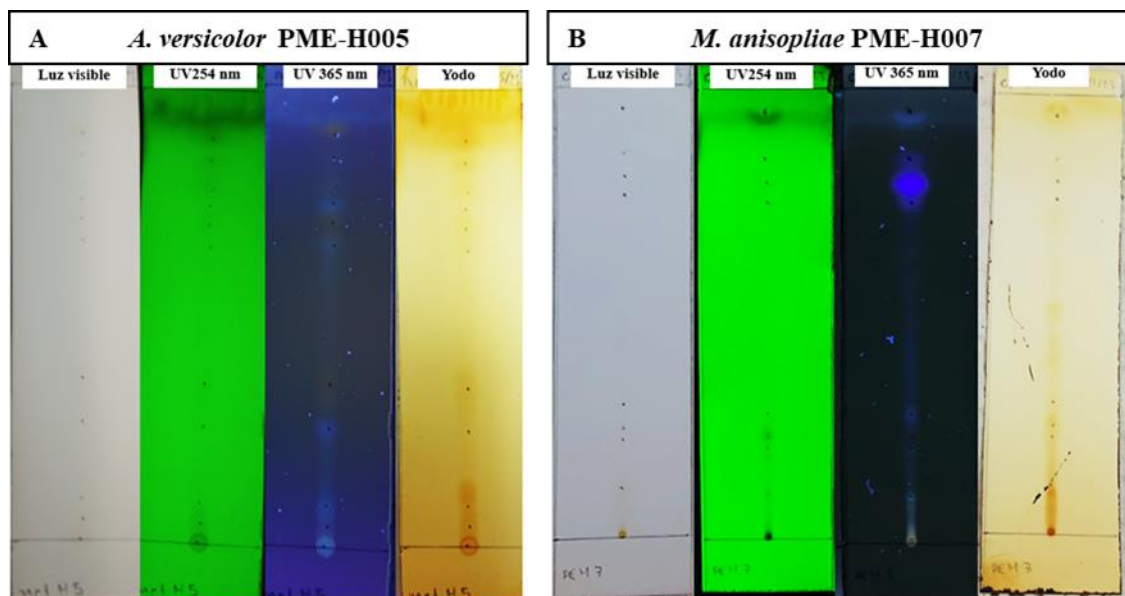


Figura 19. CCF de extractos crudos de acetato de etilo. Los cromatogramas se revelaron con luz visible, UV 254 nm, UV 365 nm y yodo. A) *A. versicolor*. B) *M. anisopliae*.

Se realizaron dos cromatografías en columna por extracto, procesándose en total 1 g de cada muestra. Se obtuvieron 94 fracciones por columna y se realizó CCF de 27 fracciones utilizando diferentes eluentes. De acuerdo con la distribución de los metabolitos observados en las cromatoplasas se seleccionaron las fracciones con mayor parecido y se conjuntaron para establecer un total de 6 fracciones colectivas (FC). Se determinó el rendimiento (%) de cada FC y se realizaron CCF para poder observar lo metabolitos y registrar los valores R_f presentes en luz visible, UV 254 y 365 nm, así como yodo (Tabla 20 y Figura 20). Para las muestras de *A. versicolor* se obtuvieron rendimientos de 10.2%-22%. Mientras que para *M. anisopliae* fue de 5.1% a 34.5 % (Tabla 20).

Tabla 20. *Rf* calculado de fracciones colectivas de extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* en luz visible, 254 nm, 365 nm y yodo utilizando como eluente acetato de etilo 100%.

Fracciones colectivas	Rendimiento (%)	Luz visible <i>Rf</i>	UV 254 nm <i>Rf</i>	UV 365 nm <i>Rf</i>	Yodo <i>Rf</i>
<i>A. versicolor</i> PME-H005					
1 – 18 (FC-1)	4.4	-	0.8690	0.8690	0.8690
19-32 (FC-2)	10.2	0.8928, 0.8571	0.8928, 0.8571	0.8928, 0.8571, 0.7857, 0.6547, 0.3333, 0.0476	0.8928, 0.8571, 0.7857, 0.6547, 0.3333, 0.0476
32-49 (FC3)	21.5	0.8928, 0.8571, 0.7619, 0.6904, 0.6309, 0.5297, 0.4880	0.8928, 0.8571, 0.7619, 0.6904, 0.6309, 0.5297, 0.4880	0.8928, 0.8571, 0.7619, 0.6904, 0.6309, 0.5297, 0.4880, 0.4583	0.8928, 0.8571, 0.7619, 0.6904, 0.6309, 0.5297, 0.4880, 0.4583
47-55 (FC4)	12.8	0.8571, 0.7738, 0.6904, 0.5238, 0.3869, 0.1904	0.6309, 0.5238, 0.3869, 0.1904	0.8571, 0.7738, 0.6904, 0.5238, 0.3869, 0.1904	0.8571, 0.7738, 0.6904, 0.6309, 0.5238, 0.3869, 0.1904
56-60 (FC5)	18.9	0.5238, 0.3214, 0.2619, 0.2321, 0.1785, 0.1428	0.5238, 0.3214, 0.1428	0.5238, 0.3273, 0.2619, 0.2321, 0.1785, 0.1428	0.5238, 0.3273, 0.2619, 0.2321, 0.1785, 0.1428
59-94 (FC6)	22	0.5238, 0.1666, 0.0773	0.5238, 0.2321	0.5238, 0.3273, 0.1666, 0.0773	0.5238, 0.1666, 0.0773
<i>M. anisopliae</i> PME-H007					
1-19 (FC1)	6.5	-	0.8333	0.8333	0.8333
19-21 (FC2)	5.1	-	0.9226	0.9226	0.9226, 0.8690
22-35 (FC3)	9.3	-	0.9047, 0.8214, 0.7857, 0.7142	0.9047, 0.8214, 0.7857, 0.7142	0.7976
36-45 (FC4)	10.8	-	0.9166, 0.8154, 0.7440, 0.4523	0.8511, 0.8154, 0.5773, 0.4523	0.75, 0.6845, 0.625, 0.5773
3-59 (FC5)	34.5	-	0.1607	0.6190, 0.4285, 0.1607	0.1428
60-94 (FC6)	16.7	-	-	-	-

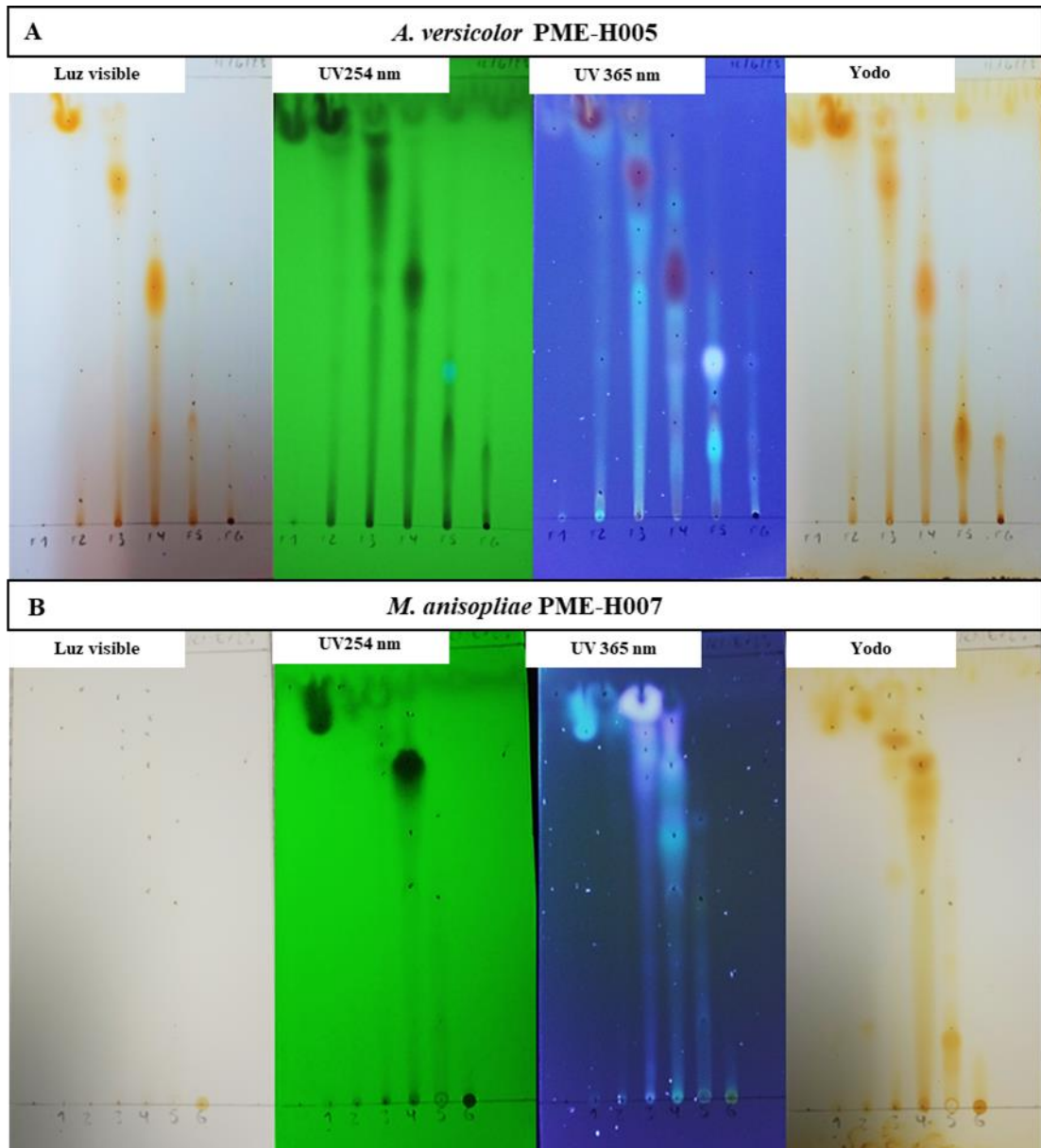


Figura 20. CCF de fracciones colectivas. Los cromatogramas se revelaron con luz visible, UV 254 nm, UV 365 nm y yodo A) *A. versicolor*. B) *M. anisopliae*.

7.3.3 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones colectivas

Se evaluó la inhibición de crecimiento de las FC de *A. versicolor* y *M. anisopliae* en células tumorales y sanas. Se encontró que para *A. versicolor* la FC-2 fue la que presentó mayor actividad con IC₅₀ de 8.5 µg/mL y un IS > 29.4. Mientras que para *M. anisopliae* la FC-5 fue la mejor con IC₅₀ de 6.8 µg/mL y un valor IS > 36.3 (Tabla 21).

Tabla 21. Rendimiento y valor IC₅₀ (µg/mL) de inhibición de crecimiento en células tumorales y sanas de fracciones colectivas.

Cepa	Prueba	FC-1	FC-2	FC-3	FC-4	FC-5	FC-6
<i>A. versicolor</i> PME-H005	L5178Y-R IC ₅₀	38.4±1.1ab	8.5±1.4a	126.9±1.4c	62.8±1.5b	134.4±1.3c	17.2±0.9ab
	PBMC IC ₅₀	192.2±1.3	>250	>250	>250	>250	>250
	IS	5	>29.4	>1.9	>3.9	>1.8	>14.5
<i>M. anisopliae</i> PME-H007	L5178Y-R IC ₅₀	>250	29.6±1.4ab	36±1.5b	26.9±1.5ab	6.8±0.5a	126.6±1.5c
	PBMC IC ₅₀	-	>250	>250	>250	>250	>250
	IS	-	>8.4	>6.9	>9.2	>36.3	>1.9

Los valores con letras diferentes entre las filas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

Para la evaluación de la actividad antioxidante, hemolítica y anti hemolítica se seleccionó una de las FC de cada cepa de hongo que presentaron mayor actividad selectiva contra el linfoma. Con respecto a la actividad antioxidante (DPPH) ninguno de los extractos evidenció un resultado favorable. Las dos FC presentaron valores IC₅₀ iguales para la actividad hemolítica (> 500 µg/mL) y anti hemolítica (< 31.25 µg/mL). Sin embargo, a la concentración de 500 µg/mL la FC-2 de *A. versicolor* hemolizó al 24.1% de los eritrocitos, mientras que la FC-5 de *M. anisopliae* no presentó hemólisis a esa concentración (Tabla 22).

Tabla 22. IC₅₀ (µg/mL) de actividad antioxidante (DPPH), hemolítica y anti hemolítica de fracciones colectivas.

Cepa	<i>A. versicolor</i> PME-H005	<i>M. anisopliae</i> PME-H007
Fracción colectiva	FC-2	FC-5
DPPH IC ₅₀	> 250	>250
Hemólisis IC ₅₀	> 500	>500
% Hemólisis (500 µg/mL)	24.1±0.7	0
Anti- hemólisis IC ₅₀	< 31.25	< 31.25

7.3.4 Identificación de compuestos mediante LC-MS²

La FC-2 de *A. versicolor* y FC-5 de *M. anisopliae* fueron seleccionadas por su actividad para ser caracterizadas mediante LC-MS². Para la FC-2 se detectaron un total 495 picos en MS² de los cuales 248 se clasificaron de acuerdo con sus categorías químicas utilizando la herramienta ClassyFire. Mientras que para FC-5 se detectaron 54 picos y se categorizaron 13 (Figura 21). Encontrado que para ambas FC la clase química mayoritaria eran los ácidos carboxílicos y derivados, la FC-2 con 50.8% y FC-5 con 46.6%. La FC-2 presentó mayor diversidad de clases químicas (12) en comparación con la FC-5 (5).

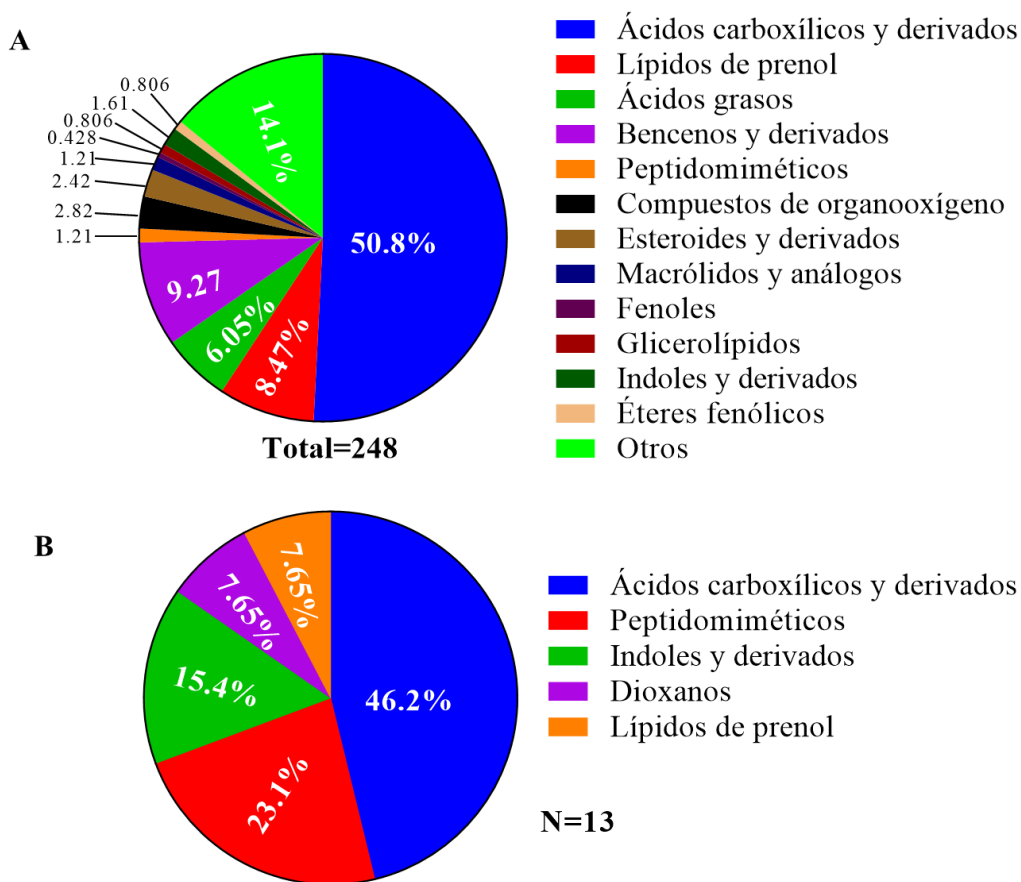


Figura 21. Clases químicas asignadas a los metabolitos identificados en las muestras. La gráfica de pastel muestra el porcentaje de las clases químicas a las que pertenecen los picos identificados en LC-MS². A) FC-2 de *A. versicolor*. B) FC-5 de *M. anisopliae*.

Los cromatogramas de iones totales (TIC) para las dos muestras procesadas se observan en la Figura 22. Para la FC-2 se identificaron a nivel estructural 35 compuestos mediante anotación estructural por comparación de los espectros en bibliotecas públicas y herramientas *in silico*. Mientras que para la FC-5 se identificaron 13 compuestos. Se realizó una búsqueda en la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> revisado 23 de septiembre de 2023) para determinar la actividad biológica de los compuestos identificados. En la Tabla 23 y 24 se observan solo los compuestos presentes en las FC-2 y FC-5 que tienen reportes de su efecto biológico.

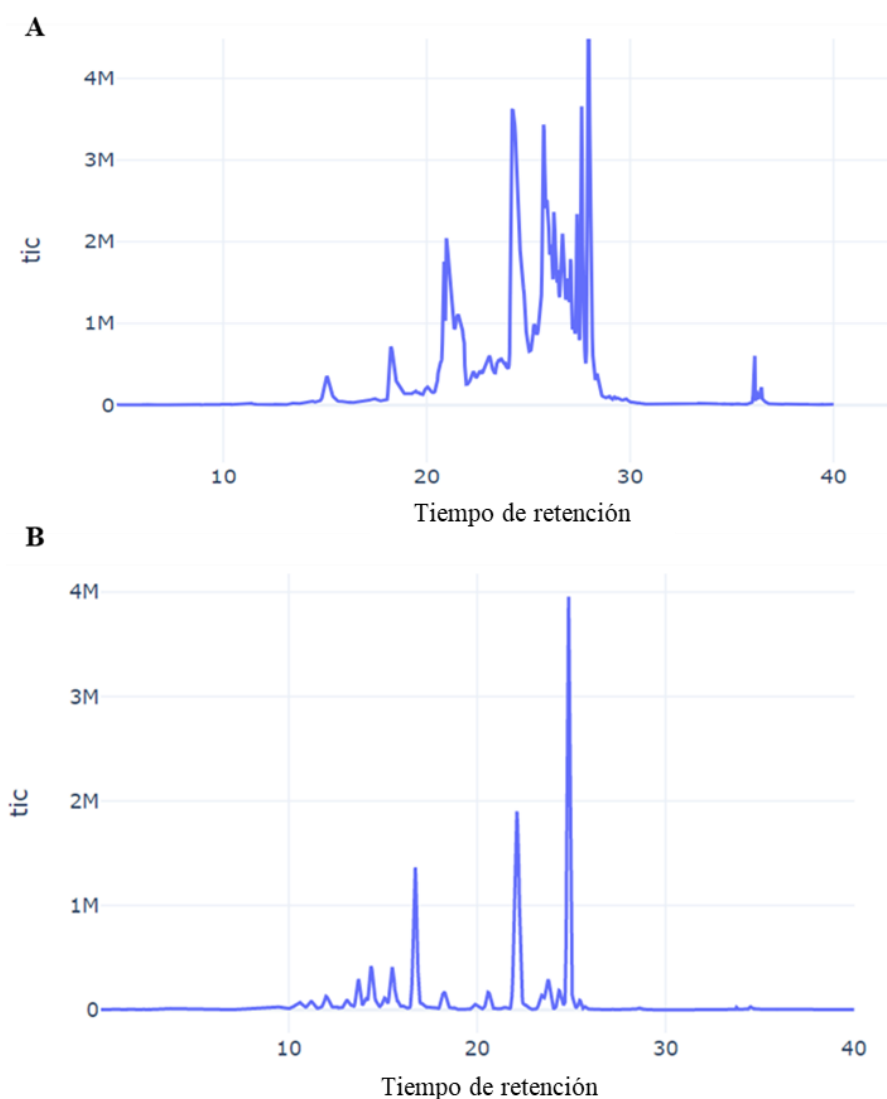
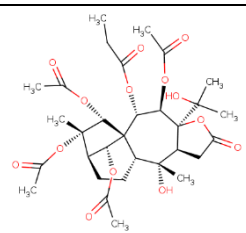
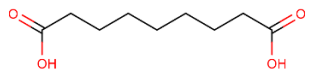
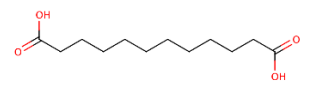
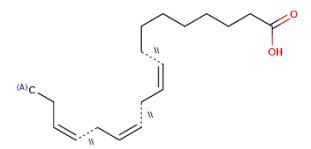
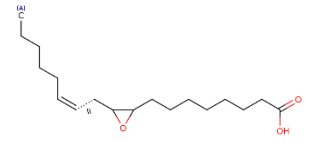
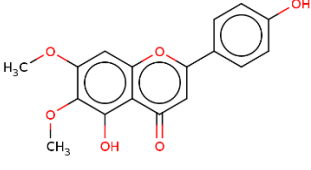
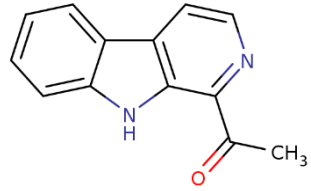
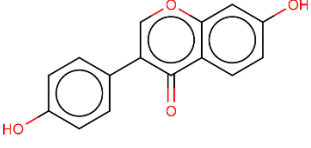
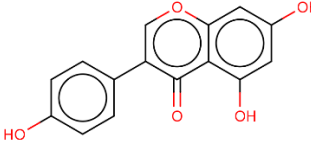
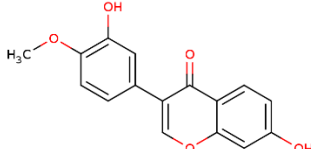
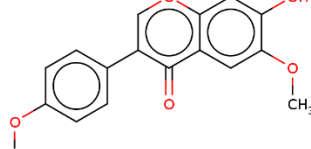
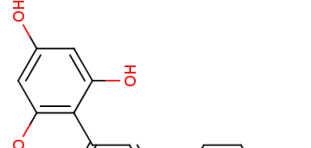
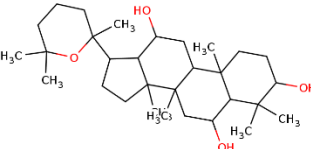
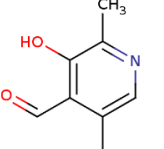
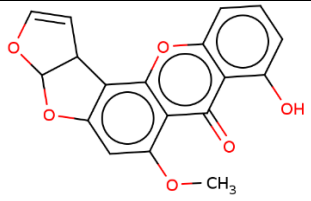
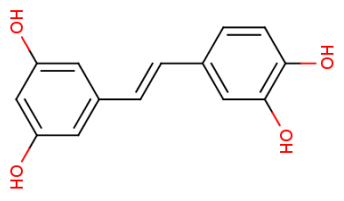


Figura 22. Cromatograma TIC. Los cromatogramas muestran la abundancia relativa y el tiempo de retención de los metabolitos presentes en las muestras analizadas por LC-MS². A) FC-2 de *A. versicolor*. B) FC-5 *M. anisopliae*.

Tabla 23. Lista de metabolitos anotados, reportados con actividad biológica de la FC-2 de *A. versicolor* PME-H005.

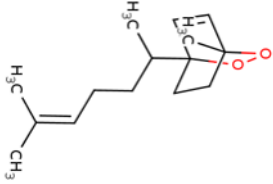
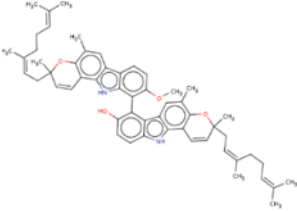
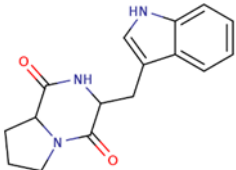
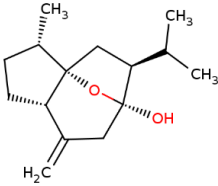
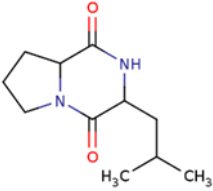
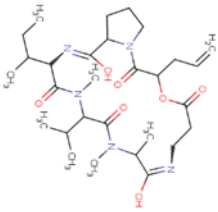
Nombre del compuesto	Masa teórica	Clase química	Actividad biológica*	Estructura putativa
Pierisformotoxina B	641.2	Ácidos carboxílicos y derivados	Regulación de AMPc	
Ácido azelaico	171.1	Acilos grasos	Antimicrobiano, antiinflamatorio, anticancerígeno	
Ácido dodecanodioico	213.1	Acilos grasos	Inhibidor de alcohol deshidrogenasa	
Ácido linolénico	279.2	Acilos grasos	Antitrombótico, macronutriente	
Ácido coronarico	297.2	Acilos grasos	Inhibidor del regulador de la señalización de la proteína G	
Cirsimaritina	315	Flavonoides	Inhibición de DPP4 porcina	
1-Acetil-beta-carbolina	211	Alcaloides harmala	Antiinflamatoria	

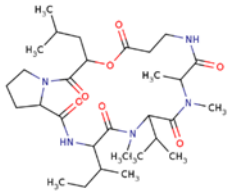
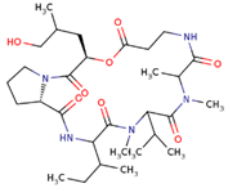
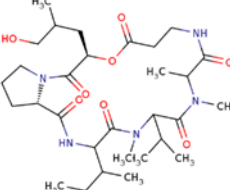
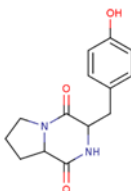
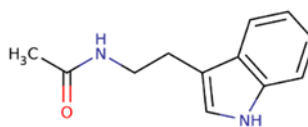
Daidzeína	255	Isoflavonoides	Antineoplásico, fitoestrógeno, metabolito vegetal	
Genisteína	271	Isoflavonoides	Antioxidante, antineoplásico, fitoestrógeno, inhibidor de la tirosina quinasa	
Calicosina	285	Isoflavonoides	Antioxidante, actividad estrogénica, anticáncer	
Afromosina	299.09132 4	Isoflavonoides	Anticáncer, antiinflamatoria	
Chalcona de naringenina	273	1,3- diarilpropanoides lineales	Antialérgico, antiinflamatorio, anticáncer	
Panaxatriol	459.3	Lípidos prenoles	Anticáncer	
Piridoxal	168	Piridinas y derivados	Coenzima	

Esterigmatocistina	325	Esterigmatocistina	Anticancerígeno, micotoxina cancerígena	
Piceatannol	245	Estilbenos	Inhibidor de quinasas, antineoplásico, hipoglucemiante , antioxidante	

* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> revisado 23 de septiembre de 2023.

Tabla 24. Lista de metabolitos anotados, reportados con actividad biológica de la FC-5 de *M. anisopliae* PME-H007.

Nombre del compuesto	Masa teórica	Clase química	Actividad biológica*	Estructura putativa
Bisaboleno-1,4-endoperóxido	219.1	Dioxanos	Anticáncer	
Bisgerayafolina A	815.4	Indoles y derivados	Antioxidante del óxido nítrico, quelación de metales	
Brevianamida F	284.1	Ácidos carboxílicos y derivados	Síntesis de triptófano	
Curcumol	219.1	Lípidos de prenol	Anticáncer	
Ciclo (Pro-Leu)	211.1	Ácidos carboxílicos y derivados	Inhibición de deubiquitinación	
Ciclo (Pro-Val)	197.1	Ácidos carboxílicos y derivados	Antifúngico	

Destruxina A	578.3	Peptidomiméticos	Insecticida	
Destruxina B	594.4	Peptidomiméticos	Anticáncer, insecticida	
Destruxina C	610.4	Peptidomiméticos	Insecticida	
Maculosina	261.1	Ácidos carboxílicos y derivados	Anticáncer, insecticida, Antioxidante	
N- acetiltriptamina	203.1	Indoles y derivados	Agonista de receptores de melatonina	

*<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> revisado 23 de septiembre de 2023.

8. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales albergan hongos endofíticos con el potencial de generar productos farmacéuticamente relevantes (De Carvalho et al. 2019), esto debido a la interacción metabólica continua entre el hongo y la planta. Esta interacción puede dar lugar a la producción de compuestos similares que siguen vías metabólicas análogas. Por lo tanto, es crucial seleccionar cuidadosamente las especies de plantas para aislar hongos endofíticos en la búsqueda de agentes bioactivos (Chandra 2012). Por lo que en el presente estudio se seleccionó a la cactácea *L. marginatus*, endémica de México, para la búsqueda de hongos endofitos con capacidad anticancerígena, debido a que se ha demostrado que esta especie de cactus presenta actividad antitumoral contra el linfoma murino *in vitro* e *in vivo* (Hernández-Martínez et al. 2016; Quintanilla-Licea et al. 2016; Gomez-Flores et al. 2019). Por otra parte, el estudio de los endofitos de esta especie y su actividad biológica no se ha realizado por otros grupos de trabajo.

Se encontró que la mayoría de los aislamientos se obtuvieron a partir del medio PDA, el cual es el más comúnmente utilizado para el aislamiento de los hongos endofitos (Dos Reis et al. 2022). En este estudio el uso de cuatro medios de cultivo distintos permitió el aislamiento de diferentes morfotipos, lo que concuerda con diferentes estudios que mencionan que el uso de diferentes medios es ideal para aumentar la diversidad y el número de taxones recuperados (Dos Reis et al. 2022; Mishra et al. 2021).

Entre los géneros que se lograron identificar molecularmente se encuentran *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium*, los cuales se encuentran comúnmente en plantas que habitan entornos áridos, como las cactáceas (Bezerra et al. 2013; Bezerra et al. 2017; Santos et al. 2015). Además, se identificó el género *Metarhizium* el cual se ha reportado como un endofito natural de plantas del género *Glycine* (Khan et al. 2012), *Taxus* (Liu et al. 2009), *Brassica*, *Secale* y *Avena* (Steinwender et al. 2015). Sin embargo, de acuerdo con la literatura consultada no se tienen reportes previos de su aislamiento de forma endofita en cactáceas.

Todas las especies de hongos que fueron identificadas en este estudio han sido reportadas como productoras de compuestos con actividad anticancerígena, lo que explica su potencial para inhibir el crecimiento de la línea celular de linfoma murino L5178Y-R. La especie *P. citrinum* se ha reportado con actividad anticancerígena contra diferentes líneas tumorales como A-549, Hela, HepG2, Caski, L5178Y, MOLT-4, MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 y MDA-MB identificándose diferentes compuestos responsables de la actividad como penicillocitrin A, citriquinochroman, citrinin, scalusamide A, perinadine A, Pencitrin y pencitrinol (Li et al. 2013; El-Neketi et al. 2013; Danagoudar et al. 2018; Mady et al. 2017; Hu et al. 2017).

Los hongos del género *Aspergillus* son considerados una fuente importante de compuestos bioactivos con actividad anticancerígena entre los que se encuentran los alcaloides, pironas, policétidos, lactonas, esteroides, xantonas, antraquinonas, terpenos, péptidos, depsipéptidos, péptidos cíclicos, citocalasinas, enzimas y proteínas (Nadumane et al. 2016). Entre las especies de este género se encuentra *A. versicolor* la cual se ha evaluado contra diferentes líneas tumorales como HCT-116, Hela, L5178Y, SK-MEL, KB, BT-549, SKOV-3, en donde los compuestos que se han identificado como responsables de la actividad son las avertoxinas B y C, aflaquinolonas, 4-carboxidiocriol, gerfelin, alternariol, así como la aspernólida L y M (El-Hawary et al. 2020).

La especie *M. anisopliae* se ha reportado con capacidad para la producción de compuestos anticancerígenos como el Taxol con rendimientos de 846.1 µg/L en medio líquido (Liu et al. 2009). Para el género *Cladosporium*, la especie *C. oxysporum* también se ha reportado como productora de Taxol con actividad contra la línea de cáncer de mama T47D con un valor IC₅₀ de 2.5 µM después de 24 h de incubación (Raj et al. 2014).

Se encontró que los extractos de acetato de etilo y metanólicos presentan mayor actividad contra el linfoma en comparación con los extractos acuosos, lo que concuerda con diferentes estudios en donde estos dos tipos de solventes orgánicos se utilizan comúnmente para la obtención de extractos crudos a partir del sobrenadante y la biomasa de los hongos endófitos (Dhayanithy et al. 2019; Khalil et al. 2020; Kjer et al. 2010).

Para que la producción de metabolitos secundarios a partir de los endófitos pueda ser viable en términos económicos, es necesario aumentar la actividad, así como el rendimiento de los compuestos bioactivos (Mohinudeen et al. 2019). Por lo que en este trabajo se evaluaron diferentes condiciones de fermentación y extracción, a partir de las cepas que presentaron mayor actividad biológica. Se comprobó que las condiciones de cultivo como el tiempo de fermentación, el medio de cultivo, tipo de inóculo y la agitación. Así como los solventes utilizados y el método de extracción tienen efecto en el rendimiento y la actividad de los extractos.

Al evaluar el tiempo de fermentación se observó que las cepas *P. citrinum* y *Cladosporium* sp. presentaron atenuación de la actividad anticancerígena lo que puede deberse al silenciamiento de genes relacionados con la producción de metabolitos, lo cual ha sido reportado ampliamente en los hongos endófitos (Naik 2019). Al cultivar a los hongos en diferentes condiciones de fermentación solo *P. citrinum* restableció su actividad, lo que concuerda con otros estudios que mencionan que la modificación de las condiciones de cultivo es una de las herramientas más simples y poderosas para activar grupos de genes que se encuentran silenciados (Pan et al. 2019).

Por otra parte, se sabe que la modificación de parámetros en el proceso de fermentación puede incrementar el crecimiento de las cepas fúngicas y los rendimientos de la extracción (Xu et al. 2018), sin embargo, esto no siempre se relaciona con el aumento de la actividad biológica (Zain et al. 2009). En nuestro estudio se observó una débil correlación entre el rendimiento y la actividad, solo para los extractos de acetato de etilo de la cepa *M. anisopliae*.

Los hongos endófitos son altamente sensibles a las variaciones en los nutrientes cuando se encuentran en condiciones de laboratorio (Hewage et al. 2014). La adaptación a estos cambios conlleva la activación de genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas (Pan et al. 2019). Esto implica que una cepa específica puede generar cantidades y variedades distintas de compuestos bioactivos dependiendo de los nutrientes disponibles en el entorno de cultivo (Zhou et al. 2022). En este estudio, se examinaron tres medios de cultivo que difieren en las fuentes de carbono y nitrógeno, los cuales son los componentes principales que suelen influir en la producción

de metabolitos (Singh et al. 2017). La cepa *P. citrinum* presentó un aumento en la actividad anti-linfoma con el medio CK, seguido por el PDB, lo que concuerda con investigaciones previas que identificaron compuestos anticancerígenos como penicillocitrina, ácido benzoico y ácido secalónico al cultivar *P. citrinum* en PDB (Li et al. 2013). En el caso de *A. versicolor*, se observó una mayor actividad anti-linfoma al fermentarse en CM para los extractos metanólicos y de acetato de etilo, coincidiendo con otros estudios que utilizaron medios adicionados con malta para obtener compuestos de *A. versicolor*, como flutamida C y F, esterigmatocistina, averantina y nidurufina, con actividad citotóxica contra líneas de cáncer de pulmón, piel y ovario (Lee et al. 2010; Lee et al. 2011). Para *M. anisopliae*, el PDB favoreció la actividad anticancerígena en los extractos de acetato de etilo y metanólicos. Otros estudios también han informado la producción de compuestos anticancerígenos como el Taxol por *M. anisopliae* en el mismo medio de cultivo (El-Maali et al. 2011).

La agitación es otro factor crucial en los procesos de fermentación, ya que aporta oxígeno al sistema, influye en la transferencia de calor y puede inducir cambios en la morfología celular (Darah et al. 2011). Estos cambios morfológicos pueden impactar las reacciones bioquímicas y activar la expresión génica para la síntesis de diversos metabolitos secundarios (Pan et al. 2019). En el presente estudio, se observó que solo para los extractos de acetato de etilo de *M. anisopliae* se aumentó de forma significativa la actividad biológica al cultivarse en agitación. Otros grupos de trabajo han demostrado que la agitación es esencial para que *M. anisopliae* genere compuestos como la swainsonina (Tamerler et al. 1999).

En los análisis de correlación no se encontró que el tipo de inóculo influyera de forma significativa en la actividad biológica. Sin embargo, *P. citrinum* mostró mayor actividad cuando se utilizaron esporas para el proceso de fermentación. Este resultado podría deberse al proceso de germinación, durante el cual se forma el tubo germinativo que se expande mediante la absorción y el metabolismo de los nutrientes, lo que podría influir en la producción de los metabolitos secundarios finales (Papagianni 2004; Chakravarthi et al. 2020). Mientras que para *M. anisopliae* la inoculación con micelio favoreció la producción de metabolitos bioactivos obtenidos de biomasa y sobrenadante. Este tipo de

inoculación puede reducir la fase de latencia en comparación con la inoculación con las esporas, lo que posiblemente acelere la obtención de compuestos responsables de la actividad (Reginatto et al. 2022).

Al evaluarse diferentes solventes orgánicos, los no polares como el cloroformo, hexano y acetato de etilo fueron los más eficaces para la extracción de metabolitos con actividad anticancerígena. Este tipo de solventes han sido ampliamente utilizados por su capacidad para extraer metabolitos no polares que están asociados con la actividad biológica de los hongos endófitos (Conrado et al. 2022).

El método de extracción influye en la cantidad y tipo de metabolitos obtenidos. En este estudio, la extracción mediante Soxhlet aumentó el rendimiento de los extractos hexánicos de *A. versicolor* y *M. anisopliae* en comparación con la maceración. Esto se debe a que el Soxhlet permite una extracción continua y exhaustiva de los metabolitos (De Castro y Priego-Capote 2010). Sin embargo, se observaron diferencias en cuanto a la actividad biológica. Para *A. versicolor*, se observó un aumento, mientras que para *M. anisopliae*, hubo una disminución en la actividad, posiblemente por la presencia de compuestos termolábiles en el extracto que se ven afectados durante el uso del Soxhlet que implica el calentamiento de la muestra (Sankeshwari et al. 2018).

En un proceso de fermentación, el escalamiento es una parte crítica. Al tratarse de seres vivos, las propiedades biológicas de las células pueden fluctuar durante la adaptación al nuevo entorno. Por lo tanto, es necesario evaluar si existe alguna mitigación de la actividad biológica en cada uno de los pasos del escalamiento (Ganeshan et al. 2021). Nuestros resultados indican que al escalar el proceso de fermentación mediante el aumento en ocho veces el volumen del medio de cultivo y el contenedor para las cepas *A. versicolor* y *M. anisopliae*, no se apreció una atenuación significativa en la actividad anticancerígena. No obstante, se registraron variaciones en el rendimiento entre los lotes obtenidos, posiblemente debido a fluctuaciones de temperatura durante la producción. Se requieren estudios posteriores para confirmar el efecto de la temperatura en el rendimiento y la actividad de los extractos.

El índice de selectividad (IS) es un parámetro muy útil para descartar compuestos o extractos que presentan efectos adversos en células no blanco en evaluaciones *in vitro* (Indrayanto et al. 2021). En este estudio los extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* destacaron por su actividad selectiva contra el linfoma (IS > 19) en comparación con los hexánicos. De acuerdo con Peña-Morán et al. (2016) valores IS > 10 indican selectividad en los extractos y pueden ser considerados como candidatos para futuras investigaciones.

No se observó actividad antioxidante considerable ($IC_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$) en las evaluaciones iniciales. Sin embargo, cuando se modificaron las condiciones de fermentación y se obtuvieron lotes grandes de los extractos de acetato de etilo de *A. versicolor* y *M. anisopliae* se observó moderada (IC_{50} 200 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) y fuerte actividad ($IC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) (Fadhillah et al. 2019). Lo que concuerda con estudios realizados por Chandra y Arora (2011) que encontraron que la capacidad antioxidante de *P. citrinum* aumentaba al modificar los componentes del medio CK. Ya se ha reportado previamente la actividad antioxidante de *A. versicolor* donde los polisacáridos extracelulares (Chen et al. 2012), L-glutaminasas (Awad et al. 2021), derivados de pirona (Li et al. 2020) y policétidos (Li et al. 2011) son responsables de la actividad. Mientras que para *M. anisopliae* se ha reportado que extractos de acetato de etilo y acetona de *M. anisopliae* presentaron actividad antioxidante al evaluarse mediante el método del fosfomolibdeno (Abdel-Wareth et al. 2018).

Los ensayos de hemólisis de eritrocitos son importantes en la caracterización de los extractos, previo al contacto de estos con sistemas biológicos *in vivo*. Es una prueba sencilla y económica para la evaluación de citotoxicidad (Sæbø et al. 2023). De acuerdo con Elizondo-Luévano et al. (2023), los extractos que presentan $IC_{50} > 90 \mu\text{g/mL}$ son considerados como no tóxicos. Por lo que los extractos crudos de acetato de etilo y las fracciones colectivas de *A. versicolor* y *M. anisopliae* pueden considerarse con baja toxicidad hacia los eritrocitos humanos por presentar $IC_{50} > 800 \mu\text{g/mL}$. Adicionalmente presentan efecto protector contra la hemólisis oxidativa de eritrocitos inducida por el radical AAPH, lo que se ha atribuido al contenido de polifenoles que interactúan con los

componentes de la membrana de los eritrocitos al prevenir la oxidación de las proteínas y los lípidos de la membrana a través de enlaces de hidrógeno (Sangkitikomol 2012).

Se observó que la actividad anticancerígena de la FC-2 de *A. versicolor* y FC-5 de *M. anisopliae* presentaban valores IC₅₀ muy parecidos al de los extractos crudos, lo que podría indicar un posible efecto sinérgico de los metabolitos que se encuentran presentes en los extractos. Lo que concuerda con el estudio realizado por Liang et al. (2023) que reportó sinergia entre los metabolitos responsables de la actividad insecticida producidos por el hongo endófito *Alternaria* sp. LS-Y-1.

El análisis por LC-MS² de la FC-2 evidencio la presencia de compuestos con actividad biológica que ya habían sido reportados para el género *Aspergillus* como la chalcona de naringenina (Seshime et al. 2005), la cual presenta actividad anticancerígena contra células de glioblastoma humano (Zhang et al. 2016). Mientras que la esterigmatocistina es una micotoxina comúnmente encontrada en *A. versicolor* (Engelhart et al. 2002), con actividad antitumoral *in vitro* contra diferentes líneas de cáncer como HepG2 (Liu et al. 2014), HL-7702 (Zhou et al. 2023), A-549 y HL-60 (Cai et al. 2011). Sin embargo, en modelos *in vivo* se ha demostrado su efecto carcinogénico en diferentes especies animales (Nieto et al. 2018). La FC-5 de *M. anisopliae* contiene compuestos como las destruxinas A, B y C que han sido reportadas previamente para la especie (País et al. 1981). La destruxina B se ha reportado con actividad anticancerígena por inducción de muerte celular por apoptosis en la línea A-549 (Wu et al. 2013) y HT-29 (Yeh et al. 2012). Mientras que las destruxinas A y C se han asociado con actividad insecticida (Wang et al. 2023; Male et al. 2009).

9. CONCLUSIONES

- De los diez hongos endófitos aislados de *L. marginatus* las cepas *P. citrinum* PME-H002, *A. versicolor* PME-H005, *M. anisopliae* PME-H007 y *Cladosporium* sp. PME-H008, se seleccionaron por presentar buena actividad contra la línea de linfoma murino L5178Y-R ($IC_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$).
- Las condiciones de cultivo como el tiempo de fermentación, el medio de cultivo, tipo de inóculo y la agitación, así como los solventes utilizados y el método de extracción tienen efecto en el rendimiento y la actividad de los extractos.
- Los extractos de aceto de etilo de las cepas *A. versicolor* PME-H005 y *M. anisopliae* PME-H007 se seleccionaron para su caracterización por presentar actividad anticancerígena selectiva contra el linfoma ($IC_{50} < 13$, $IS > 10$), ausencia de hemólisis ($IC_{50} > 800 \mu\text{g/mL}$) y hemo protección contra estrés oxidativo en eritrocitos humanos.
- El análisis por LC-MS² de las fracciones colectivas de *A. versicolor* y *M. anisopliae* reveló la presencia de compuestos reportados con actividad anticancerígena y antioxidante que podrían ser responsables de la actividad biológica observada.
- La FC-2 de *A. versicolor* contiene ácido azelaico, daidzeína, genisteína, calicosina, afrormosina, chalcona de naringenina, panaxatriol y piceatannol.
- La FC-5 de *M. anisopliae* contiene bisabolen-1,4-endoperóxido, bisgerayafolina A, curcumol, destruxina B y maculosina.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar si existe atenuación de la producción y actividad de metabolitos secundarios después de varias generaciones de los hongos.
- Evaluar cómo afectan otros parámetros en la fermentación como la temperatura y el pH en el rendimiento y la actividad biológica de los extractos.
- Evaluar otras estrategias para estimular la producción de metabolitos secundarios de los hongos, como el co-cultivo con otros microorganismos, así como el uso de precursores y elicitores.
- Evaluar la actividad de las fracciones colectivas (FC) en un modelo de linfoma murino *in vivo*.
- Realizar la purificación de los compuestos bioactivos y evaluar su actividad *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el mecanismo de acción de las FC y los compuestos bioactivos.

11.BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Wareth TAM, Ghareeb AM, Abdel-Aziz MS, El-Hagrassi AM. 2019. Snailicidal, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* fungal extracts. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries 23(2): 195-212.
- Ali AH, Radwan U, El-Zayat S, El-Sayed MA. 2018. Desert plant-fungal endophytic association: The beneficial aspects to their hosts. In Biological Forum-An International Journal 10(1): 138-145.
- Alvarado DXT, Hernández GRC, Valenzuela MAA, Yamada JR, Capetillo EGT, Morteo LT. 2019. Repercusiones orales secundarias al tratamiento de quimioterapia en pacientes del Hospital de Alta Especialidad de Veracruz. Revista mexicana de medicina forense y ciencias de la salud 4(2):85-87.
- Arias S, Terrazas T. 2006. Análisis cladístico del género *Pachycereus* (Cactaceae) con caracteres morfológicos. Brittonia 58(3): 197-216.
- Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. 2017. Non-hodgkin lymphoma. The lancet, 390(10091): 298-310.
- Awad MF, El-Shenawy FS, El-Gendy MMAA, El-Bondkly EAM. 2021. Purification, characterization, and anticancer and antioxidant activities of l-glutaminase from *Aspergillus versicolor* Faesay4. International Microbiology 24: 169-181.
- Bano N, Rizvi IF, Sharma N, Siddiqui MH, Khan MA, Akhtar S. 2016. Production of bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. Int Res J Eng Tech, 3(6): 1859-66.
- Barrales CHJ, de la Rosa MR. 2014. Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol. Biotecnología Vegetal 14(1).
- Bedi A, Adholeya A, Deshmukh SK. 2018. Novel anticancer compounds from endophytic fungi. Current Biotechnology 7(3): 168-184.

- Bezerra JD, Santos MG, Barbosa RN, Svedese VM, Lima DM, Fernandes MJS, Souza MCM. 2013. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: A first study. *Symbiosis*, 60: 53–63.
- Bezerra JDP, de Azevedo JL, Souza MCM. 2017. Why study endophytic fungal community associated with cacti species?. In: *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, De Azevedo JL, Quecine MC (eds). Springer: Cham, Switzerland, pp. 21–35.
- Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3(7): 619-627.
- Cai S, Zhu T, Du L, Zhao B, Li D, Gu Q. 2011. Sterigmatocystins from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *The Journal of Antibiotics* 64(2): 193-196.
- Cañedo V, Ames T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center: Lima, Perú pp. 30-50.
- Cardoso FJA. 2018. Endophytic microbes as a novel source for producing anticancer compounds as multidrug resistance modulators. In: *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*, Akhtar M, Swamy M. (eds). Springer: Singapore pp. 343-381.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2023. Lymphoma. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/cancer/uscs/about/data-briefs/no30-hematologic-incidence-surv-prev.htm> revisado 20 de diciembre 2023.
- Chakravarthi BVSK, Singh S, Kamalraj S, Gupta VK, Jayabaskaran C. 2020. Evaluation of spore inoculum and confirmation of pathway genetic blueprint of T13 α H and DBAT from a Taxol-producing endophytic fungus. *Scientific Reports* 10: 21139.
- Chandra P, Arora DS. 2011. Antioxidant potential of *Penicillium citrinum* and its optimization through different statistical approaches. *Free Radicals and Antioxidants* 1(4): 48-55.

- Chandra S. 2012. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(1): 47-59.
- Chen XY, Qi YD, Wei JH, Zhang Z, Wang DL, Feng JD, Gan BC. 2010. Molecular identification of endophytic fungi from medicinal plant *Huperzia serrata* based on rDNA ITS analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(3): 495–503.
- Chen Y, Mao W, Yang Y, Teng X, Zhu W, Qi X, Li N. 2012. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. *Carbohydrate Polymers* 87(1): 218-226.
- Conrado R, Gomes TC, Roque GSC, De Souza AO. 2022. Overview of bioactive fungal secondary metabolites: Cytotoxic and antimicrobial compounds. *Antibiotics* 11(11): 1604.
- Danagoudar A, Joshi CG, Ravi SK, Kumar HGR, Ramesh BN. 2018. Antioxidant and cytotoxic potential of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Tragia involucrata* L. *Pharmacognosy Research* 10(2): 188.
- Darah I, Sumathi G, Jain K, Lim SH. 2011. Influence of agitation speed on tannase production and morphology of *Aspergillus niger* FETL FT3 in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165: 1682–1690.
- De Carvalho CR, Ferreira MC, Amorim SS, da Silva Florindo RH, De Assis JCS, Zani CL, Rosa LH. 2019. Bioactive compounds of endophytic fungi associated with medicinal plants. In: Recent advancement in white biotechnology through fungi, Yadav A, Singh S, Mishra S, Gupta A. (eds). Springer: Cham, pp. 303-361.
- De Castro ML, Priego-Capote F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography* 1217(16): 2383-2389.
- Deshmukh SK, Gupta MK, Prakash V, Reddy MS. 2019. Fungal endophytes—a novel source of cytotoxic compounds. *Endophytes and secondary metabolites, Reference series in phytochemistry*. Springer: Cham, pp. 1-62.

- Dhayanithy G, Subban K, Chelliah J. 2019. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. BMC microbiology 19(1): 1-14.
- Dos Reis JBA, Lorenzi AS, do Vale HMM. 2022. Methods used for the study of endophytic fungi: A review on methodologies and challenges, and associated tips. Archives of Microbiology 204(11): 675.
- Ek-Ramos MJ, Gomez-Flores R, Orozco-Flores AA, Rodríguez-Padilla C, González-Ochoa G, Tamez-Guerra P. 2019. Bioactive products from plant-endophytic Gram-positive bacteria. Frontiers in microbiology 10:1-12.
- El-Hawary SS, Moawad AS, Bahr HS, Abdelmohsen UR, Mohammed R. 2020. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. RSC advances 10(37): 22058-22079.
- Elizondo-Luévano JH, Hernández-García ME, Pérez-Narváez OA, Castro-Ríos R, Chávez-Montes A. 2020. Berberina, curcumina y quercetina como potenciales agentes con capacidad antiparasitaria. Revista de Biología Tropical 68(4): 1241-1249.
- Elizondo-Luévano JH, Rodríguez-Garza NE, Bazaldúa-Rodríguez AF, Romo-Sáenz CI, Tamez-Guerra P, Verde-Star MJ, Quintanilla-Licea R. 2023. Cytotoxic, anti-hemolytic, and antioxidant activities of *Ruta chalepensis* L.(Rutaceae) extract, fractions, and isolated compounds. Plants 12(11): 2203.
- El-Maali NA, Mohrram AM, El-Kashef H, Gamal K. 2018. Novel resources of Taxol from endophytic and entomopathogenic fungi: Isolation, characterization and LC-Triple mass spectrometric quantification. Talanta 190: 466–474.
- El-Neketi M, Ebrahim W, Lin W, Gedara S, Badria F, Saad HEA, Proksch P. 2013. Alkaloids and polyketides from *Penicillium citrinum*, an endophyte isolated from the Moroccan plant *Ceratonia siliqua*. Journal of natural products 76(6): 1099-1104.

- Engelhart S, Loock A, Skutlarek D, Sagunski H, Lomme A, Färber H, Exner M. 2002. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and environmental microbiology* 68(8): 3886-3890.
- Fadhillah F, Yohandini H, Widjajanti H. 2019. Chemical compound isolated from antioxidant active extract of endophytic fungus *Cladosporium tenuissimum* in *Swietenia mahagoni* leaf stalks. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 20(9): 2645-2650.
- Falzone L, Salomone S, Libra M. 2018. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Frontiers in pharmacology* 9: 1-26.
- Gakuubi MM, Ching KC, Munusamy M, Wibowo M, Liang ZX, Kanagasundaram Y, Ng SB. 2022. Enhancing the discovery of bioactive secondary metabolites from fungal endophytes using chemical elicitation and variation of fermentation media. *Frontiers in Microbiology* 13: 898976.
- Ganeshan S, Kim SH, Vujanovic V. 2021. Scaling-up production of plant endophytes in bioreactors: concepts, challenges and perspectives. *Bioresources and Bioprocessing* 8: 1-16.
- Gomez-Flores R, Quintanilla-Licea LR, Hernández-Martínez MHC, Samaniego-Escamilla M, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. 2019. Survival of Lymphoma-Bearing Mice by *Pachycereus marginatus* Cactus Extracts and Elucidation of Bioactive Compounds. *Natural Product Communications* 14(5).
- Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C, Goettsch B. 2004. Checklist of chihuahuan desert cactaceae. *Harvard papers in Botany* 9: 51-68.
- Hernández-Martínez HC, Gomez-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.

- Hewage RT, Aree T, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. 2014. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry* 108: 87–94.
- Holdsworth F, Worku D, Bretton AL, Vella C, Walker E. 2021. A guide to Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: similarities and differences. *British Journal of Nursing* 30(17): S16-S22.
- Hu Y, Zhang J, Liu D, Guo J, Liu T, Xin Z. 2017. Pencitrin and pencitrinol, two new citrinin derivatives from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* salicorn 46. *Phytochemistry Letters* 22: 229-234.
- Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 31(2): 163-167.
- 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: 273–307.
- International Agency for Research on Cancer Section of Cancer Surveillance. 2023. CancerMondial. [Online] Disponible en: <http://gco.iarc.fr/> revisado 20 de diciembre de 2023.
- Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LP. 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in microbiology* 7: 1-14.
- Khalil D, El-Zayat SA, El-Sayed MA. 2020. Phytochemical screening and antioxidant potential of endophytic fungi isolated from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 7(2): 116-124.

- Khan AL, Hamayun M, Khan SA, Kang SM, Shinwari ZK, Kamran M, Rehman S, Kim JG, Lee IJ. 2012. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1483–1494.
- Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D. 2011. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural product reports*, 28(7): 1208-1228.
- Kjer J, Debbab A, Aly AH, Proksch P. 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature protocols* 5(3): 479-490.
- Kusari S, Lamshöft M, Spiteller M. 2009. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of applied microbiology* 107(3): 1019-1030.
- Kusari S, Spiteller M. 2011. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?. *Natural product reports* 28(7): 1203-1207.
- Lee Y-M, Dang HT, Li J, Zhang P, Hong J-K, Lee C-O, et al. 2011. A Cytotoxic fellutamide analogue from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 32: 3817–3820.
- Lee YM, Li H, Hong J, Cho HY, Bae KS, Kim MA, et al. 2010. Bioactive metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Archives of Pharmacal Research* 33: 231–235.
- Lewis WD, Lilly S, Jones KL. 2020. Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 101(1):34-41.

- Li JL, Lee YM, Hong JK, Bae KS, Choi JS, Jung JH. 2011. A new antioxidant from the marine sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Natural Product Sciences* 17: 14–18.
- Li SJ, Zhang X, Wang XH, Zhao CQ. 2018. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *European journal of medicinal chemistry* 156: 316-343.
- Li TX, Meng DD, Wang Y, An JL, Bai -F, Jia XW, *et al.* 2020. Antioxidant coumarin and pyrone derivatives from the insect-associated fungus *Aspergillus versicolor*. *Natural Product Research* 34: 1360–1365.
- Li X, Zhang L, Liu Y, Guo Z, Deng Z, Chen J, Zou K. 2013. A new metabolite from the endophytic fungus *Penicillium citrinum*. *Natural Product Communications* 8(5): 587-588.
- Liang J, Wu H, Wang X, Feng R, Lu P, Xu J, Li Y. 2023. Toxicity and synergistic effect of secondary metabolites isolated from the endophytic fungus LS-Y-1 of *Rhododendron przewalskii* against *Tribolium castaneum*. *South African Journal of Botany* 157: 587-591.
- Liu K, Ding X, Deng B, Chen W. 2009. Isolation and characterization of endophytic Taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1171–1177.
- Liu Y, Du M, Zhang G. 2014. Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicology Reports*, 1, 1076-1086.
- Ludwig MJ. 2015. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production. *Biotechnology letters* 37(7): 1325-1334.
- Mady M, Wael W, Abdou R, Haggag E, El Sayed K. 2017. Breast cancer migration and proliferation inhibitory and antibiotic secondary metabolites from the Egyptian olive tree endophytic fungus *Penicillium citrinum*. *Journal of Advanced Pharmacy Research* 1(3): 160-170.

- Male KB, Tzeng YM, Montes J, Liu BL, Liao WC, Kamen A, Luong JH. 2009. Probing inhibitory effects of destruxins from *Metarhizium anisopliae* using insect cell based impedance spectroscopy: inhibition vs chemical structure. *Analyst* 134(7): 1447-1452.
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. 2017. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Advanced pharmaceutical bulletin* 7(3): 339.
- Meyer JM, Hoy MA, Boucias DG. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the *Asian citrus* psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 95(2): 101-109.
- Miranda-Filho A, Piñeros M, Znaor A, Marcos-Gragera R., Steliarova-Foucher E, Bray F. 2019. Global patterns and trends in the incidence of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer causes & control*, 30: 489-499.
- Mishra S, Sahu PK, Agarwal V, Singh N. 2021. Exploiting endophytic microbes as micro-factories for plant secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18): 6579-6596.
- Mohinudeen K, Devan K, Srivastava S. 2019. Bioprocessing of endophytes for production of high-value biochemicals. In: Singh H, Keswani C, Reddy M, Sansinenea E, García EC (eds). *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms*, Springer, Singapore, pp.353-390
- Moreno LS, González MPB, Herrera IM, Gutiérrez YQ, Arredondo JLM, Rodríguez RG. 2015. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by methanolic extract of *Stenocereus marginatus* and *Castela texana*. *International Journal of Medicinal Plants and Alternative Medicine* 3(1): 10-17.
- Nadumane VK, Venkatachalam P, Gajaraj B. 2016. *Aspergillus* applications in cancer research. In: *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, Gupta VK (eds). Elsevier: Amsterdam, pp. 243-255.

- Naik BS. 2019. Potential roles for endophytic fungi in biotechnological processes: A review. In: Plant and Human Health, Ozturk M, Hakeem KR (eds). Springer: Cham, Switzerland, pp. 327–344.
- Naik S, Shaanker RU, Ravikanth G, Dayanandan S. 2019. How and why do endophytes produce plant secondary metabolites?. *Symbiosis*, 78: 193-201.
- Naranjo M, Vélez LT, Rojano BA. 2011. Antioxidant activity of different grades of Colombian coffee. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(2): 164-173.
- Newman DJ, Cragg GM. 2020. Plant Endophytes and Epiphytes: Burgeoning Sources of Known and “Unknown” Cytotoxic and Antibiotic Agents?. *Planta Medica* 1-15.
- Nieto CHD, Granero AM, Zon MA, Fernández H. 2018. Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology* 118: 460-470.
- Pais M, Das BC, Ferron P. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 20(4): 715-723.
- Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H, Wang H. 2019. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology* 10: 294.
- Pandey PK, Singh S, Singh MC, Singh AK, Yadav SK, Pandey AK, Heisnam P. 2018. Diversity, ecology, and conservation of fungal and bacterial endophytes. In *Microbial Resource Conservation*. Springer: Cham, pp. 393-430.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22: 189–259.
- Peña-Morán OA, Villarreal ML, Álvarez-Berber L, Meneses-Acosta A, Rodríguez-López V. 2016. Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines. *Molecules* 21(8): 1013.

- Pereira BJD, de Azevedo JL, Souza-Motta CM. 2017. Why study endophytic fungal community associated with cacti species?. In: Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. de Azevedo J, Quecine M. (eds). Springer: Cham, pp. 21-35.
- Plonka P, Elas M, Szczygiel M. 2005. Appearance of iron-nitrosyl complexes in murine L5178Y lymphoma as a function of the form of growth and the type of host. *Current Topics in Biophysics*, 29(1-2): 65-71.
- Quintanilla-Licea R, Gomez-Flores R, Samaniego-Escamilla MÁ, Hernández-Martínez HC, Tamez-Guerra P, Morado-Cuevas R. 2016. Cytotoxic Effect of Methanol Extracts and Partitions of Two Mexican Desert Plants against the Murine Lymphoma L5178Y-R. *American Journal of Plant Sciences* 7(11): 1521-1530.
- Raj KG, Sambantham S, Manikanadan R, Arulvasu C, Pandi M. 2014. Fungal Taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* induces apoptosis in T47D human breast cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(16): 6627-6632.
- Rajamanikyam M, Vadlapudi V, Upadhyayula SM. 2017. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60:1-16.
- Ratnaweera PB, de Silva ED. 2017. Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In *Endophytes: Crop Productivity and Protection*. Springer: Cham pp. 191-212.
- Reginatto C, Posso dos Santos G, Costa Ramos K, Borges Folle A, Campos de Souza B, Meneghel L, et al. 2022. Inoculation conditions improved the pectinase productivity in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 42: 102354.
- Rodríguez GNE. 2021. Identificación de compuestos activos de extractos de plantas de uso medicinal con actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de chagas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León: San Nicolas de los Garza.

- Sæbø IP, Bjørås M, Franzyk H, Helgesen E, Booth JA. 2023. Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3): 2914.
- Samaniego EMÁ. 2016. Identificación de compuestos de *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose E *Ibervillea sonora* (Watson) con actividad citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León: San Nicolas de los Garza.
- Sangkitikomol W. 2012. Antioxidants in Thai herb, vegetable and fruit inhibit hemolysis and Heinz body formation in human erythrocytes. In: *Oxidative Stress—Environmental Induction and Dietary Antioxidants*, Volodymyr IL (eds). IntechOpen; Croatia, pp. 289-306.
- Sankeshwari RM, Ankola AV, Bhat K, Hullatti K. 2018. Soxhlet versus cold maceration: which method gives better antimicrobial activity to licorice extract against: streptococcus mutans:?. *Journal of the Scientific Society* 45(2): 67-71.
- Santos MDS, Bezerra JDP, Svedese VM, Sousa MA, da Silva DCV, Maciel MDHC, Paiva LM, Porto ALF, de Souza CM. 2015. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. *Sydowia* 67: 147–156.
- Sapkota S, Shaikh H. 2023. Non-hodgkin lymphoma. In StatPearls [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559328/> revisado 20 de diciembre de 2023.
- Schirmacher V. 2019. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology* 54(2): 407-419.
- Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, Kitamoto K. 2005. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and biophysical research communications* 331(1): 253-260.

- Singh K, Gangrade A, Jana A, Mandal BB, Das N. 2019. Design, synthesis, characterization, and antiproliferative activity of organoplatinum compounds bearing a 1, 2, 3-triazole ring. *ACS Omega* 4(1): 835-841.
- Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM. 2017. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front Microbiol* 7: 2087.
- Steinwender BM, Enkerli J, Widmer F, Eilenberg J, Kristensen HL, Bidochka MJ, Meyling NV. 2015. Root isolations of *Metarhizium* spp. from crops reflect diversity in the soil and indicate no plant specificity. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 142–148.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260(5105): 214–216.
- Szumiel I. 1979. Response of two strains of L5178Y cells to cis-dichlorobis-(cyclopentylamine) platinum (II). I. Cross-sensitivity to cis-PAD and UV light. *Chemico-biological interactions* 24(1): 51-72.
- Tamerler C, Keshavarz T. 1999. Optimization of agitation for production of swainsonine from *Metarhizium anisopliae* in stirred tank and airlift reactors. *Biotechnology Letters* 21: 501–504.
- Tibpromma S, Hyde KD, Bhat JD, Mortimer PE, Xu J, Promputtha I, Karunarathna SC. 2018. Identification of endophytic fungi from leaves of *Pandanaceae* based on their morphotypes and DNA sequence data from southern Thailand. *Mycology*, 33:25.
- Toghueo RMK, Sahal D, Boyom FF. 2020. Recent advances in inducing endophytic fungal specialized metabolites using small molecule elicitors including epigenetic modifiers. *Phytochemistry*, 174: 112338.

- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. 2016. Global cancer incidence and mortality rates and trends an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 25(1): 16-27.
- Uzma F, Mohan CD, Hashem A, Konappa NM, Rangappa S, Kamath PV, Chowdappa S. 2018. Endophytic fungi alternative sources of cytotoxic compounds: a review. *Frontiers in pharmacology* 9: 1-27.
- Valdés LA, Gómez A, Carballo ME, Capote SM, González I, Rohde W. 2015. Estandarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango (*Mangifera indica* L.). *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 22(2): 40-49.
- Vanneman M, Dranoff G. 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews cancer* 12(4): 237-251.
- Viramontes RS, Portillo RM. 2010. Identificación de microorganismos-actividades prácticas para el laboratorio. Dirección de Extensión y Difusión Cultural: Chihuahua, pp. 89-90.
- Wang J, Weng Q, Zhang K, Hu Q. 2023. Binding proteins of destruxin A from *Metarhizium* against insect cell. *BMC microbiology* 23(1): 96.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18(1): 315-322.
- Wu CC, Chen TH, Liu BL, Wu LC, Chen YC, Tzeng YM, Hsu SL. 2013. Destruxin B isolated from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* induces apoptosis via a Bcl-2 family-dependent mitochondrial pathway in human nonsmall cell lung cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
- Xu F, Wang S, Li Y, Zheng M, Xi X, Cao H. 2018. Yield enhancement strategies of rare pharmaceutical metabolites from endophytes. *Biotechnol Lett* 40: 797–807.

- Yeh CT, Rao YK, Ye M, Wu WS, Chang TC, Wang LS, Tzeng YM. 2012. Preclinical evaluation of destruxin B as a novel Wnt signaling target suppressing proliferation and metastasis of colorectal cancer using non-invasive bioluminescence imaging. *Toxicology and applied pharmacology* 261(1): 31-41.
- Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Qin, L. 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological research* 165(6): 437-449.
- Zain M, Razak A, El-Sheikh H, Soliman H, Khalil A. 2009. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *African journal of microbiology research* 3: 280–286.
- Zhang S, Jiang ZF, Pan Q, Song CY, Zhang WH. 2016. Anti-cancer effect of naringenin chalcone is mediated via the induction of autophagy, apoptosis and activation of PI3K/Akt signalling pathway. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11(3): 684-690.
- Zhao J, Zhou L, Wang J, Shan T, Zhong L, Liu X, Gao X. 2010. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Curr Res, Technol Educ Trop Appl Microbiol Microbial Biotechnol* 1: 567-576.
- Zhou J, Feng Z, Zhang W, Xu J. 2022. Evaluation of the antimicrobial and cytotoxic potential of endophytic fungi extracts from mangrove plants *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata*. *Scientific Reports* 12: 2733.
- Zhou Y, Hu L, Zhou G, Luo Y, Liu R. 2023. Sterigmatocystin induced cytotoxicity and disturbed lipid metabolism. *Journal of Agriculture and Food Research* 14: 100673.

