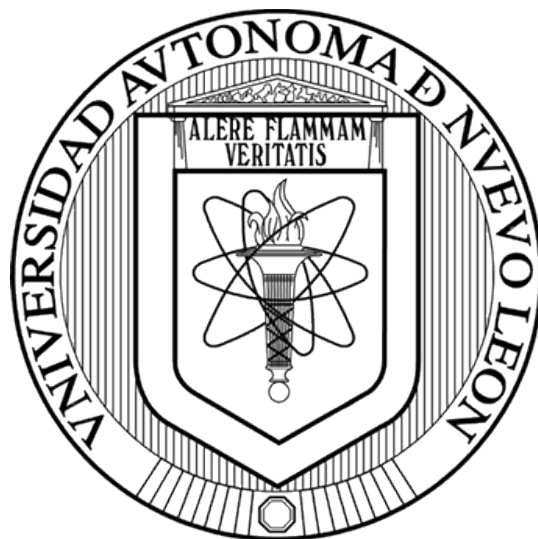


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**Evaluación de la actividad de extractos y particiones bioactivas de  
cultivos de *Bacillus sp.* endófitos aislados de *Ibervillea sonora* (S. Watson)  
Greene contra el linfoma murino L5178Y-R**

POR:

**M.C. Ricardo Romero Arguelles**

**Como requisito parcial para obtener el GRADO de DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

## **LUGAR TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas del Laboratorio de Inmunología y Virología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**“Evaluación de la actividad de extractos y particiones bioactivas de cultivos de *Bacillus sp.* endófitos aislados de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene contra el linfoma murino L5178Y-R”**

**COMITÉ DE TESIS**



---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**  
Presidente



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**  
Secretario



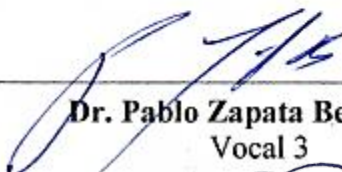
---

**Dr. Ramiro Quintanilla Licea**  
Vocal 1



---

**Dr. Alonso Orozco Flores**  
Vocal 2



---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Vocal 3



---

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



**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

**“Evaluación de la actividad de extractos y particiones bioactivas de cultivos de *Bacillus sp.* endófitos aislados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene contra el linfoma murino L5178Y-R”**

**DIRECCIÓN DE TESIS**



---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**  
Presidente



---

**Dr. César Iván Romo Sáenz**  
Asesor externo

## **AVISO DERECHOS DE AUTOR**

### **DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis esta protegido, el uso de imagenes, fragmentos de videos y demas material contenido que sea objeto de proteccion de los derechos de autor, sera exclusivamente para fines educativos e informativos y debera citar la fuente de donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Este trabajo fue financiado:

- El programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnología, PAICYT-UANL CN1235-20 de Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores.
- 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.

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores **Dr. Ricardo Gómez Flores, Dra. Patricia Tamez Guerra y el Dr. César Iván Romo Sáenz** por su gran apoyo constante, así como sus enseñanzas y por permitirme formar parte de un gran equipo de trabajo. También una mención al resto de mi comité por su colaboración en el proyecto.

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el departamento de Inmunología y Virología de la facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada (893625) para el desarrollo de este trabajo de Doctorado.

Agradezco a mi compañero de vida **Diego Fonseca Rivera** por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A mis amigos **Beatriz Sixto Venegas, Sergio Alonso Romo Marín, Pedro Alejandro Avitia Rodríguez, Edeer Iván Montoya Hinojosa, Isamar Daniela Enríquez Quintero** por todos esos buenos momentos compartidos.

A mis compañeros y personal del Laboratorio de Formulación de Biológicos que fueron de gran apoyo: **Servando Horacio Cantú Bernal, Nora Beatriz Mares, Rosalinda Navarro, Rosa Flores, Jesica María Ramírez Villalobos, Dra. Marivel Gómez Treviño, Enriqueta Monreal, Angello Martínez y Dr. Alonso Orozco.**

Al gran equipo de trabajo de Posgrado en especial a **Lic. Mónica Delgado**, por ayudarme en cualquier duda que surgía dentro del programa académico.

A mi familia por el apoyo y comprensión a lo largo de esta etapa de mi vida.

## DEDICATORIA

A mis padres **Ricardo Romero Ríos** y **Jesús Arguelles Samaniego**, porque gracias a su comprensión, amor y cariño he podido lograr una meta más en mi vida profesional. Gracias por compartir todos mis momentos de tristeza, alegría y por todo su apoyo, sin el cual todo hubiera sido más difícil. Por ustedes seguiré adelante, hasta lograr realizar mis metas.

A mis hermanas **Adriana Romero Arguelles** y **María Concepción Romero Arguelles** que me han apoyado incondicionalmente en todo momento.

A mis sobrinos **José Julián** y **Omar Dariel** que llenan de felicidad mi vida.

Mi esfuerzo y mi corazón para ustedes, siempre

## ÍNDICE

LUGAR TRABAJO .....	ii
DIRECCIÓN DE TESIS .....	iv
AVISO DERECHOS DE AUTOR.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE.....	1
LISTA DE FIGURAS .....	5
LISTA DE TABLAS .....	7
ABREVIACIONES.....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES .....	13
2.1 Plantas medicinales en México.....	13
2.2 <i>Ibervillea sonorae</i> .....	14
2.3 Bacterias endófitas.....	15
2.4 Características de la familia <i>Bacillus sp.</i> .....	16
2.5 Cáncer .....	17
2.6 Terapias actuales contra el cáncer .....	18
2.7 Reportes del potencial de <i>Ibervillea sonorae</i> contra el cáncer .....	19
2.8 Compuestos bioactivos aislados de endófitos en plantas contra linfoma.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS .....	21



5. OBJETIVO GENERAL .....	22
5.1 Objetivos Específicos .....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	23
6.1 Materia Vegetal .....	23
6.2 Aislamiento de Bacillus endófitos .....	23
6.3 Caracterización de las cepas aisladas .....	23
6.4 Obtención de extractos .....	24
6.5 Mantenimiento de líneas celulares .....	25
6.6 Análisis de Inhibición de crecimiento .....	25
6.7 Determinación del índice de selectividad .....	26
6.8 Estandarización en la producción de biomasa y optimización de extractos .....	26
6.9 Evaluación de la actividad antioxidante .....	27
6.10 Evaluación de la actividad hemolítica y anti-hemolítica .....	27
6.11 Pruebas químicas para la identificación de compuestos .....	28
6.11.1 Esteroles y terpenos (Prueba de Salkowski) .....	28
6.11.2 Prueba de cumarina .....	29
6.11.3 Sesquiterpeno-lactonas (prueba de Baljet) .....	29
6.11.4 Quinonas (prueba de NaOH) .....	29
6.11.5 Saponinas (prueba de NaHCO <sub>3</sub> ) .....	29
6.11.6 Flavonoides (Prueba H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	29
6.11.7 Compuestos Fenólicos (Taninos) .....	29
6.11.8 Carbohidratos (prueba de Molish) .....	30
6.11.9 Alcaloides (prueba de Dragendorff) .....	30
6.12 Separación y evaluación de particiones bioactivas .....	30
6.13 Cromatografía en capa fina .....	30

6.14 Evaluación de genes relacionados con vías de muerte celular en células de linfoma murino.....	31
6.14.1 Extracción de ARN total.....	31
6.14.2 Síntesis de ADNc.....	32
6.14.3 Análisis de expresión de genes (PCR punto final) .....	32
6.15 Modelo <i>in vivo</i> .....	33
6.15.2 Evaluación de la función hepática .....	34
6.15.3 Determinación de la actividad antitumoral <i>in vivo</i> .....	34
6.16 Análisis Estadísticos .....	35
7. RESULTADOS .....	36
7.1 Aislamiento de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonorae</i> .....	36
7.2 Selectividad e inhibición de crecimiento de células de linfoma L5178Y-R por extractos acuosos de bacterias endófitas aisladas de <i>Ibervillea sonorae</i> .....	38
7.3 Efecto de extractos de bacterias endófitas de <i>I. sonorae</i> en el crecimiento de células de linfoma L5178Y-R.....	41
7.4 Identificación molecular y espectrometría de masas de bacterias endófitas y de rizosfera de <i>I. sonorae</i> con actividad citotóxica .....	44
7.5 Estandarización en la producción de biomasa y optimización de rendimientos de extractos.....	46
7.5.1 Inhibición del crecimiento celular .....	49
7.6 Separación de particiones bioactivas del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ).....	52
7.7 Evaluación de particiones bioactivas del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ).....	54
7.7.1 Inhibición de crecimiento e Índice de selectividad .....	54
7.7.2 Actividad hemolítica, anti hemolítica y antioxidante de las particiones del extracto metanólico ISE-B27.....	55

7.8 Regulación de genes relacionados con vías de muerte en células de linfoma murino L5178Y-R.....	57
Figura 19. Expresión génica relacionados con vias de muerte celular en celulas de linfoma L5178Y-R tratadas con extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> .....	59
7.9 Caracterización parcial de la partición bioactiva de cloroformo del extracto ISE-B27 ( <i>B. subtilis</i> ).....	59
7.10 Efecto antitumoral <i>in vivo</i> de la partición clorofórmica del extracto ISE-B27 ( <i>B. subtilis</i> ) .....	60
7.10.1 Evaluación de la dosis máxima tolerada.....	60
7.10.1 Determinación de la actividad antitumoral <i>in vivo</i> .....	62
8. DISCUSIÓN.....	65
9. CONCLUSIONES.....	69
10. PERSPECTIVAS.....	70
RODUCTOS ENTREGABLES .....	71
MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	75
BIBLIOGRAFÍA .....	76
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Raíz de <i>Ibervillea sonora</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Modelo experimental <i>in vivo</i> .....	35
<b>Figura 3.</b> Bacterias endófitas aisladas de <i>Ibervillea sonora</i> .....	36
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonora</i> en diferentes medios selectivos .....	37
<b>Figura 5.</b> Mapa de calor del efecto de inhibición del crecimiento de células del linfoma murino L5178Y-R .....	39
<b>Figura 6.</b> Mapa de calor del efecto citotóxico en células mononucleares de sangre periférica humana .....	40
<b>Figura 7.</b> Inhibición del crecimiento tumoral de extractos de acetato de etilo de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonora</i> .....	42
<b>Figure 8.</b> Inhibición del crecimiento tumoral de extractos metanólicos de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonora</i> .....	43
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa .....	44
<b>Figura 10.</b> Rendimiento de extractos metanólicos de bacterias endófitas bajo diferentes condiciones de crecimiento en diferentes medios de cultivo .....	47
<b>Figura 11.</b> Producción de biomasa de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonora</i> bajo diferentes condiciones de crecimiento en diferentes medios de cultivo .....	48
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de inhibición de células L5178Y-R mediante extractos metanólicos de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonora</i> crecidas en diferentes medios de cultivo .....	50

<b>Figura 13.</b> Porcentaje de inhibición de células mononucleares de sangre periférica humana por extractos metanólicos de bacterias endófitas de <i>Ibervillea sonora</i> crecidas en diferentes medios de cultivo .....	51
<b>Figura 14.</b> Cromatografía en capa fina del extracto metanólico .....	53
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de Inhibición de crecimiento de células del linfoma L5178Y-R por particiones del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 .....	55
<b>Figura 16.</b> Actividad hemolítica de las particiones del extracto metanólico ISE-B27 .....	56
<b>Figura 17.</b> Actividad anti hemolítica de las particiones del extracto metanólico ISE-B27 ...	56
<b>Figura 18.</b> Análisis de expresión génica mediante densitometría de células L5178Y-R tratadas con extracto metanólico de <i>Bacillus subtilis</i> .....	58
<b>Figura 19.</b> Expresión génica relacionados con vias de muerte celular en células de linfoma L5178Y-R tratadas con extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> .....	59
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c en la prueba de máxima dosis tolerada .....	61
<b>Figura 21.</b> Volumen, peso tumoral y peso sin tumor de ratones BALB/c hembras tratadas con la partición a base de cloroformo de la bacteria ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genes involucrados en señalización celular .....	33
<b>Tabla 2.</b> Criterios evaluados para la eutanasia en los ensayos <i>in vivo</i> .....	34
<b>Tabla 3.</b> Caracterización morfológica y rendimientos de extractos .....	37
<b>Tabla 4.</b> Índice de selectividad y IC <sub>50</sub> de los extractos de las bacterias aisladas contra células del linfoma murino L5178Y-R y células mononucleares de sangre periférica humana .....	44
<b>Tabla 5.</b> Identificación de bacterias endófitas aisladas de <i>Ibervillea sonorae</i> .....	45
<b>Tabla 6.</b> Rendimientos de particiones del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	52
<b>Tabla 7.</b> IC <sub>50</sub> y índice de selectividad de las particiones del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	54
<b>Tabla 8.</b> Actividad hemolítica, anti-hemolítica y antioxidante de las particiones del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	57
<b>Tabla 9.</b> Análisis químicos de la partición de cloroformo del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) .....	60
<b>Tabla 10.</b> Pruebas de función hepática a los 10 días de la administración de los tratamientos en la prueba de máxima dosis tolerada .....	61
<b>Tabla 11.</b> Pruebas de función hepática de grupos de ratones tratados .....	64

## ABREVIACIONES

°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
μg	Microgramos
min	Minutos
mL	Mililitros
cm	Centímetros
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
pH	Potencial de hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
UFC	Unidades formadoras de colonia
h	Hora
Mock	Control
ng	Nanogramos
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
mM	Milimolar
SFB	Suero fetal bovino
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
OMS	Organización mundial de la Salud
μM	Micromolar
mg	Miligramos
MeOH	Metanol
EtOAc	Acetato de etilo
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
p53	Proteína tumoral P53
Cas3	Caspasa 3
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
NF-κB	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas
AKT	Serina/treonina quinasa 1
BCL2	Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
PARP1	Poli ADP ribosa polimerasa 1

## RESUMEN

El cáncer representa un importante problema de salud a nivel mundial, ocasionando una tasa de mortalidad 10 millones al año. Actualmente, los tratamientos utilizados para esta enfermedad siguen ocasionando graves efectos secundarios, así como también no eliminan las células cancerígenas en su totalidad. Dado a lo anterior, diversos estudios se enfocan en identificar nuevos tratamientos que eviten la carcinogénesis celular, así como disminuir los efectos secundarios ocasionados por este. Estudios alrededor del mundo demuestran que el uso de extractos a base de plantas es efectivo contra diferentes enfermedades o infecciones, tal es el caso de *Ibervillea sonorae*, una planta endémica de estados del Norte de México, referida en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, la actividad biológica no está del todo clara, lo cual esta actividad podría estar relacionada a los microorganismos endófitos presentes en esta cucurbitacea. Estos microorganismos tienen el potencial de producir una amplia gama de componentes bioactivos, que pueden ser un reservorio de moléculas con actividad anticancerígena. Los *Bacillus* endófitos son microorganismos que habitan en los tejidos internos de las plantas, sin causar ningún daño aparente. Estudios demuestran que los *Bacillus* son fuente de nuevos metabolitos con actividad antitumoral e inmunomoduladora. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antitumoral de los *Bacillus* endófitos presentes en *Ibervillea sonorae* contra la línea tumoral murina L5178Y-R, en un modelo *in vitro* e *in vivo*. se observó que *Bacillus subtilis* ISE-B27 Inhibió *in vitro* el crecimiento de células de linfoma L5178Y-R con una IC<sub>50</sub> de  $34.62 \pm 0.180 \mu\text{g/mL}$  e *in vivo* los tratamientos a la concentración de 10 mg/kg redujeron de manera significativa el volumen y peso tumoral en ratones BALB/c portadores de tumor L5178Y-R. También se logró observar una disminución en la expresión de NFκB, BCL2 y AKT, y una sobreexpresión de BAX, CAS3 y PARP1, indicando una posible vía de muerte celular inductora de apoptosis a través de la vía intrínseca, alterando la vía de señalización AKT. Todo esto demuestra que los extractos de *Bacillus* endófitos de *Ibervillea sonorae* son capaces de producir compuestos antitumorales contra linfoma murino L5178Y-R en un modelo *in vitro* e *in vivo*.



## ABSTRACT

Cancer represents a major health problem worldwide, causing a mortality rate of 10 million a year. Currently, the treatments used for this continue to cause serious side effects, as well as do not eliminate cancer cells completely. Given the above, various studies focus on identifying new treatments that prevent cellular carcinogenesis, as well as reducing the side effects caused by it. Studies around the world show that the use of plant-based extracts is effective against different diseases or infections, such is the case of *Ibervillea sonora*, a plant endemic to the northern states of Mexico, referred to in the treatment of various diseases. However, the biological activity is not entirely clear, which could be related to the endophytic microorganisms present in this cucurbit. These microorganisms have the potential to produce a wide range of bioactive components, which can be a reservoir of molecules with anticancer activity. Endophytic Bacillus are microorganisms that inhabit the internal tissues of plants, without causing any apparent damage. Studies show that Bacillus are a source of new metabolites with antitumor and immunomodulatory activity. The objective of this work was to evaluate the antitumor activity of the endophytic Bacillus present in *Ibervillea Sonorae* against the murine tumor line L5178Y-R, in an *in vitro* and *in vivo* model. It was observed that *Bacillus subtilis* ISE-B27 inhibited the growth of L5178Y-R lymphoma cells *in vitro* with an  $IC_{50}$  of  $34.62 \pm 0.180 \mu\text{g/mL}$  and *in vivo* the treatments at the concentration of 10 mg/kg significantly reduced the volume and tumor weight in BALB/c mice bearing L5178Y-R tumor. It was also possible to observe a decrease in the expression of NF $\kappa$ B, BCL2 and AKT, and an overexpression of BAX, CAS3 and PARP1, indicating a possible cell death pathway that induces apoptosis through the intrinsic pathway, altering the AKT signaling pathway. All of this demonstrates that endophytic Bacillus extracts from *Ibervillea sonora* are capable of producing antitumor compounds against murine lymphoma L5178Y-R in an *in vitro* and *in vivo* model.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa un gran problema público a nivel mundial, estimándose una tasa de morbilidad de 18.1 millones, generando una mortalidad de 9.6 millones por año (Bray et al., 2018). La proliferación celular descontrolada y su capacidad de evasión de los mecanismos de control, así como el dimorfismo celular son algunas de las características principales del cáncer (Stewart y Kleihues, 2003). Actualmente, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos más utilizados contra este tipo de enfermedad, sin embargo, estos siguen siendo costosos y perjudiciales para el paciente por sus efectos secundarios tal como; mielosupresión, toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal, reduciendo la calidad de vida y desalentando a los pacientes a someterse a tratamientos actuales, favoreciendo la progresión del cáncer (Jemal et al., 2011). Por lo tanto, existe la necesidad de diseñar nuevas estrategias que favorezcan al control y eliminación de esta enfermedad, que sean más eficaces y selectivos, así como menos tóxicos que los tratamientos actuales.

Los avances en el área de la Fitofarmacología representan una alternativa importante en la búsqueda de tratamientos de diversas enfermedades (Montbriand, 2004). Aproximadamente el 50% de los medicamentos utilizados en la actualidad contra el cáncer han sido aislados de productos naturales, posicionando al reino vegetal como la fuente más importante. En este caso *Ibervillea sonorae* también llamada “wereke” es una Cucurbitaceae nativa del desierto de Sonora, México con un uso extenso en la medicina popular. Se utiliza la raíz como antibiótico tópico, catártico, antirreumático, antidiabético, así como un potente anticancerígeno (Alarcon-Aguilar et al., 2005).

Estudios recientes con *I. sonorae* indican la presencia de compuestos (triterpenos) de tipo cucurbitacina con actividad antitumoral *in vitro* en cáncer de pulmón (Torres et al., 2015). Por otro lado, extractos metanólicos de esta cucurbitacea, presentan actividad anti-proliferativa en modelos *in vitro* (Estrada-Muñiz et al., 2006; Samaniego et al., 2016). Sin embargo, los estudios no muestran los mecanismos de los diferentes compuestos o moléculas presentes en los extractos de *I. sonorae* con actividad antitumoral. Por lo cual, de los compuestos obtenidos de esta planta la actividad antitumoral podría estar relacionada con los compuestos bioactivos secretados por *Bacillus* endófitos, producto de la fisiología de la

planta inducidos por las condiciones ambientales durante su desarrollo (Matsumoto y Takahashi 2017). Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó el potencial antitumoral de la partición clorofórmica de *B. subtilis* endófito de *I. sonorae* en células de linfoma murino L5178Y-R en un modelo *in vitro* e *in vivo*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Plantas medicinales en México

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que el 65% de los habitantes del mundo dependen o han utilizado remedios caseros a base de plantas medicinales (Jaganathan et al., 2015). En México, una cuarta parte de la población utiliza extractos de plantas a manera de infusiones como remedios caseros (Jacobo-Salcedo et al., 2011). Actualmente en México se conservan alrededor de 11,000 especies de plantas medicinales en todo el país. Estudios taxonómicos de esta colección mostraron que las plantas medicinales mexicanas son conocidas por 10,000 sinónimos en 52 idiomas indígenas. Esto permitió a los investigadores concluir la existencia de un "grupo básico" de 1,000 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana en casi todo el país durante casi 400 años (Lozoya, 1994; Vega-Ávila et al., 2009). Actualmente, ha sido catalogado como uno de los países más ricos en variedad y uso de plantas medicinales; sin embargo, pocas han sido estudiadas y validadas farmacológicamente (Cruz, 1991; Núñez-Ávila et al., 2018).

Los seres humanos han utilizado plantas como medicina desde la antigüedad, aislándose diferentes tipos de moléculas a partir de ellas (Zaman et al., 2022). La medicina alternativa se aplica convencionalmente en muchos tipos de cánceres para reducir la toxicidad y los efectos adversos de la quimioterapia. Una variedad de fitonutrientes que se encuentran en las frutas, hierbas y especias actúan como potentes agentes de prevención del cáncer al prevenir la sobreproducción de productos químicos tóxicos en el cuerpo (Radha et al., 2021). En la actualidad cerca del 70 % de los medicamentos contra el cáncer provienen de un origen natural, y más de 3,000 plantas con propiedades antitumorales han sido ampliamente estudiadas (Alonso-Castro et al., 2011). La comunidad científica ha demostrado que los pacientes con cáncer a menudo utilizan terapias alternativas, en particular plantas medicinales, que han servido como base para el descubrimiento de nuevos medicamentos contra el cáncer (Jacobo et al., 2016). Entre los ejemplos más significativos de agentes contra el cáncer derivados de plantas se encuentran la vincristina, vinblastina y docetaxel, los cuales ejercen efecto citotóxico contra diferentes tipos de cáncer tales como: leucemia, linfoma no Hodgkin, de mama, renal y pulmón.

Las plantas son fuente de moléculas bioactivas con propiedades antibacterianas, antiparasitarias, curativas, analgésicas, antiinflamatorias, reparadoras de tejidos, así como para en el tratamiento del cáncer representa una alternativa potencial (Rodríguez-Garza et al., 2023; Elizondo-Luévano et al., 2018; Hernández-Martínez et al., 2016). Aproximadamente el 80 % de la población mundial de países en desarrollo utiliza infusiones plantas para tratar diversas sintomatologías de enfermedades (Rai et al., 2010). México ha utilizado plantas medicinales desde tiempos prehispánicos y es considerado uno de los países líderes con una amplia diversidad de plantas. Alrededor del 30 % de los pacientes mexicanos diagnosticados con cáncer usan plantas como medicina complementaria (Gerson et al., 2006).

## **2.2 *Ibervillea sonorae***

*Ibervillea sonorae* Greene (Cucurbitaceae), también conocida como “wereke” o “guareke”, es una planta dioica perenne que se distribuye en los estados del Norte de México, abundante en el estado de Sonora y parte de Sinaloa, la cual se caracteriza por su enorme raíz (Figura 1) (Alarcón-Aguilar et al., 2005). Utilizada tradicionalmente por las etnias Mayo, Yaqui, Seri y Ópata con la finalidad de tratar heridas de piel (Xolalpa-Molina, 1994; Jiménez-Estrada et al., 2013). La infusión de la raíz es uno de los remedios vegetales más utilizados en México para el tratamiento de diabetes mellitus, lo cual está respaldado científicamente por diversos estudios que demuestran que la raíz presenta actividad hipoglicemiante temporal en conejos sanos e hiperglucémicos, así como en ratones diabéticos (Hernández-Galicia et al., 2007; Zapata-Bustos et al., 2014). Otras especies de cucurbitáceas se relacionan con la teoría de que poseen compuestos fenólicos de actividad biológica que benefician la salud humana (Estrada-Zúñiga et al., 2012). Los fenoles son metabolitos secundarios producidos en muchas plantas como mecanismo de defensa ante condiciones de estrés ambiental, ataque de patógenos, insectos, heridas, luz ultravioleta, exposición a metales pesados, entre otros. Además, poseen una gran reactividad y muestran una amplia variedad de efectos biológicos, incluyendo antibacterianos, anti-inflamatorios, antialérgicos, hepatoprotectores, antitrombóticos, antivirales, anticariogénicos y actividades antioxidantes (Nikitina et al., 2007). Varios estudios demuestran que los extractos a base de metanol a base de *Ibervillea sonorae* tienen actividad *in vitro* contra el cáncer de cuello uterino (HeLa), hepatocarcinoma

(HepG2), linfoma (L5178Y-R) y cáncer de pulmón (A549) (Torres-Moreno et al., 2020; Quintanilla-Licea et al., 2016).



**Figura 1.** Raíz de *Ibervillea sonora*.

### **2.3 Bacterias endófitas**

Las bacterias endófitas se encuentran presente dentro de tejidos de plantas, especialmente en espacios intercelulares en los cuales se pueden encontrar una gran variedad de estos (Matsumoto y Takahashi 2017). Son un grupo específico de microorganismos que viven sin causar daño en los tejidos vegetales en donde se encuentran y que benefician a la planta de diversos daños bióticos o abióticos (Passari et al., 2015; Inahashi et al., 2015). Regularmente son encontrados en semillas, frutos, hojas, tubérculos, tallos y raíces (Gos et al., 2017). Estos pueden entrar a los tejidos vegetales a través de grietas que se forman en las raíces laterales, colonizándolas y generando uniones entre los espacios intercelulares de la raíz, parénquima y células corticales, penetrando en algunos casos el cambium para alcanzar el tejido vascular de tallos y hojas (Passari et al., 2015). Además, también pueden entrar mediante el daño foliar ocasionado por factores climáticos y entogénicos

(Rajivgandhi et al., 2018). Estudios previos han demostrado que este grupo de microorganismos tienen la capacidad de inhibir patógenos, solubilizar fosfatos y contribuir a la asimilación del nitrógeno por las plantas (Hassan et al., 2019; Gos et al., 2017).

Los compuestos bioactivos producidos por bacterias endófitas aislados de plantas medicinales representan una fuente de nuevos medicamentos con potencial antitumoral (Christina et al., 2013; Ramírez-Villalobos et al., 2021; Romero-Arguelles et al., 2022). Las plantas medicinales se han estudiado ampliamente en los últimos años en la búsqueda de agentes antitumorales. Sin embargo, los altos costos de producción y procesamiento de dichos compuestos han sido una limitación para su uso. Esto ha provocado el aislamiento de microorganismos endófitos y rizosfera para encontrar nuevos compuestos con actividad antitumoral (Singh et al., 2017). Hasta la fecha, se han identificado una serie de exopolisacáridos, aminoglucósidos, oligosacáridos, antraciclinas, flavonoides, xiolisacáridos y terpenos de microorganismos endófitos de la rizosfera asociados con plantas medicinales (Zheng et al., 2016; Ghosh et al., 2019; Nafie et al., 2021). Se han identificado microorganismos y compuestos con actividad antitumoral de plantas de la familia Cucurbitaceae (Kim et al., 2014; Günes et al., 2019; Salehi et al., 2021).

#### **2.4 Características de la familia *Bacillus sp.***

En la actualidad investigaciones recientes han indagado en la obtención de nuevos fármacos a partir de recursos naturales, como es el caso de las bacterias endófitas presentes en diversas plantas medicinales. Las bacterias endófitas del género *Bacillus* de diversas plantas presentan la capacidad de generar múltiples compuestos con actividad anticancerígena tales como: lipopéptidos, glucopéptidos, antraquinonas y ácidos aureólicos (Chen et al., 2013). Las bacterias son capaces de producir más de 4,000 metabolitos, de los cuales *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* son unas de las familias que producen cerca de 800 metabolitos diferentes (Dan et al., 2021). En la actualidad se sabe que *Bacillus sp.* es capaz de producir policétidos, macrolactonas, ácidos grasos, isocumarinas, lipopéptidos y polipéptidos con actividad biológica (Cardillo et al., 2021; Romero-Arguelles et al., 2022). Por otra parte, la familia *Bacillus sp.* es una de las familias mejor caracterizadas, las cuales

durante años han sido utilizadas para la producción de enzimas microbianas en productos químicos (Chen et al., 2020).

Estudios recientes demuestran que diferentes géneros de *Bacillus* son capaces de producir compuestos anticancerígenos. Tal es el caso de *Bacillus subtilis* aislados del tracto gastrointestinal de peces son capaces de producir diferentes compuestos tales como, pentacosano y eicosano los cuales tienen actividad de inhibición de crecimiento contra células MCF7 y HeLa a concentraciones menores de 300 µg/mL (Seerangaraja et al., 2017). Otro estudio, demuestra que *Bacillus licheniformis* es capaz de producir citotoxicidad contra células HepG2 a dosis menores de 200 µg/mL (Dahech et al., 2012). Se ha demostrado que extractos de *Bacillus cereus* aislado de *Oreochromis mossambicu* causa una IC<sub>50</sub> de 150 µg/mL en células de cáncer de mama MCF7, ocasionándole diversas alteraciones características de la apoptosis tales como una pared celular irregular y crecimiento reducido (Seerangaraja et al., 2017).

## 2.5 Cáncer

En la actualidad el cáncer es una enfermedad cosmopolita, la cual representa un gran problema de salud a nivel mundial, convirtiéndose en la segunda causa de muerte a nivel global (Siegel et al., 2019). Se caracteriza por ser un conjunto de trastornos relacionados con el descontrol en la división celular (Stewart y Kleihues, 2003). Este puede diseminarse a tejidos adyacentes y formar nuevos tumores (metástasis), esto mediante vía sanguínea y linfática (MacMahon et al., 1973). En algunos tipos de tumores las células cancerígenas pueden desprenderse y viajar por el torrente sanguíneo logrando en algunas ocasiones la invasión o desaminación a otros órganos (Lebel et al., 2016). En la actualidad existe una gran variedad de tipos de cáncer, pudiendo formarse en casi cualquier tipo de tejido u órgano, como pulmón, colon, mamas, piel, huesos y tejido nervioso (Feinberg et al., 2004).

Actualmente, en la mayoría de los casos su etiología es desconocida, sin embargo, se sabe que en general las causas son relacionadas a factores genéticos, malos hábitos alimenticios, consumo de drogas, infecciones microbianas, así como exposición a radiación o a sustancias químicas presentes en el medio ambiente (Tomasetti et al., 2017). A mediados



del 2018 la Organización Mundial de la Salud (OMS) dio a conocer que en el 2015 se atribuyeron 8.8 millones de defunciones debido a esta enfermedad, determinando una relación en la que 1 de cada 6 personas mueren a causa del cáncer. Estudios realizados por GLOBOCAN en el 2020, estima que se presentaron 19.3 millones nuevos casos de cáncer, de los cuales 10.0 millones condujeron a la muerte.

## **2.6 Terapias actuales contra el cáncer**

En la actualidad existe una gran variedad de tratamientos contra el cáncer, los cuales dependen de la especificidad de los tejidos, tipo de cáncer, así como el tiempo de desarrollo en el paciente (Hirsch et al., 2017). Los pacientes con cáncer por lo regular reciben un solo tipo de tratamiento, sin embargo, actualmente la mayoría de ellos reciben una combinación de tratamientos, como la cirugía con quimioterapia o radioterapia (Dragu et al., 2015, Zou et al., 2016).

Uno de los tratamientos que ha tomado fuerza es la inmunoterapia, la cual tiene la función de estimular al sistema inmunológico para combatir la enfermedad de manera más generalizada, restaurando o mejorando la actividad inmunológica (Hirsch et al., 2017). La inmunoterapia representa uno de los principales avances en el tratamiento de pacientes con cáncer, centrándose en la estimulación del sistema inmune adaptativo, con gran éxito logrando interferir con los puntos de control inmunitario para la liberación de la respuesta de células T antitumorales CD8<sup>+</sup>. Hay evidencia emergente de que diferentes tipos de cáncer desarrollan múltiples estrategias para evadir del reconocimiento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, estos tumores pueden ser atacados preferentemente por células asesinas naturales (NK) (Cerwenka *et al.*, 2018). Por otra parte, existen terapias en las cuales se implementan trasplantes de células madre, las cuales pueden restaurar las células sanguíneas de los pacientes sometidos a quimioterapias o radioterapias (Fiorillo et al., 2015). Por otro lado, la terapia hormonal en algunos tipos de cáncer (cáncer de mama), detiene o hace lento el crecimiento de las células tumorales (Troisi et al., 2018).

## **2.7 Reportes del potencial de *Ibervillea sonora* contra el cáncer**

Estudios recientes han sido enfocados a investigar las propiedades anticancerígenas de los compuestos de *I. sonora*. Se ha demostrado que esta cucurbitácea presenta propiedades anti proliferativas de melanoma (Alonso-Castro et al., 2011). Extractos acuosos de la raíz mostraron actividad citotóxica a concentraciones bajas sobre la línea de cáncer mamario humano T47D (Vega-Ávila et al., 2009). Por otro lado, se ha demostrado que los extractos metanólicos de *I. sonora* contienen triterpenos de tipo cucurbitacina con la capacidad de generar citotoxicidad contra diferentes líneas celulares tumorales (Estrada-Muñiz et al., 2006; Torres-Moreno et al., 2015).

## **2.8 Compuestos bioactivos aislados de endófitos en plantas contra linfoma**

Entre todos los tipos de cáncer reportados alrededor del mundo, el linfoma es considerado como el tercer cáncer más común en infantes, presentando una tasa de mortalidad del 3% (O'Neill et al., 2015). Diversos estudios han identificado la presencia de diversos endófitos (*Alternaria* sp. y *Ampelomyces* sp.) en las plantas *Polygonum senegalense* y *Urospermum picroides* las cuales mostraron la presencia de distintos compuestos secundarios con potencial anti proliferativo *in vitro* contra la línea celular L5178Y-R (Aly et al., 2008; Zhang et al., 2018). No obstante, *Stemphylium botryosum*, *Nigrospora oryzae* y *Penicillium citinum* endófitos de *I. sonora* mostraron la excreción de policétidos o alternasol los cuales presentaron citotoxicidad a bajas concentraciones contra este tipo de cáncer (Aly et al., 2010; El-Neketi et al., 2013; Uzor et al., 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema importante para la salud pública en todos los países del mundo, estimándose una tasa de mortalidad de 10 millones al año. Actualmente no existe un tratamiento efectivo que permita la eliminación de las células cancerígenas en su totalidad o que no genere trastornos fisiológicos en el huésped. Diversos estudios se enfocan en el desarrollo de nuevas estrategias en el control del cáncer que presenten un mínimo de efectos secundarios en las células sanas del huésped, así como un alto índice de citotoxicidad sobre los diferentes tipos de neoplasias. Estudios recientes demuestran que los *Bacillus* endófitos presentes en diversas plantas medicinales son fuente prometedora de compuestos bioactivos con efecto anticancerígeno, es por esto por lo que en el presente trabajo se evaluó la actividad antitumoral de particiones bioactivas producto de *Bacillus* endófitos presentes en *Ibervillea sonora* en los modelos *in vitro* e *in vivo* de linfoma murino L5178Y-R.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los extractos y particiones bioactivas de *Bacillus* endófitos aislados de *Ibervillea sonorae* poseen actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra el linfoma murino L5178Y-R.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de los extractos y particiones bioactivas obtenidos de *Bacillus sp.* endófitos de *Ibervillea sonora* contra linfoma murino L5178Y-R.

### 5.1 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto citotóxico de extractos producidos por *Bacillus* endófitos aislados de *I. sonora* en células de linfoma murino L5178Y-R *in vitro*.
2. Evaluar la actividad citotóxica de particiones bioactivas de *Bacillus* endófitos contra el linfoma murino L5178Y-R.
3. Determinar el efecto antitumoral y hepatotóxico de particiones bioactivas seleccionadas contra el linfoma murino L5178Y-R *in vivo*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos a utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Química y CTR Scientific del Estado de Nuevo León, México.

### 6.1 Materia Vegetal

*Ibervillea sonora* se colectó en Huatabampo, Sonora (26°39'23" N y 109°22'49" O). El espécimen se identificó por M. González Álvarez y Jorge A. Verduzco Martínez, en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, con el número de identificación 025589.

### 6.2 Aislamiento de *Bacillus* endófitos

Las raíces de las plantas se sometieron a una serie de lavados con agua y jabón para evitar la contaminación por epífitos (Glassner et al., 2015). Luego se hicieron cortes internos de 1 cm<sup>2</sup>, seguido de 1 min lavado en 1 % de NaClO, 1 minuto de lavado en agua destilada estéril, 1 min de tratamiento con 70% de etanol, dos enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 1 min un lavado con solución de PBS (control negativo), bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad 2 (Shan et al., 2018). El tejido vegetal se macero en 9 mL de PBS con un mortero estéril, después se inocularon 100 µL por triplicado en agar flúor manitol (AFM), agar Caseína Almidón (ACA), agar de extracto de malta (ISP2), agar de extracto de levadura (AEL) y agar sal inorgánico (ISP4), complementado con 50 µg/mL de ácido nalidíxico (Nalixona) y 50 µg/mL e ciclohexamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), e incubado a 28 °C durante dos semanas (Wang et al., 2014). Las colonias aisladas se conservaron en el caldo ISP2, complementado con un 30 % de glicerol a -70 °C, hasta su uso.

### 6.3 Caracterización de las cepas aisladas

La caracterización morfológica de las bacterias aisladas se llevó a cabo de acuerdo con sus características de crecimiento macroscópicas; forma, tamaño, color del sustrato y

tinción Gram. Las bacterias fueron identificadas molecularmente mediante PCR por el gen ribosomal 16S (Weisburg et al., 1991). Las reacciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ L que contenía 100 ng de DNA, 10  $\mu$ L de Ruby Taq Máster 2X (Jena Bioscience, Jena, Germany), 0.5  $\mu$ L de 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 0.5  $\mu$ L de 1492 R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') a una concentración de 10  $\mu$ M y 8  $\mu$ L de agua. La PCR se realizó a en un ciclo de desnaturalización de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 45 s y 72 °C por 90 s, seguido de un ciclo de extensión final a 72 °C por 8 min. El producto de PCR (1,600 pb) fue purificado mediante el kit Agarose Gel Extraction kit (Jena Bioscience). Los productos de PCR fueron secuenciados en un secuenciador ABI PRISM 310 TM en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas en la herramienta BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Consultado el 23 de abril 2021) para la identificación de las bacterias aisladas.

Las cepas aisladas fueron analizadas por MALDI-TOF MS (sistema Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) por el software MALDI Biotyper 3.0 en el Laboratorio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Todas las cepas fueron analizadas y clasificadas. El análisis muestra un puntaje de 2.0-3.0 para una identificación confiable a nivel de especie, 1.7-1.9 para identificación a nivel género y con un puntaje < 1.7 se considera una identificación poco confiable (Sogawa et al., 2011).

#### **6.4 Obtención de extractos**

Las bacterias fueron fermentadas en 120 mL de caldo GYM durante cuatro semanas en agitación (120 rpm) a 28 °C. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 min, separando la biomasa y los sobrenadantes. Para la preparación de los extractos acuosos los sobrenadantes fueron filtrados con filtros Whatman #1 de 125 mm, después de lo cual, se liofilizaron en un volumen de 3 mL por vial. A partir del peso seco se suspendieron en medio de mantenimiento (RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.) + 10% de SFB (Sigma-Aldrich)). Por otra parte, La preparación de los

extractos metanólicos se llevó a cabo mediante maceración durante 48 h, suspendiendo la biomasa en dos volúmenes del solvente (Prihanto et al., 2011). Para la preparación de los extractos a base de acetato de etilo, se colocaron 50 mL del sobrenadante en un embudo de separación junto con 100 mL del solvente, la mezcla se agitó manualmente por 5 min y la fase orgánica fue descartada (Minarmi et al., 2017). Los solventes fueron eliminados con la ayuda del concentrador SpeedVac SPD121P (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una temperatura de 35 °C. Los extractos a base de solventes se suspendieron en 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por cada mg de extracto, los cuales fueron filtrados utilizando filtros Corning de 0.20 µm y almacenados a -20 °C hasta su uso (Nguyen et al., 2020). Los rendimientos de los extractos fueron analizados mediante la fórmula (1).

$$\% \text{ Rendimiento} = [(\text{gramo de extracto seco} / \text{gramo de biomasa}) (100)] \quad (1)$$

## 6.5 Mantenimiento de líneas celulares

La línea celular tumoral en este estudio fue la línea de linfoma murino L5178Y-R ATCC® (CRL-1722), la cual fue descongelada en medio de mantenimiento RPMI-1640, suplementado con 10% de SFB inactivado (Sigma-Aldrich) y 1% de solución antibiótica-antimicótica (Life Technologies). Como línea celular sana se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de 20 mL a 30 mL de muestras de sangre de un donante voluntario sano, utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EE. UU).

## 6.6 Análisis de Inhibición de crecimiento

Para determinar el efecto citotóxico de los extractos contra la línea celular de linfoma murino L5178Y-R y PBMC, se sembraron  $5 \times 10^4$  células/mL en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen de 100 µL de medio RPMI-1640 de mantenimiento. Después fueron colocados los extractos a diferentes concentraciones (7.8 a 500 µg/mL) en 100 µL. Como control positivo se utilizó vincristina a 0.5 µg/mL. Las placas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>, después de lo cual se añadieron 15 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-



2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a la concentración final de 0.5 mg/mL. Las placas fueron incubadas por 3 h, después los tratamientos fueron retirados con precaución tratando de no tirar los cristales de formazán formados durante el proceso, seguido fueron colocados 150  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) por pozo. La lectura se realizó a 570 nm en un MULTISKAN GO (Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de citotoxicidad se calculó utilizando la fórmula (2). Como control positivo se utilizó vincristina a 0.5  $\mu$ /mL y como control negativo se utilizó DMSO al 1%. Los valores de las IC<sub>50</sub> se calcularon utilizando el software GraphPad Prism 7.

$$\% \text{ Citotoxicidad} = 100 - [(A570 \text{ A} / A570 \text{ B}) \times 100] \quad (2)$$

Donde A): Células tratadas y B): Células no tratadas.

### **6.7 Determinación del índice de selectividad**

Los índices de selectividad (IS) se determinaron para evaluar el potencial citotóxico en las células tumorales en relación con la toxicidad en las células normales, donde el alto IS indica una alta potencia y baja toxicidad celular (Mansour et al., 2022). En nuestro estudio, se consideró que las muestras con valores de IS mayores de tres poseen una alta selectividad para las células tumorales (Bezivin et al., 2003). Los IS del extracto de *Bacillus endófitos* se calcularon dividiendo el IC<sub>50</sub> de las células normales (PBMC) por el de las células tumorales (L5178Y-R), utilizando la siguiente fórmula (3):

$$\text{IS} = (\text{IC}_{50} \text{ de células sanas}) / (\text{IC}_{50} \text{ de células tumorales}) \quad (3)$$

### **6.8 Estandarización en la producción de biomasa y optimización de extractos**

Para la estandarización de la producción de biomasa y rendimiento de extractos fueron tomados en cuenta dos factores importantes, los medios de cultivos y la suplantación de carbono de estos. Para esto las cepas bacterianas se fermentaron en caldo nutritivo, caldo nutritivo con manitol, caldo ISP2 y ISP2 con manitol, usando las siguientes condiciones:

agitación 180 rpm + inóculo de  $1 \times 10^6$  células/mL a temperatura ambiente durante 7 días. Una vez transcurridos los tiempos de incubación fueron preparados y evaluados los extractos como se describen en los apartados 6.4, 6.6 y 6.7.

### 6.9 Evaluación de la actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos a base de los *Bacillus* endófitos, incubamos 100  $\mu$ L de los extractos a concentraciones que van desde 3.9  $\mu$ g/mL a 500  $\mu$ g/mL más 100  $\mu$ L de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil de 0.1 mM (DPPH; Sigma-Aldrich) en microplacas de 96 pozos de fondo plano durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, después de lo cual se determinaron las densidades ópticas (DO) a 517 nm. Se utilizó DMSO como control negativo y ácido ascórbico como control positivo (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU) a concentraciones que oscilan entre 0.2  $\mu$ g/mL y 250  $\mu$ g/mL. La inhibición porcentual de la DPPH se calculó utilizando la siguiente fórmula (4):

$$\% \text{ de inhibición DPPH: } \frac{\text{DO tratamiento} - \text{DO control negativo}}{\text{DO control negativo}} \times 100 \quad (4)$$

### 6.10 Evaluación de la actividad hemolítica y anti-hemolítica

Para estos análisis se obtuvieron 20 mL de sangre de un voluntario sano en tubos con anticoagulante (BD Vacutainer K2 EDTA; Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Los glóbulos rojos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato PBS (pH 7.2) y se preparó una suspensión de eritrocitos al 5 % en PBS estéril. Para la evaluación de la actividad hemolítica en tubos de 2 mL, se incubaron los extractos a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.6  $\mu$ g/mL junto con la suspensión de eritrocitos al 5 % durante 30 min a 37 °C. Después, se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 13,000 rpm (Elizondo et al., 2021), utilizando agua destilada como control positivo para la hemólisis y PBS como control negativo. Para la evaluación del efecto anti-hemolítico, se incubó dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), el cual fue preparado a una concentración de 150 mM en PBS. se colocó el extracto, el AAPH y la suspensión de eritrocitos en un tubo de 2 mL incubándose durante 5 h a 37 °C a 200 rpm en la oscuridad utilizando una incubadora giratoria (MaxQ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.

UU.), como control negativo fueron utilizados la suspensión de eritrocitos sin AAPH y como control positivo la suspensión de eritrocitos con AAPH (Elizondo-Luévano et al., 2021). En ambos casos, se tomaron 200  $\mu$ L del sobrenadante de cada tubo y se transfirieron a una microplaca de 96 pozos de fondo plano para medir la DO de la hemoglobina liberada a 540 nm en un lector de microplacas (Elizondo-Luévano et al., 2021). El porcentaje de hemólisis y actividad anti-hemolítica para cada muestra se calculó utilizando las siguientes fórmulas (5) y (6) respectivamente:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{DO \text{ tratamiento} - DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}} \times 100. \quad (5)$$

$$\% \text{ Inhibición AAPH} = (1) - \frac{DO \text{ tratamiento} - DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}} \times 100. \quad (6)$$

## 6.11 Pruebas químicas para la identificación de compuestos

El extracto que mostró mayor actividad biológica *in vitro* fue sometido a un examen químico, donde se evaluó la presencia de alcaloides, carbohidratos, cumarinas, insaturaciones (dobles enlaces), flavonoides, quinonas, saponinas, sesquiterpenos lactonas, esteroides y taninos (grupos fenólicos). Estas pruebas demuestran la presencia o ausencia de diferentes grupos de compuestos.

### 6.11.1 Esteroides y terpenos (Prueba de Salkowski)

Se disolvió una cantidad de 5  $\mu$ g del extracto en 2 mL de cloroformo y posteriormente se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se consideró una reacción positiva para los esteroides y metilesteroides cuando se formó un anillo marrón rojizo en la interfaz (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.2 Prueba de cumarina**

Se disolvió una cantidad de 5 µg del extracto en 2 mL de metanol y se añadió dos gotas de NaOH al 10 %. La prueba se consideró positiva si presentaba una coloración amarilla y si desaparecía al acidificar la solución (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.3 Sesquiterpeno-lactonas (prueba de Baljet)**

Se disolvió una cantidad de 5 µg del extracto en 2 mL de cloroformo y se agregaron tres gotas de la solución mixta, indicándose resultado positivo si viró de naranja a rojo oscuro. La solución mixta 1:1 constaba de la Solución A, que contenía 1 % de  $C_6H_3N_3O_7$  en etanol, y la Solución B, que contenía 10 % de NaOH (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.4 Quinonas (prueba de NaOH)**

En un tubo de ensayo se añadieron 5 µg del extracto, 3 gotas de etanol y 3 gotas de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 %. Se observa si hay formación de color (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.5 Saponinas (prueba de $NaHCO_3$ )**

Se preparó la solución acuosa de  $NaHCO_3$  al 10 %, luego se disolvieron 5 µg del extracto en 2 mL de metanol y se agregaron cuatro gotas de  $H_2SO_4$  concentrado. Se agitó ligeramente y se añadieron cuatro gotas de la solución de  $NaHCO_3$ . La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indican la presencia de saponinas (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.6 Flavonoides (Prueba $H_2SO_4$ )**

Se disolvió una cantidad de 5 µg del extracto en 2 mL de  $H_2SO_4$ , la prueba se considera positiva para flavonoides si la coloración es amarilla, naranja para flavonas, rojo azulado para chalconas y rojo violeta para las quinonas (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.7 Compuestos Fenólicos (Taninos)**

Se disolvió 5 µg del extracto en 2 mL de cloroformo y luego se agregaron cuatro gotas de  $FeCl_3$  al 2.5% en agua. Se consideró positiva la aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.8 Carbohidratos (prueba de Molish)**

A 5 µg del extracto se añadió una gota del reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol) y luego se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a través de las paredes del tubo de ensayo. La prueba se consideró positiva si se formó un anillo de color púrpura en la interfaz (Rodríguez-Garza et al., 2023).

### **6.11.9 Alcaloides (prueba de Dragendorff)**

Se disolvió una cantidad de 5 µg del extracto en 2 mL de cloroformo y se agregaron cuatro gotas de reactivo de Dragendorff; la prueba se consideró positiva si estaba presente una coloración rojo-naranja persistente. Para preparar el reactivo se utilizaron dos soluciones: la Solución A, que contenía 0,85 g de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, que se mezcló con 10 mL de CH<sub>3</sub>COOH y 40 mL de agua, y la Solución B, que contenía 8 g de KI disueltos en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 2.5 mL de la solución A, 2 mL de solución B y 50 mL de agua (Rodríguez-Garza et al., 2023).

## **6.12 Separación y evaluación de particiones bioactivas**

Partiendo del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27 (*Bacillus subtilis*) con una cantidad de 3.0 gr se llevó a cabo el fraccionamiento en un extractor Soxhlet y 500 mL de cada uno de los solventes (hexano, cloroformo y metanol absoluto) (CTR Scientific, Monterrey, N.L., México). La extracción se mantuvo durante 24 h para cada solvente, después cada partición se concentró por rota vaporación al vacío con un evaporador rotativo (Buchi R-3000; Brinkman Instruments, Inc., Westbury, NY, EE. UU.). Después 50 mg de cada partición fue suspendido en 0.5 mL de DMSO esterilizado por filtración, utilizando filtros de membrana de tamaño de poro de 0,22 µm (Corning Incorporated, Corning, NY, EE. UU.), y almacenado a -20 °C hasta su uso. La concentración final de DMSO utilizada en cultivos celulares fue inferior al 1 % (v/v), lo que no afectó a la viabilidad celular (Romero-Arguelles et al., 2022). Posteriormente, se evaluaron los rendimientos de las particiones y su actividad biológica tanto en células de linfoma L5178Y-R como en PBMC como se describen en el apartado 6.4, 6.6 y 6.7.

## **6.13 Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina nos permitió revisar la pureza de las particiones del extracto. Esta consistió en una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica gel. La

mezcla para separar fue disuelta en una pequeña cantidad de solvente, se colocó mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatopla. Ésta se introdujo en una cuba cromatográfica la cual contenía una cierta cantidad de la fase móvil Cloroformo:Metanol (90:10) (eluyente). Una vez terminado el proceso de separación, se sacó la cromatopla de la cuba y se secó al aire libre. Posteriormente se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta, donde se observaron los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatopla.

#### **6.14 Evaluación de genes relacionados con vías de muerte celular en células de linfoma murino**

Para la evaluación de las principales vías de muerte, primero fueron tratadas las células de linfoma L5178Y-R en placas de 6 pozos con la IC<sub>50</sub> del extracto ISE-B27 (*Bacillus subtilis*) por 24 h después se procedió a realizar una extracción de RNA por Trizol, seguido de una PCR punto final para cada gen evaluado (Tabla 1). Finalmente se evaluó la expresión mediante densitometría por cada gen respecto al control negativo (células sin tratamiento). Las técnicas empleadas se describen a detalle en los apartados siguientes.

##### **6.14.1 Extracción de ARN total**

La extracción de ARN total de todos los tratamientos utilizados se realizó bajo el método de TRIZOL. Para la extracción de ARN total se partió de placas de 6 Pozos (Nest Biotechnology, Rahway, NJ, EE. UU.) donde se realizaron los tratamientos. Antes de empezar, se realizó un lavado con 2 mL de PBS 1X. Las células fueron concentradas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, después se colocaron 500 µL de TRIZOL, se homogenizó mediante pipeteo hasta observar la lisis total de las células y posteriormente se incubó en hielo por 5 min. Después se adicionaron 100 µL de cloroformo, se homogenizó nuevamente y se incubó en hielo por 3 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 15 min, se retiró cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, al cual se le adicionaron 400 µL de isopropanol. La mezcla se homogenizó por inversión y se incubó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante con cuidado de no remover la pastilla de RNA, se adicionó 1 mL de etanol absoluto, se homogenizó por inversión, se centrifugó a 12,000 rpm por 7 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75%. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C, se retiró todo el sobrenadante y se colocó en la campana de flujo

laminar por 15 min para secar la pastilla de ARN. El ARN obtenido se suspendió en 20  $\mu$ L de agua destilada estéril, se cuantificó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **6.14.2 Síntesis de ADNc**

El ARN total de las células tratadas se sometió a una transcripción inversa con el kit *Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, EE. UU.) El protocolo de la reacción se usó a un volumen final de 20  $\mu$ L. Para la primera parte, en tubos de microcentrífuga de 0.2 mL se agregó 1  $\mu$ L de RNA (1000 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de Oligo (dT) primer (0.5  $\mu$ g) y 3  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, después se le dio un spin en microcentrífuga y fue colocado en el termociclador durante 5 min a 70 °C. Para la segunda parte se le agregaron 15  $\mu$ L de una mezcla conformada por lo siguiente: 4  $\mu$ L de Reverse Transcription 10X Buffer, 1.2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1  $\mu$ L de dNTP mix, 1  $\mu$ L de la enzima AMV Reverse transcriptase (HC) y 9.8  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Una vez colocado el mix los tubos se colocaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min, 70 °C por 15 min y finalmente 4 °C como extensión final. Al término de la reacción, los productos de RT-PCR se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### **6.14.3 Análisis de expresión de genes (PCR punto final)**

Se analizó la expresión relativa de Cas3, Bcl-2, Bax, p53, PARP1, NFK $\beta$ , AKT y NRF2 en células de linfoma murino L5178Y-R tratadas y no tratadas, mediante la técnica de PCR en tiempo real, en el cual se utilizó como gen endógeno GAPDH. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 12.5  $\mu$ L, usando el Kit GoTaq<sup>®</sup> Green Máster Mix (Promega), utilizando 6.25  $\mu$ L de SYBR Máster 2x, 1.25  $\mu$ L de cada oligonucleótido (1  $\mu$ M) (Tabla 1), 2  $\mu$ L de ADNc (diluido 1:5) y 1.75  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Después fueron colocados en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C, luego una extensión final de 5 min a 72 °C. Finalmente para analizar la amplificación del producto de PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100 Volts constantes por 50 min. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio durante 15 min y se reveló mediante luz ultravioleta en un transiluminador (UVP, Upland, CA, EE. UU.). El análisis de expresión se realizó mediante densitometría utilizando el programa ImageJ.

**Tabla 1.** Genes involucrados en señalización celular

Nombre	Secuencias de primers (5' to 3')		Tamaño de nucleotidos	Referencia
	Forwad	Reverse		
Cas3	5'-ATG GGA GCA AGT CAG TGG AC -3'	5'-CGT ACC AGA GCG AGA TGA CA -3'	84	Azimi et al. 2021
BCL-2	5'-GAG CGT CAA CAG GGA GA-3'	5'-GCC AGG AGA AAT CAA ACA -3'	164	Azimi et al. 2021
BAX	5'-ACT AAA GTG CCC GAG CTG A-3'	5'-ACT CCA GCC ACA AAG ATG GT -3'	161	Azimi et al. 2021
P53	5'-TGG CTC TGA CTG TAC CAC CAT CC -3'	5'- CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA GC-3'	491	Al-Zharani et al. 2021
PARP1	5'- AGG CCC TAA AGG CTC AGA AT-3'	5'-CTA GGT TTC TGT GTC TTG AC-3'	470	Rahman et al. 2021
NFKβ	5'-AAC AAA ATG CCC CAC GGT TA-3'	5'-GGG ACG ATG CAA TGG ACT GT-3'	113	Rahman et al. 2021
AKT	5'- TGG ACT ACC TGC ACT CGG AGA A-3'	5'-GTG CCG CAA AAG GTC TTC ATG G-3'	155	Zein et al. 2022
NRF2	5'-CAC ATC CAG TCA GAA ACC AGT GG-3'	5'-GGA ATG TCT GCG CCA AAA GCT G-3'	112	Gao et al. 2022
GADPH	5'-GGT ATC GTG GAA GGA CTC ATG AC-3'	5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'	188	Al-Zharani et al. 2021

### 6.15 Modelo *in vivo*

Para la evaluación de la toxicidad aguda del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27 fueron seleccionados 4 grupos de 3 ratones hembra BALB/c cada uno. Los ratones permanecieron 5 días en aclimatación antes de la administración, a la par se desparasitaron con 2 mL/kg de Averdan (mebendazol; Sima-Aldrich). Antes de la administración, los ratones fueron puestos en ayunas de 3-4 h dejando el agua previa a la administración y dejando 1-2 h después de la administración. Las dosis del extracto fueron administradas por vía intraperitoneal en un volumen no mayor a 1 mL/100 g a concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/kg, utilizando como vehículo 90% PEG 300, 5% DMSO y 5% etanol. Una vez administrados los tratamientos, los ratones fueron monitoreados (Score clínico) (Tabla 2) cada 30 min por las primeras 4 h, después cada 24 h durante 14 d. Posteriormente, los ratones fueron anestesiados con 25-40 mg/kg de pentobarbital sódico y una vez anestesiados, se procedió a realizarles punción cardiaca. La sangre fue recolectada en un microtainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y una vez hecha la punción cardiaca se procedió a darles eutanasia a los ratones mediante dislocación cervical. Los microtainer fueron centrifugados a 3000 RPM por 5 min para separar el suero.



**Tabla 2.** Criterios evaluados para la eutanasia en los ensayos *in vivo*

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

Pérdida de peso  $\geq 20\%$  o score clínico  $\geq 3$  sacrificio obligatorio

### 6.15.2 Evaluación de la función hepática

A partir del suero recolectado en los ensayos *in vivo*, se llevó a cabo la evaluación de la función hepática midiendo los niveles de transaminasa glutámica oxalacética, transaminasa glutámica pirúvica, deshidrogenasa de ácido láctico, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, bilirrubina directa e indirecta, colesterol, albúmina y proteínas totales, con la ayuda del servicio externo del Laboratorio de Análisis Químico Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

### 6.15.3 Determinación de la actividad antitumoral *in vivo*

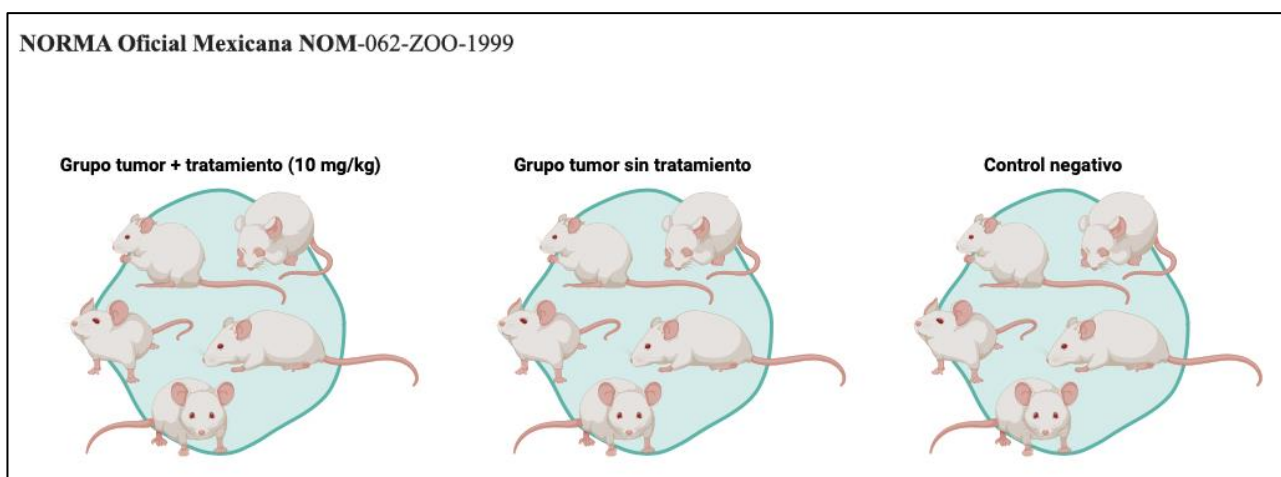
Se utilizó el modelo experimental en ratones BALB/c, al cual se le administró el linfoma murino L5178Y-R, previamente descrito (Gomez-Flores et al., 2005) (Figura 2). Los ratones fueron inoculados *vía* intramuscular (*im*) sobre el muslo de la extremidad posterior derecha con  $1 \times 10^6$  células del linfoma L5178Y-R suspendidas en un volumen de 200  $\mu$ L de PBS. Después de 7 d (tiempo en el cual se forma el tumor de aproximadamente 1  $\text{cm}^3$ ), se administraron los tratamientos cada dos días durante 14 d, sumando un total de 3-4 inoculaciones.

Las medidas del volumen tumoral y peso se registraron siete días después de la inoculación del tumor, en un esquema de 14 d con frecuencia de cada 2 d. El volumen tumoral se calculó midiendo largo y ancho (mm) del tumor con la ayuda de un vernier digital (Mitotoyo, Japón) utilizando la siguiente fórmula (7):

$$\text{Volumen tumoral: } \frac{(\text{Largo} \times \text{Ancho})}{2} \quad (7)$$

La sobrevida se monitoreo diariamente y se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (8):

$$\% \text{ de sobrevida} = \frac{(\# \text{ de ratones sobrevivientes} \times 100\%)}{(\# \text{ total de ratones})} \quad (8)$$



**Figura 2.** Modelo experimental *in vivo*.

### 6.16 Análisis Estadísticos

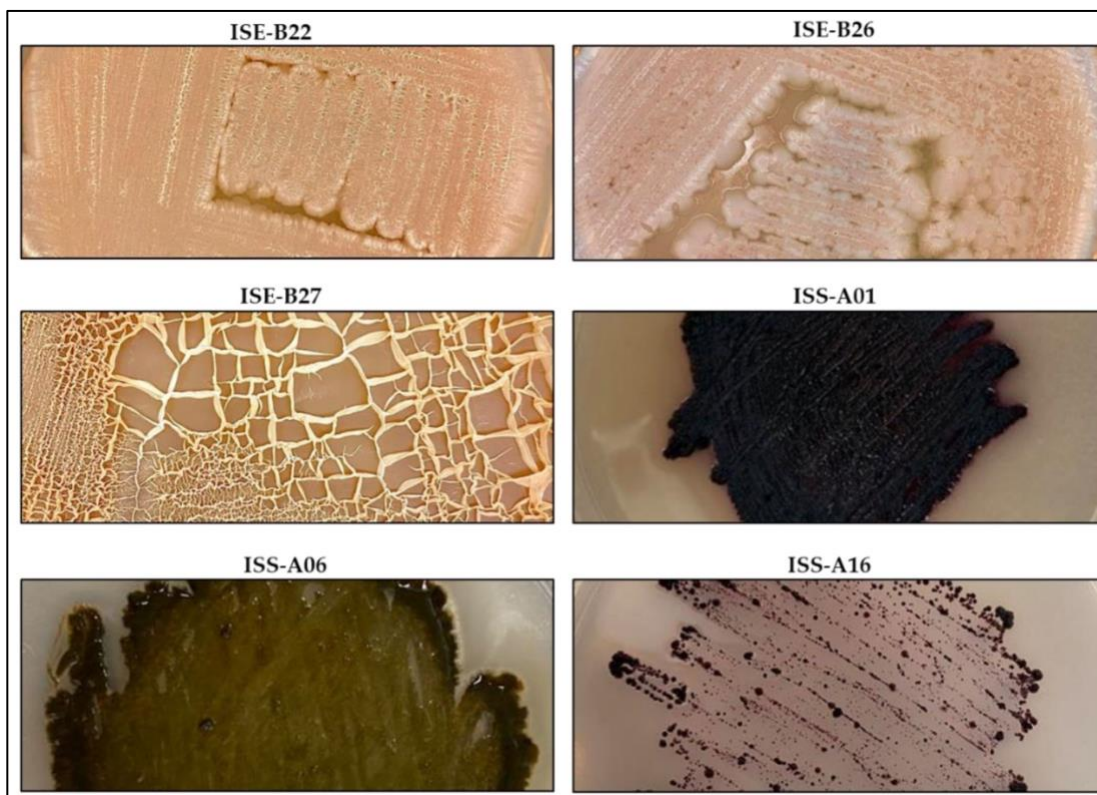
Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento y al menos tres experimentos independientes. El nivel de significancia se evaluó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Las representaciones gráficas y análisis estadístico se calcularon utilizando el paquete de software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). El análisis estadístico determinó la distribución de los datos obtenidos para cada variable (datos *in vivo* e *in vitro*) estudiada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y posteriormente se realizó una comparación por análisis de varianza (ANOVA). Para los datos con una distribución normal predominante se empleó la prueba de una vía. En los casos que se encontró diferencia entre los grupos, se empleó la prueba *t* de Student para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media  $\pm$  SD del grupo control contra cada una de las concentraciones de los tratamientos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento de bacterias endófitas de *Ibervillea sonorae*

Se aislaron 26 bacterias endófitas las cuales presentan diferentes características morfológicas tales como color, forma y tamaño (Figura 3, Tabla 3). La mayoría de los endófitos aislados crecieron en medio Agar Flour Manitol.

Morfológicamente, las bacterias mostraron diferentes formas de crecimiento en el agar de manitol de flúor y el agar ISP4 (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) (Figura 4). Las bacterias endofíticas (ISE) generalmente mostraron un crecimiento irregular, color blanco y bordes ondulados (Tabla 3). Después de 28 d de fermentación, los rendimientos de extracto de metanol fueron del 1.67 % a 3.57 %, mientras que los extractos de acetato de etilo tuvieron rendimientos del 0.11 % al 0.3 % (Tabla 3).



**Figura 3.** Bacterias endofitas aisladas de *Ibervillea sonorae*.

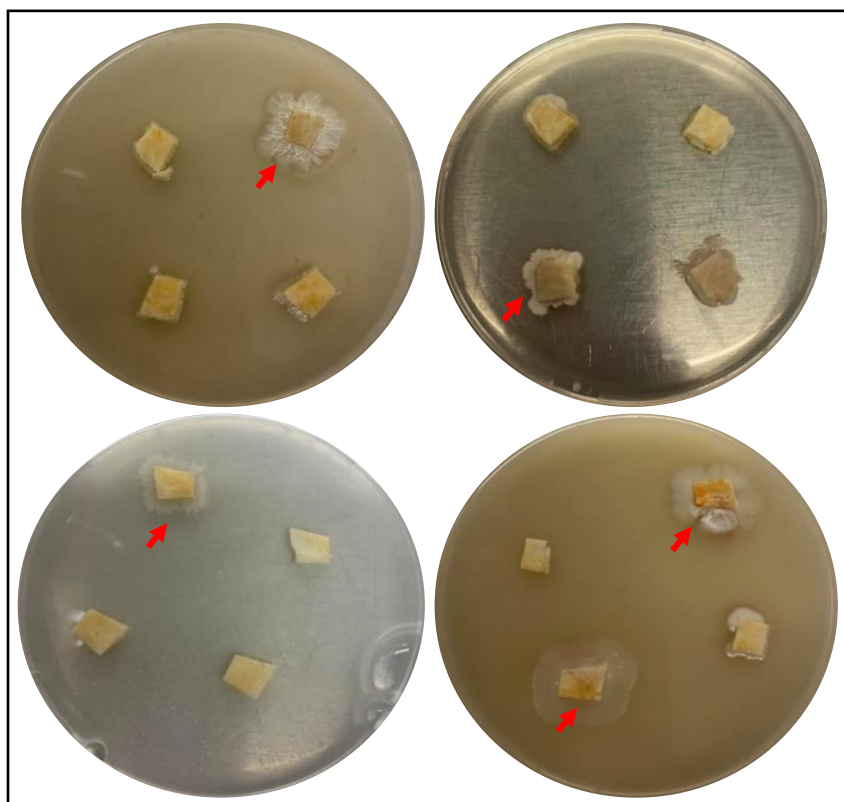
**Tabla 3.** Caracterización morfológica y rendimientos de extractos.

Bacteria	Color	Forma	Tamaño	Rendimiento EtOAc	Rendimiento MetOH
ISE-B22	#FFD39B	Puntiforme	P	15 mg	1.67%
ISE--B26	#CDAA7D	Filamentosa	I	6 mg	1.69%
ISE-B27	#DEB887	Filamentosa	G	8 mg	3.57%

\*Tamaño (diámetro en milímetros): P=pequeñas (<2mm); I=Intermedias (2-3mm); G=Grande (>3mm).

\*Los rendimientos de los extractos a base de EtOAc están calculados por cada 50 ml de sobrenadante.

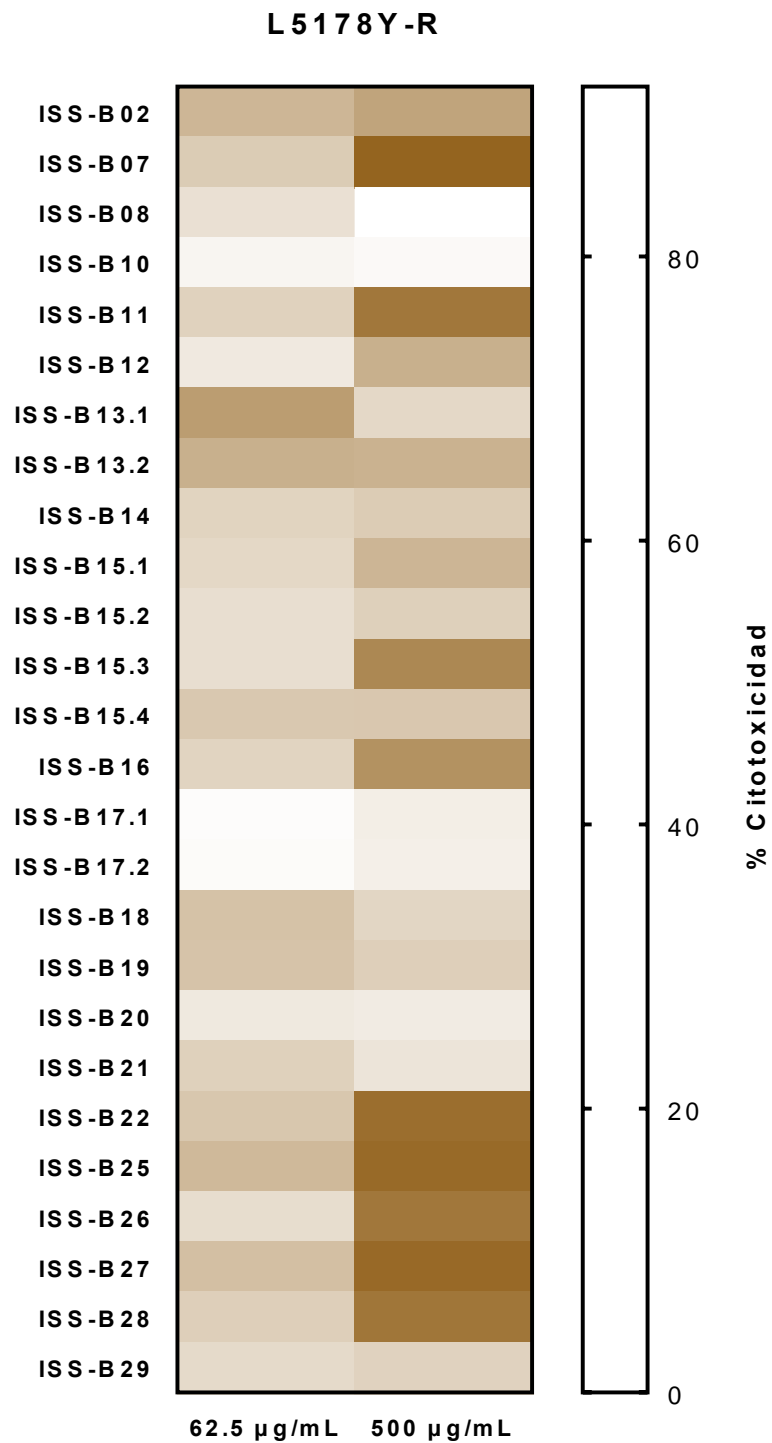
\*Los colores de las colonias se determinaron en base a la gama de colores de la página web <http://www.webusable.com/coloursTable.htm> (consultado el 22 de Octubre del 2021)



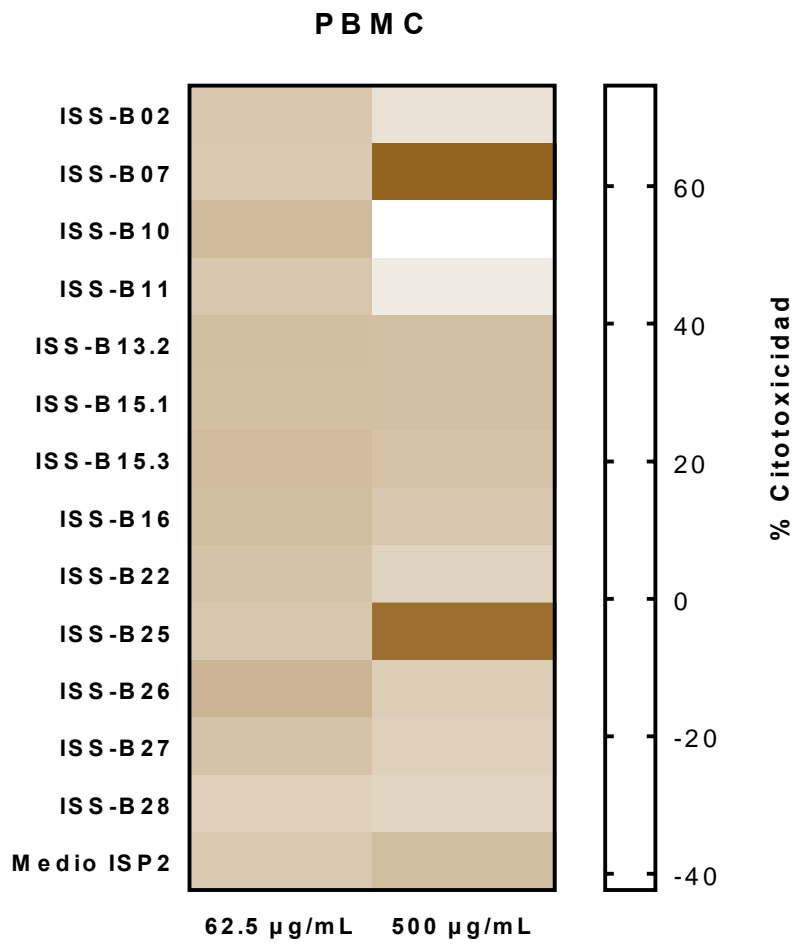
**Figura 4.** Crecimiento de bacterias endófitas de *Ibervillea sonora* en diferentes medios selectivos.

## **7.2 Selectividad e inhibición de crecimiento de células de linfoma L5178Y-R por extractos acuosos de bacterias endofitas aisladas de *Ibervillea sonora***

Las cepas fueron fermentadas de 1 a 4 semanas en caldo ISP2 para determinar la semana en que se produce mayor cantidad de fracciones bioactivas. Obteniéndose resultados estadísticamente significativos  $p < 0.05$  a las 3 y 4 semanas de fermentación en la evaluación *in vitro* con la línea celular de linfoma murino L5178Y-R utilizando la técnica de reducción del MTT. Se evaluó la citotoxicidad de 26 extractos acuosos a 62.5  $\mu\text{g/mL}$  y 500  $\mu\text{g/mL}$  contra el linfoma mediante la técnica del MTT e se seleccionaron aquellos que presentaban arriba del 40% de citotoxicidad (un total de 13 bacterias). Para determinar la selectividad de estos extractos, se evaluaron los 13 extractos en PBMC dando como resultado 7 extractos que no presentaban citotoxicidad ( $< 10\%$  citotoxicidad) en células sanas (Figuras 5 y 6). Por motivos de continuidad y presupuesto fueron seleccionadas las 3 bacterias con mejor  $\text{IC}_{50}$  y  $\text{IS}$  hacia células de linfoma (ISE-B22, ISE-B26 y ISE-B27).



**Figura 5.** Mapa de calor del efecto citotóxico en células de linfoma murino L5178Y-R.

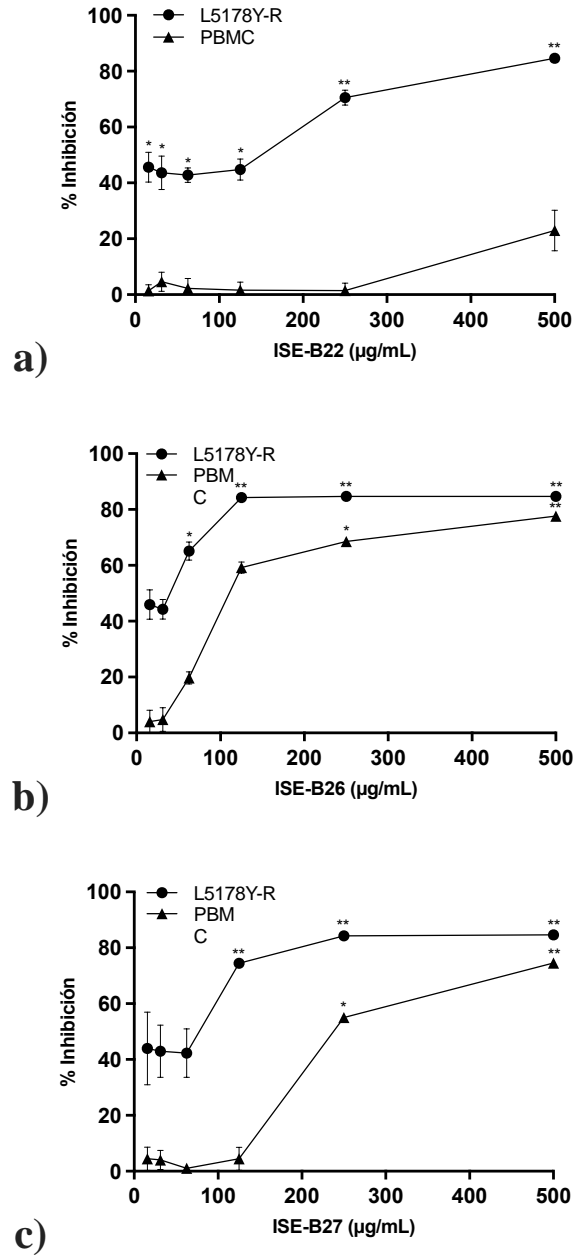


**Figura 6.** Mapa de calor del efecto de citotóxico en células mononucleares de sangre periferica.

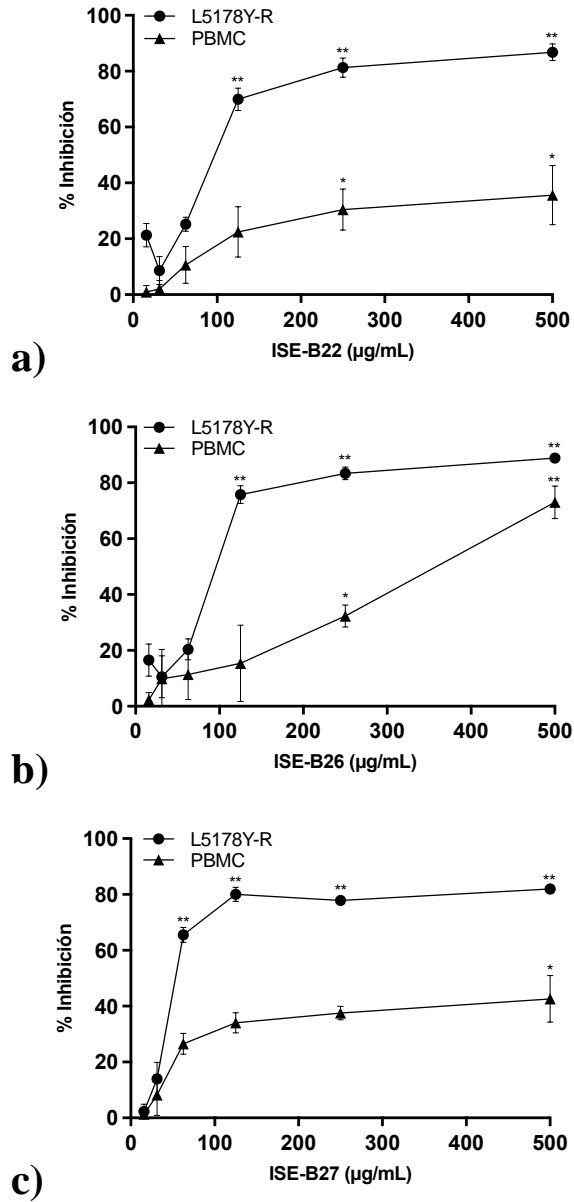
### **7.3 Efecto de extractos de bacterias endófitas de *I. sonoreae* en el crecimiento de células de linfoma L5178Y-R**

Se evaluó el efecto de los extractos de metanol y acetato de etilo de bacterias aisladas a las concentraciones de 15.62, 31.25, 62.50, 125, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$  contra células del linfoma murino L5178Y-R y PBMC humanas. Como resultado, los extractos bacterianos de metanol y acetato de etilo inhibieron el crecimiento de células L5178Y-R (Figuras 7 y 8). El extracto de metanol de la cepa endófito ISE-B27 causó la  $\text{IC}_{50}$  más baja a una concentración de 60.03  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el extracto de acetato de etilo de la bacteria ISE-B26 mostró una menor  $\text{IC}_{50}$  a 26  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 4). El extracto de acetato de etilo de la bacteria ISE-B26 presentó el mayor porcentaje de inhibición con 89.18 % ( $p < 0.01$ ) a 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 7). Con base a la  $\text{IC}_{50}$ , se calculó el IS, obteniendo un mejor IS para el extracto a base de acetato de etilo para la bacteria ISE-B22 (11.8), mientras que para los extractos metanólicos, el mejor IS fue para la bacteria ISE-B27 (13) (Tabla 4). Esto demuestra que los extractos a base de bacterias endófitas de *I. sonoreae* inhiben de manera selectiva el crecimiento de células del linfoma murino L5178Y-R.





**Figura 7.** Inhibición del crecimiento tumoral de extractos de acetato de etilo de bacterias endófitas de *I. sonorensis*. a) ISE-B22, b) ISE-B26, c) ISE-B27. Como control positivo fue utilizado Vincristina (VC) a una concentración de 0.05 µg/mL. VC causó 69.98% y 16% de citotoxicidad para L5178Y-R y PBMC respectivamente.



**Figura 8.** Inhibición del crecimiento tumoral de extractos metanólicos de bacterias endófitas de *I. sonorae*. a) ISE-B22, b) ISE-B26, c) ISE-B27. Como control positivo fue utilizado Vincristina (VC) a una concentración de 0.05 µg/mL como se detalla en el texto. VC causó 69.98% y 16% de citotoxicidad para L5178Y-R y PBMC respectivamente.

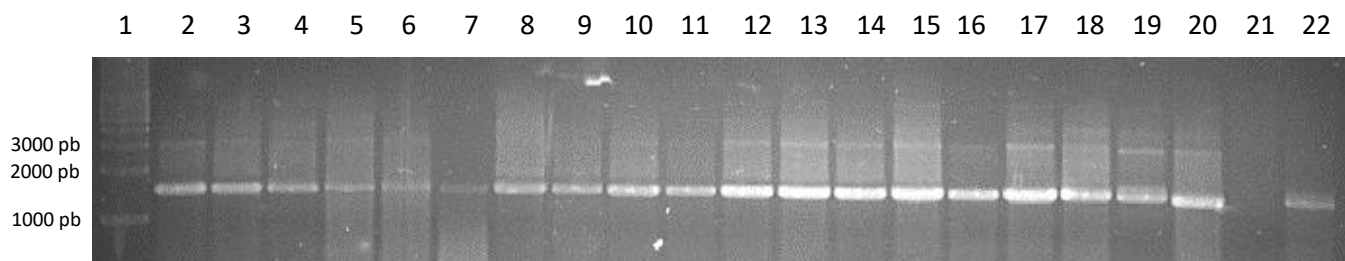
**Tabla 4.** Índice de selectividad y IC<sub>50</sub> de los extractos de las bacterias aisladas contra células de linfoma murino L5178Y-R y células mononucleares de sangre periférica humana.

Muestras	Acetato de etilo IC <sub>50</sub> (µg/mL)			Metanol IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	L5178Y-R	PBMC	IS	L5178Y-R	PBMC	IS
ISE-B22	56.83±1.143	669.3±0.127±1.289	11.8	94.7±1.528	724±1.116	7.6
ISE-B26	26±1.404	136.1±1.625	5.2	91.82±1.564	325.3±1.54	3.5
ISE-B27	39.74±1.217	267±1.768	6.7	60.03±1.476	781.1±0.892	13.0

Los valores representan la media ± SD de tres repeticiones por tratamiento y al menos 3 experimentos independientes (n = 3).

#### 7.4 Identificación molecular y espectrometría de masas de bacterias endófitas y de rizosfera de *I. sonorae* con actividad citotóxica

Se realizó la identificación molecular de las bacterias endófitas de *I. sonorae* que presentaban mayor efecto citotóxico contra la línea celular L5178Y-R (Figura 8). La región amplificada 16S (Figura 9) de las bacterias aisladas fue secuenciada y analizada utilizando la base de datos BLAST. Las bacterias ISE-B22, ISE-B26 y ISE-B27 se identificaron como *Bacillus sp.* con 99.39 %, 99.54 % y 100 % de identidad, respectivamente (Tabla 5).



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1, Marcador de pares de bases de 1kb. Carril 2-22, Gen ribosomal 16S específico para bacterias.

Las bacterias fueron identificadas adicionalmente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, dado a que algunas de las bacterias tienen el genoma muy conservado en la región ribosomal 16s para su identificación a nivel especie. Las bacterias ISE-B22, ISE-B26 y ISE-B27 se identificaron como *Bacillus subtilis* con un score de 2.50, 2.57 y 2.12, tomando en cuenta que la que los scores mayores a 2.0 aseguran la identificación a nivel género y posible identificación a nivel especie (Tabla 5).

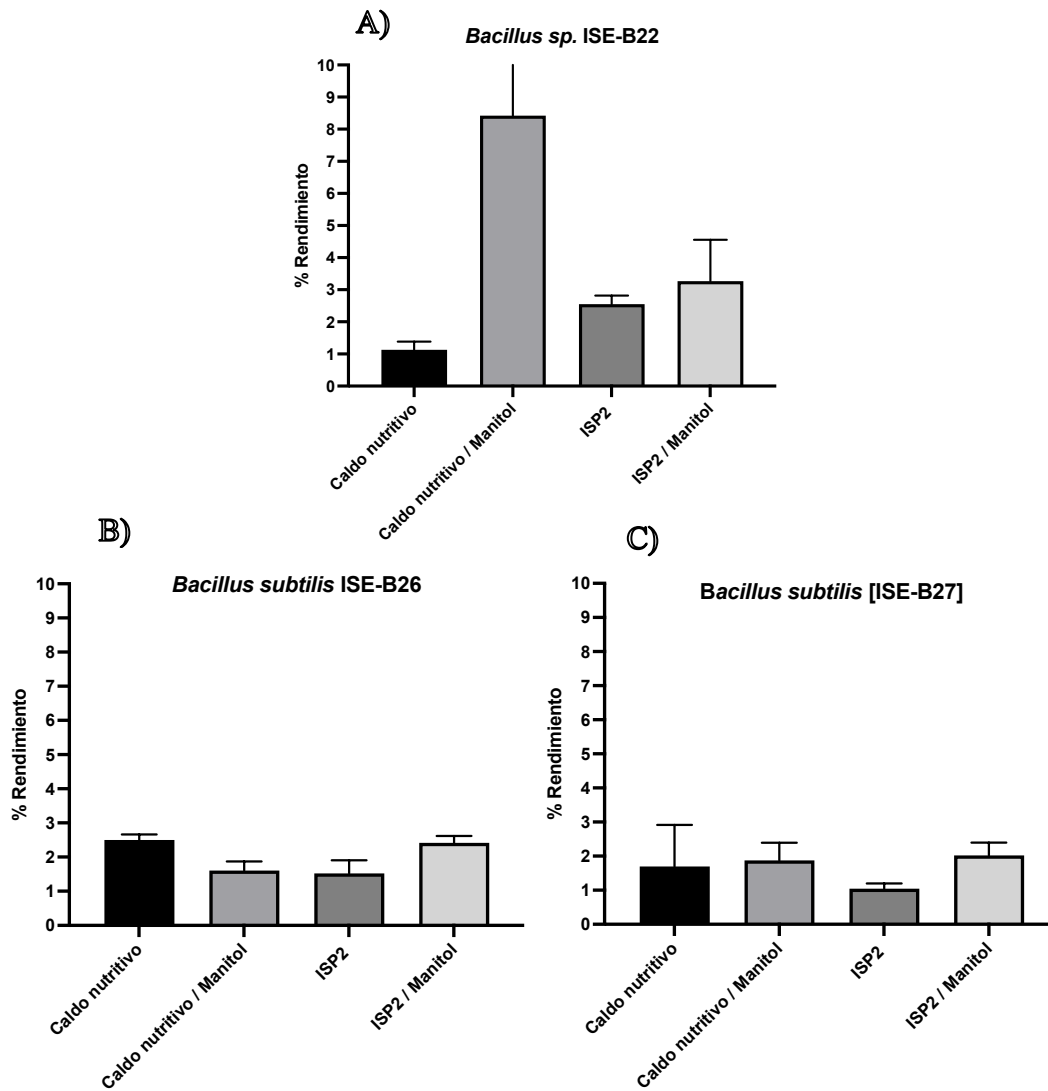
**Table 5.** Identificación molecular basada en el gen ribosomal 16s y espectrometría de masas de bacterias endófitas con actividad citotóxica.

Aislado	Gen ribosomal 16s			MALDI-TOF		Clasificación	
	Cepas en el instituto nacional para la información en Biotecnología más relacionadas	Cobertura	Valor-E	Identidad	Identificación		Scores
ISE-B22	<i>Bacillus sp.</i> (GQ340500.1)	100 %	0	99.39 %	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus mojavensis</i>	2.50	<i>Bacillus sp.</i>
ISE-B26	<i>Bacillus sp.</i> (MK966364.1)	100 %	0	99.54 %	<i>Bacillus subtilis</i>	2.57	<i>B. subtilis</i>
ISE-B27	<i>Bacillus sp.</i> (OK067785.1)	100 %	0	100 %	<i>Bacillus subtilis</i>	2.12	<i>B. subtilis</i>

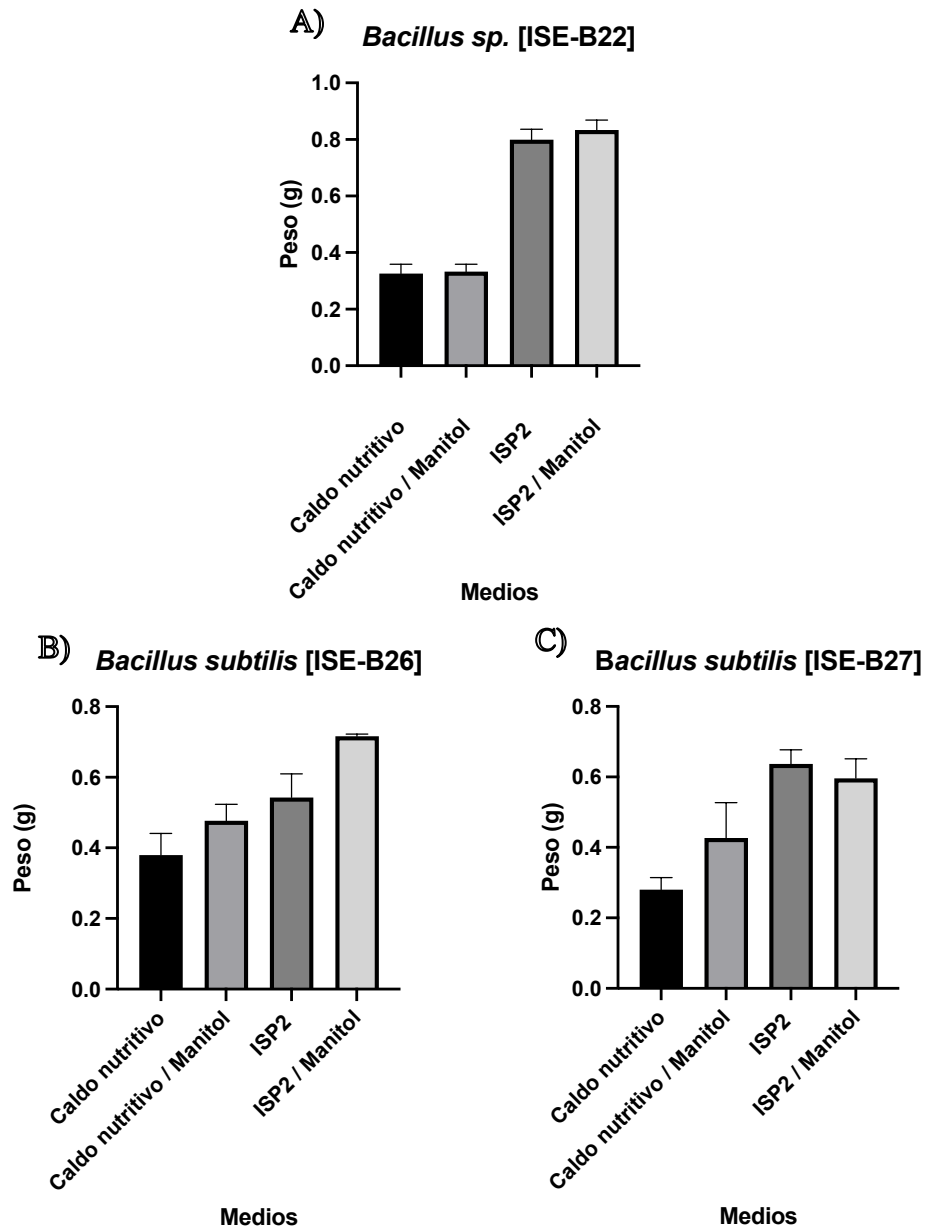
## 7.5 Estandarización en la producción de biomasa y optimización de rendimientos de extractos

Las cepas bacterianas se fermentaron en caldo nutritivo, caldo nutritivo con manitol, caldo ISP2 y ISP2 con manitol, usando las siguientes condiciones: agitación 180 RPM + inóculo de  $1 \times 10^6$  células/mL a temperatura ambiente. El rendimiento más alto observado (8.42%) fue con la cepa *Bacillus sp.* ISE-B22, después de haber sido cultivada en caldo nutritivo suplementado con manitol, en comparación con el caldo ISP2 (Figura 10 A). Para la bacteria *Bacillus subtilis* ISE-B26, se obtuvo un mayor rendimiento (2.49%) en caldo nutritivo (Figura 10 B), mientras que para la bacteria ISE-B27 se logró obtener un rendimiento de extracto de 2.02% en caldo ISP2 (Figura 10 C).

Por otra parte, se evaluó la producción de biomasa en los siguientes medios: caldo nutritivo, caldo nutritivo con manitol, caldo ISP2 y caldo ISP2 con manitol. La mayor producción de biomasa (833 mg) por cada 120 mL de caldo ISP2 suplementado con manitol le correspondió a la bacteria *Bacillus sp.* ISE-B22, en comparación con el caldo nutritivo, al igual que para la bacteria *Bacillus subtilis* ISE-B26, en la cual se logró obtener una mayor producción de biomasa en caldo ISP2 suplementado con manitol (716 mg), mientras que para la bacteria *Bacillus subtilis* ISE-B27 se logró obtener una mayor producción en caldo ISP2 (636 mg) (Figura 11).



**Figura 10.** Rendimiento de extractos metanólicos de cepas de bacterias endófitas bajo diferentes condiciones de crecimiento en diferentes medios de cultivo. (A) *Bacillus sp. ISE-B22*. (B) *Bacillus subtilis ISE-B26*. (C) *Bacillus subtilis ISE-B27*. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes.



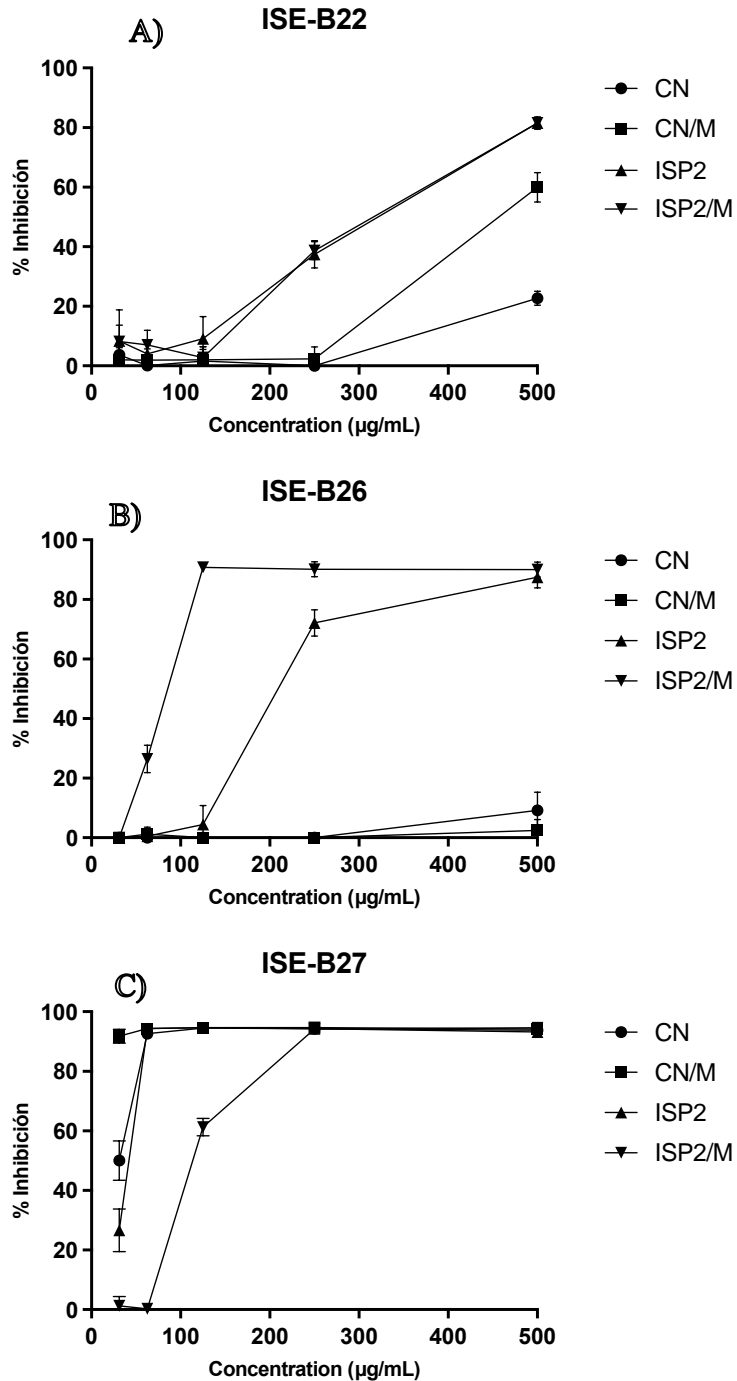
**Figura 11.** Producción de biomasa de bacterias endófitas de *Ibervillea sonora* bajo diferentes condiciones de crecimiento en diferentes medios de cultivo. (A) *Bacillus sp.* ISE-B22. (B) *Bacillus subtilis* ISE-B26. (C) *Bacillus subtilis* ISE-B27. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes.

### 7.5.1 Inhibición del crecimiento celular

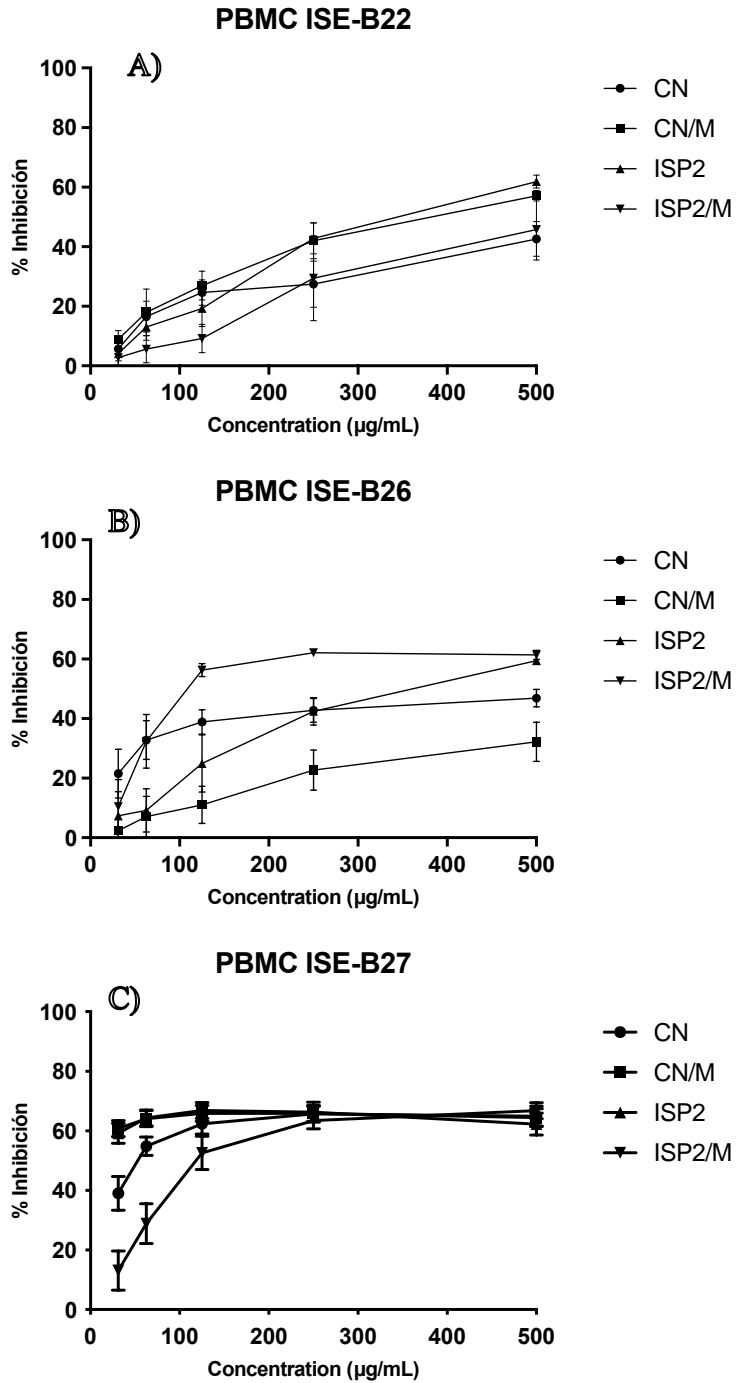
Se utilizaron concentraciones de 31.25 a 500  $\mu\text{g/mL}$  de extractos metanólicos de las bacterias endófitas de *I. sonoreae* para determinar la inhibición del crecimiento de las células del linfoma L5178Y-R y determinar la  $\text{IC}_{50}$ . Los extractos inhibieron significativamente ( $p < 0.05$ ) el crecimiento de células tumorales de una manera dependiente de la concentración (Figura 12). Para la bacteria endófitas *Bacillus sp.* ISE-B22 se logró obtener una mejor  $\text{IC}_{50}$  (31.17  $\mu\text{g/mL}$ ) con el extracto metanolico, el cual fue crecido en caldo nutritivo, mientras que para la bacteria *Bacillus subtilis* ISE-B26 se logró obtener una  $\text{IC}_{50}$  de 77.86  $\mu\text{g/mL}$  contra células de linfoma murino L5178Y-R. Por otra parte, la bacteria *Bacillus subtilis* ISE-B27 demostró una  $\text{IC}_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$  en caldo ISP2 (Figura 12).

Los extractos de las 3 bacterias endófitas fueron evaluados frente células PBMC normales y se determinó el IS. Los Extractos presentaron valores de  $\text{IC}_{50}$  superiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ , la cepa que mejor obtuvo una  $\text{IC}_{50}$  fue *Bacillus subtilis* ISE-B26 crecido en caldo nutritivo con manitol (1,070  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que las cepas *Bacillus sp* ISE-B22 y *Bacillus subtilis* ISE-B27 lograron  $\text{IC}_{50}$  mayores a 300  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13). El control positivo de vincristina causó un 85 % de células de linfoma y un 11.2 % de inhibición del crecimiento de PBMC.





**Figura 12.** Porcentaje de inhibición de células L5178Y-R mediante extractos metanólicos de bacterias endófitas de *Iberivilles sonoreae* crecidas en diferentes medios de cultivo. (A) ISE-B22, (B) ISE-B26 y (C) ISE-B27. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. Caldo nutritivo (CN), Caldo nutritivo con manitol (CN/M), Caldo ISP2 (ISP2), Caldo ISP2 con manitol (ISP2/M).



**Figura 13.** Porcentaje de inhibición de células PBMC mediante extractos metanólicos de bacterias endófitas de *Ibervillea sonorae* crecidas en diferentes medios de cultivo. (A) ISE-B22, (B) ISE-B26 y (C) ISE-B27. Los datos representan la media  $\pm$  SD de tres repeticiones por tratamiento de tres experimentos independientes. Caldo nutritivo (CN), Caldo nutritivo con manitol (CN/M), Caldo ISP2 (ISP2), Caldo ISP2 con manitol (ISP2/M).

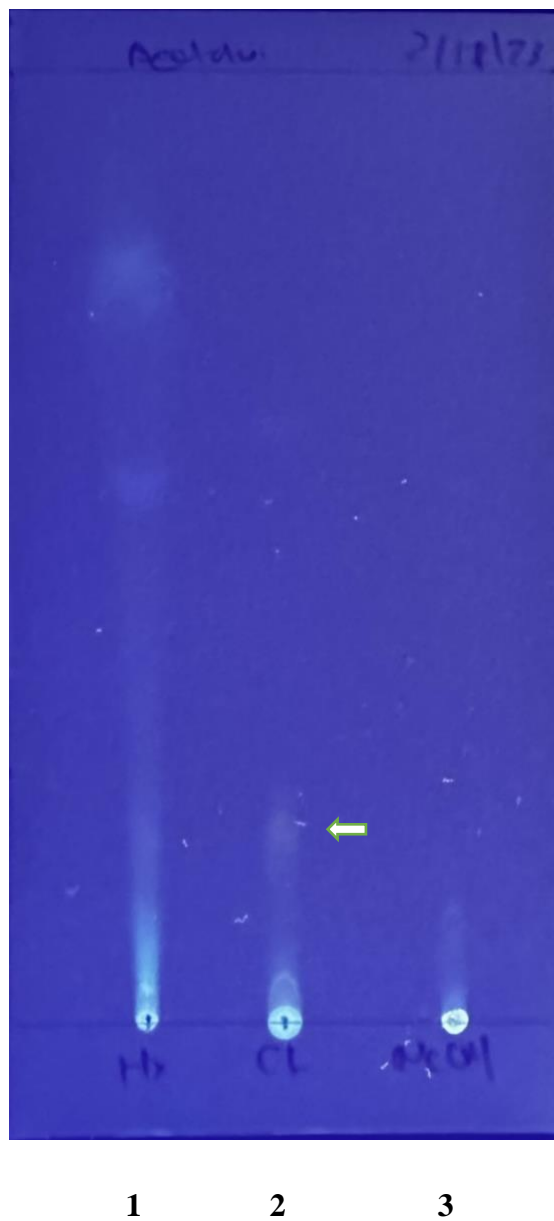
## 7.6 Separación de particiones bioactivas del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27 (*Bacillus subtilis*)

A partir del extracto crudo metanólico de la bacteria ISE-B26 (*B. subtilis*) se llevó a cabo la separación de particiones con hexano, cloroformo y metanol, dando como resultado un mejor rendimiento para la partición de cloroformo de 1,187 mg, seguido de la partición de metanol con 1,011 mg y finalmente con un menor rendimiento la partición de Hexano con 124 mg.

**Tabla 6.** Rendimientos de particiones del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 (*B. subtilis*).

Partición	mg	Rendimiento %
Hexano	124	4.59
Cloroformo	1187	43.96
Metanol	1011	37.44

Por otra parte, se realizó una cromatografía en capa fina para determinar cualitativamente la presencia de los diferentes compuestos que podrían estar presentes en las particiones del extracto (Figura 14). Lográndose observar la presencia de pocos compuestos en las particiones de Cloroformo y Metanol, lo cual esto nos podría indicar una semi purificación de estas particiones (Figura 14).



**Figura 14.** Cromatografía en capa fina del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 (*B. subtilis*). carril 1) hexano, carril 2) cloroformo, carril 3) metanol. La flecha indica los posibles compuestos presentes en las particiones.

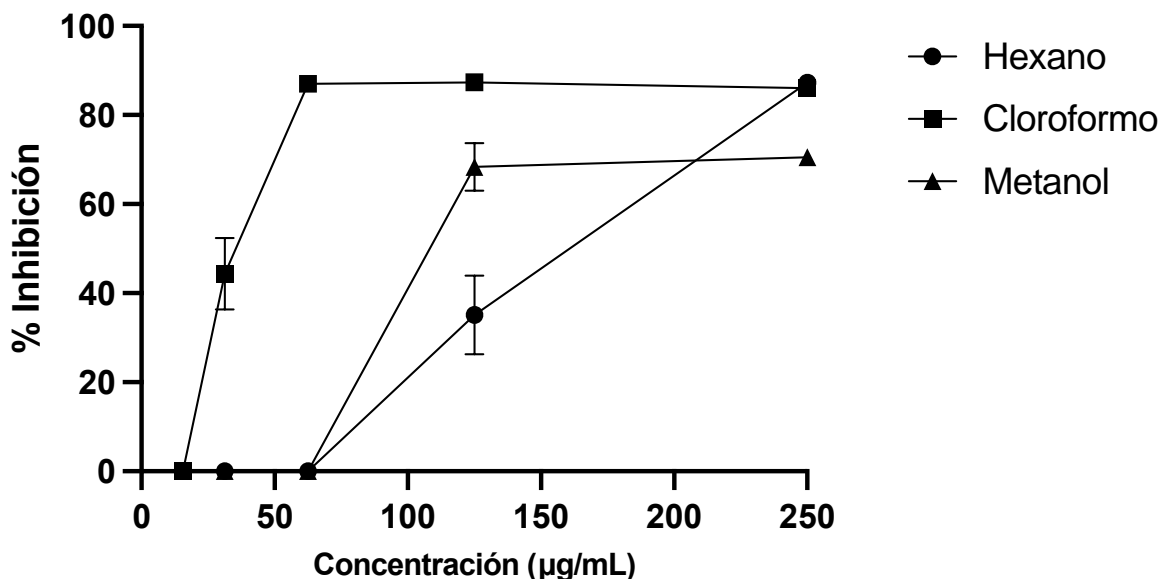
## 7.7 Evaluación de particiones bioactivas del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27 (*Bacillus subtilis*)

### 7.7.1 Inhibición de crecimiento e Índice de selectividad

Las particiones fueron evaluadas contra células de linfoma murino L5176Y-R y células PBMC de sangre periférica. Obteniendo una mejor IC<sub>50</sub> y un IS para la partición de Cloroformo de 34.62±0.180 µg/mL y 15.53 respectivamente (Tabla 7). Por otra parte, las IC<sub>50</sub> de las particiones de Hexano y Metanol resultaron ser similares con valores de 148.1±0.330 y 117.7±0.310 µg/mL, sin embargo, los IS resultaron bajos para ambos entre 3.37 y 4.24 respectivamente (Figura 15).

**Tabla 7.** IC<sub>50</sub> y índice de selectividad de las particiones del extracto metanolico de la bacteria endófito ISE-B27.

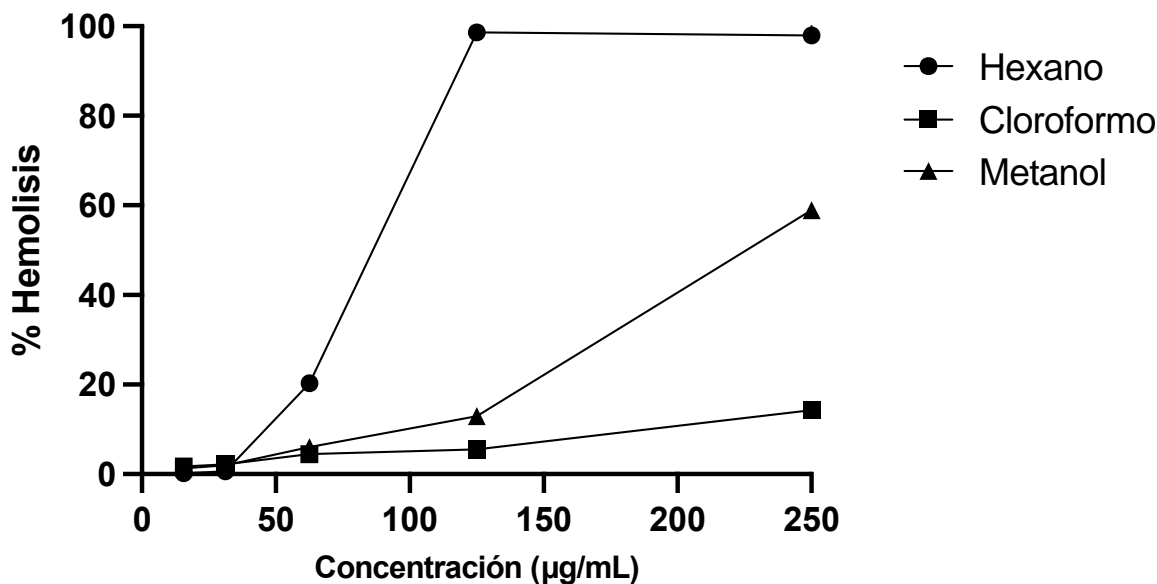
Partición	<i>Bacillus subtilis</i> (ISE-B27) IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	L5178Y-R	PBMC	IS
Hexano	148.1±0.330	>500±0.037	3.37
Cloroformo	34.62±0.180	537.7±2.731	15.53
Metanol	117.7±0.310	>500±0.003	4.24



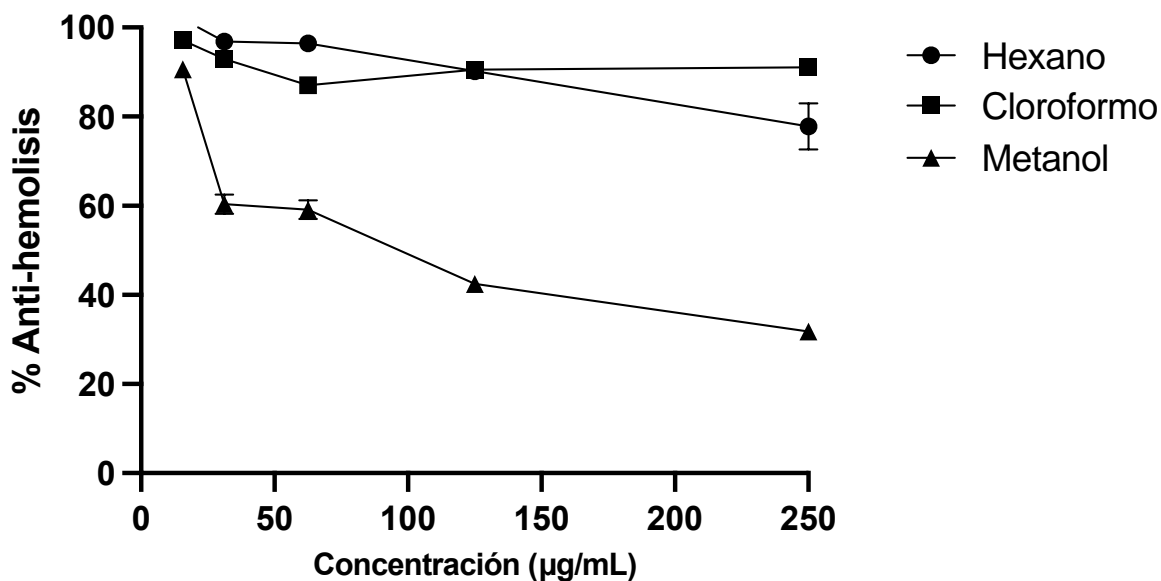
**Figura 15.** Porcentaje de inhibición de crecimiento de células L5178Y-R, mediante las particiones del extracto metanólico de la bacteria ISE-B27.

### 7.7.2 Actividad hemolítica, anti hemolítica y antioxidante de las particiones del extracto metanólico ISE-B27

Se llevó a cabo la evaluación del efecto hemolítico y anti hemolítico en eritrocitos utilizando las particiones del extracto más eficaz y selectivo contra células de linfoma murino L5178Y-R (Tabla 8). La partición del extracto que menor actividad hemolítica presento fue la de cloroformo con una  $IC_{50}$  de  $1,443 \pm 0.490 \mu\text{g/mL}$ , seguida de la partición a base de metanol con una  $IC_{50}$  de  $223.2 \pm 0.370 \mu\text{g/mL}$  y finalmente con una mayor actividad hemolítica la partición a base de hexano con una  $IC_{50}$  de  $74.01 \pm 0.270 \mu\text{g/mL}$  (Figura 16). Por otra parte, la evaluación de la actividad anti hemolítica demostró que la partición a base de metanol fue la que tenía un mayor potencial protectora con una  $IC_{50}$  de  $89.35 \pm 0.290 \mu\text{g/mL}$ , mientras que las particiones de hexano y cloroformo presentaron  $IC_{50}$  mayores a  $500 \mu\text{g/mL}$  ( $606.5 \pm 0.440$  y  $11,847 \pm 0.610 \mu\text{g/mL}$  respectivamente (Figura 17, Tabla 8). Con respecto a la actividad antioxidante las particiones no presentaron dicha actividad (Tabla 8).



**Figura 16.** Actividad hemolítica de las particiones del extracto metanólico ISE-B27 (*Bacillus subtilis*). El ensayo se realizó por triplicado. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento y al menos tres experimentos independientes). Como control positivo se utilizó agua estilada. Como control negativo se utilizó Solución salina ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17.** Actividad anti hemolítica de las particiones del extracto metanólico ISE-B27 (*Bacillus subtilis*). Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento y al menos tres experimentos independientes.

**Tabla 8.** Actividad hemolítica, anti hemolítica y antioxidante de las particiones del extracto ISE-B27

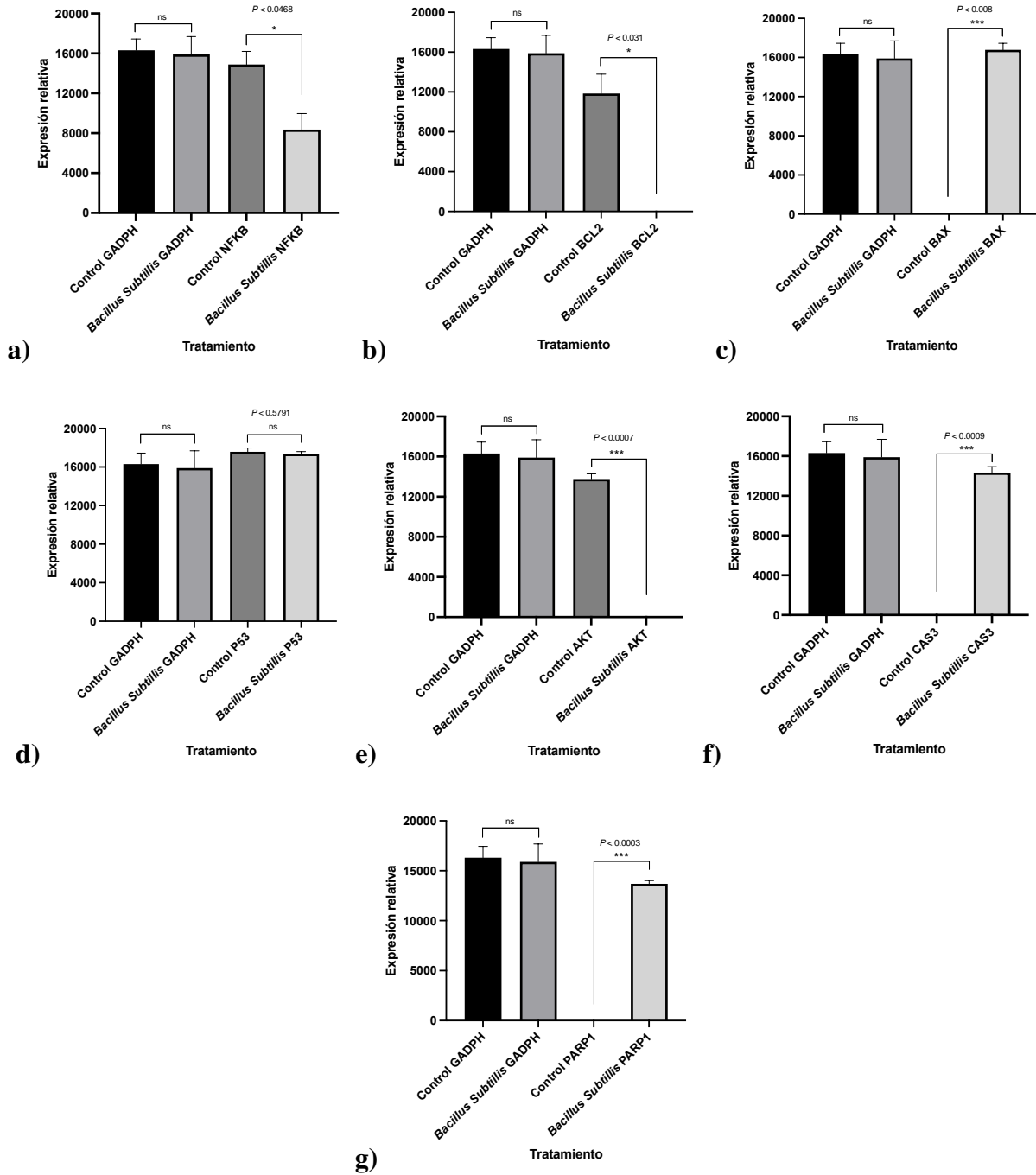
Partición	<i>Bacillus subtilis</i> (ISE-B27) IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	Hemólisis	Anti-hemolisis (AAPH)	Actividad antioxidante (DPPH)
Hexano	74.01±0.270	606.5±0.440	SA*
Cloroformo	1443±0.490	11847±0.610	SA*
Metanol	223.2±0.370	89.35±0.290	SA*

\*SA= Sin actividad

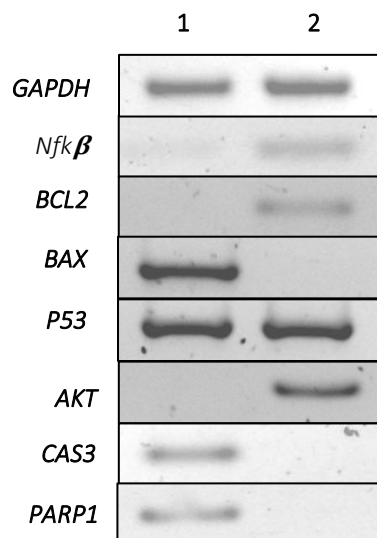
### 7.8 Regulación de genes relacionados con vías de muerte en células de linfoma murino L5178Y-R

Se llevó a cabo la evaluación de la expresión de diversos genes involucrados en la muerte celular mediante densitometría, el cual nos arrojó que el tratamiento de 24 h con la IC<sub>50</sub> de extracto metanólico ISE-B27 (*B. subtilis*) suprimió significativamente ( $p < 0.0468$ ,  $p < 0.031$  y  $p < 0.0007$ ) la expresión de NFKB, BCL2 y AKT respectivamente, al compararse con el control sin tratar (Figura 18 a, b y e). Por otro lado, la expresión de BAX, CAS3 y PARP1 se incrementó de manera significativa ( $p < 0.008$ ,  $p < 0.0009$  y  $p < 0.0003$  respectivamente) (Figura 18 c, f y g). Con respecto a la expresión de P53, no hubo diferencia significativa al compararse con el control (Figura 18 d, Figura 19).





**Figura 18.** Análisis de expresión génica en células L5178Y-R tratadas con extracto metanólico de *B. subtilis*. a) NFKB, b) BCL2, c) BAX, d) P53, e) AKT, f) CAS3 y g) PARP1. (Control = células sin tratamiento; tratamiento: IC<sub>50</sub> del extracto MeOH de *B. subtilis*).



**Figura 19.** Expresión génica relacionados con vias de muerte celular en células de linfoma L5178Y-R tratadas con extracto metanólico de *B. subtilis*

### 7.9 Caracterización parcial de la partición bioactiva de cloroformo del extracto ISE-B27 (*B. subtilis*)

Para la caracterización de los principales grupos químicos presentes en la partición de cloroformo, se realizó una serie de pruebas químicas las cuales revelaron la presencia y ausencia de diversas familias de compuestos. La Tabla 9 muestra los resultados de las pruebas químicas de la partición de cloroformo del extracto ISE-B27 (*B. subtilis*). El cual dio positivo a la presencia de compuestos conformados por triterpenos, cumarinas, taninos y alcaloides. Por otra parte, dio negativa la presencia para sesquiterpenlactonas, quinonas, saponinas, flavonoides y carbohidratos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis químicos de la partición de cloroformo del extracto ISE-B27

<b>Pruebas Químicas</b>	
Triterpenos	+
Cumarinas	+
Sesquiterpenlactonas	-
Quinonas	-
Saponinas	-
Flavonoides	-
Taninos	+
Carbohidratos	-
Alcaloides	+

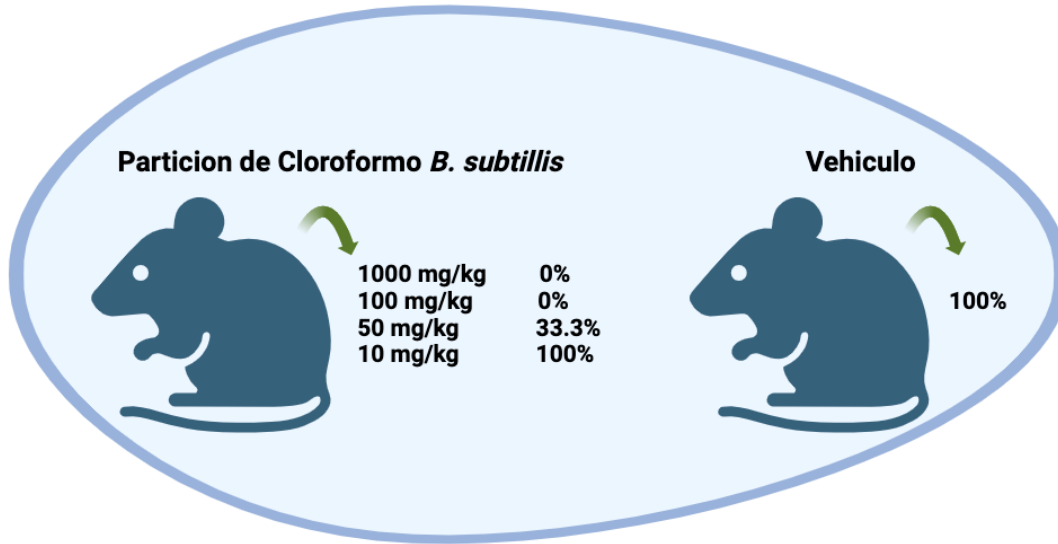
\* + reacción positiva., \* - reacción negativa

### **7.10 Efecto antitumoral *in vivo* de la partición clorofórmica del extracto ISE-B27 (*B. subtilis*)**

#### **7.10.1 Evaluación de la dosis máxima tolerada**

La para la determinación de la dosis a emplear en el modelo *in vivo* se realizó la prueba de dosis máxima tolerada en la cual se administró a diferentes concentraciones el extracto como tratamiento, lo que dio como resultado una sobrevivencia del 100 % del grupo tratado a una concentración de 10 mg/kg, al igual que el vehículo evaluado. Por otro lado, el grupo tratado a una concentración de 50 mg/kg tuvo una supervivencia del 33.3 %, mientras que las concentraciones más altas de 100 y 1,000 mg/kg resultaron ser demasiado tóxicas 100 % mortales (Figura 20).

Para determinar si el tratamiento a base de *B. subtilis* no ocasionaba daño hepático, se realizó la evaluación de la función hepática mediante análisis químicos clínicos del grupo tratado con 10 mg/kg, dando como resultado ningún daño hepático al utilizar esta concentración como tratamiento (Tabla 10).



**Figura 20.** Porcentaje de supervivencia de ratones Balb/c en la prueba de máxima dosis tolerada.

**Tabla 10.** Pruebas de función hepática a los 10 días de la administración de los tratamientos en la prueba de máxima dosis tolerada.

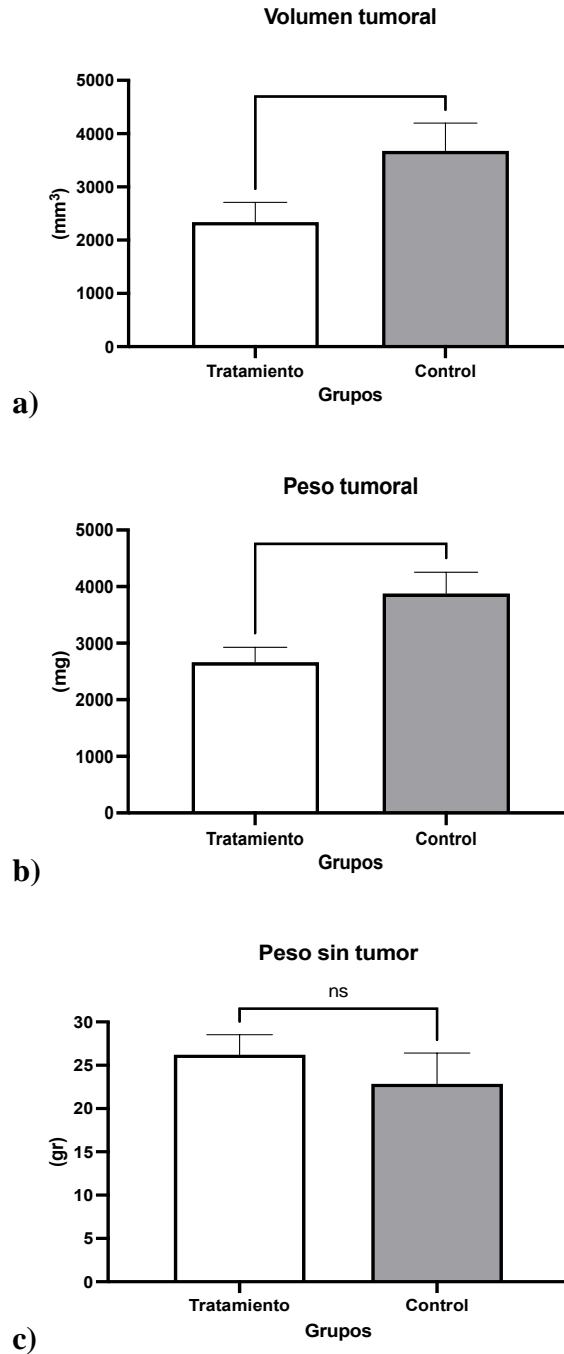
Parámetro	Prueba de máxima dosis tolerada	
	Tratamiento 10 mg/kg	Valores de referencia
Albúmina	3.06 ± 0.05	2.0-4.6 g/dL <sup>a</sup>
Proteínas totales	4.06 ± 0.15	4.3-6.4 g/dL <sup>c</sup>
Fosfatasa alcalina	174.00 ± 17.34	44-118 U/L <sup>c</sup>
Aspartato aminotransferasa	159.5 ± 21.92	69-191 U/L <sup>b</sup>
Alanina transaminasa	46.46 ± 4.05	26-120 U/L <sup>b</sup>
Bilirrubina total	0.08 ± 0.02	0.3-0.8 mg/dL <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hedrich et al., 2004; <sup>b</sup> Santos et al., 2016; <sup>c</sup> Silva-santana et al., 2020.

### **7.10.1 Determinación de la actividad antitumoral *in vivo***

Los ratones fueron implantados con linfoma murino L5178Y-R y tratados con la partición a base de cloroformo de la bacteria ISE-B27 durante 14 d después de la implantación del tumor. Se observó que en los ratones tratados con la partición de cloroformo se redujo significativamente ( $p < 0.0027$  y  $p < 0.0007$ ) el volumen y peso tumoral respectivamente (Figura 21-a y b). Respecto al peso sin tumor, no se logró obtener diferencia significativa en los ratones (Figura 21-c).

Los sueros de los ratones tratados y no tratados fueron evaluados químicamente para determinar si los tratamientos ocasionaban algún daño hepático, dando como resultado ningún daño hepático, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de máxima dosis tolerada (Tabla 11).



**Figura 21.** Volumen, peso tumoral y peso sin tumor de ratones BALB/c hembras tratadas con la partición a base de cloroformo de la bacteria ISE-B27 (*B. subtilis*). a) Volumen tumoral. b) peso tumoral. c) peso sin tumor. \*\*  $P > 0.0027$ ; \*\*\*  $P > 0.0007$ ; ns: no significativo.

**Tabla 11.** Pruebas de función hepática grupos tratados

<b>Parámetro</b>	<b>Tratamiento 10 mg/kg</b>	<b>Sin tratamiento</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Control negativo</b>	<b>Valores de referencia</b>
Albumina	3.36 ± 0.11	3.53 ± 0.25	3.65 ± 0.05	3.10 ± 0.36	2.0-4.6 g/dL <sup>a</sup>
Proteínas totales	4.64 ± 0.15	5.26 ± 0.41	4.85 ± 0.12	4.51 ± 0.66	4.3-6.4 g/dL <sup>c</sup>
Fosfatasa alcalina	57.40 ± 18.44	68.66 ± 30.85	127.75 ± 24.12	190.22 ± 37.12	44-118 U/L <sup>c</sup>
Aspartato aminotransferasa	233 ± 24.33	307.66 ± 54.04	93.33 ± 12.50	140.04 ± 56.56	69-191 U/L <sup>b</sup>
Alanina transaminasa	81.10 ± 17.34	69.29 ± 5.79	31.73 ± 2.40	67.86 ± 37.83	26-120 U/L <sup>b</sup>
Bilirrubina total	0.08 ± 0.008	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.005	0.05 ± 0.01	0.3-0.8 mg/dL <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hedrich et al., 2004; <sup>b</sup> Santos et al., 2016; <sup>c</sup> Silva-santana et al., 2020.

## 8. DISCUSIÓN

En la actualidad el cáncer sigue representando una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Sung et al., 2021). A pesar de los avances en las terapias contra el cáncer, estas siguen teniendo una gran desventaja tal como la resistencia a fármacos y los efectos secundarios que estas ocasionan (Raguz et al., 2008). Todo esto ha generado que los investigadores se enfoquen en buscar nuevos agentes antitumorales selectivos que ocasionen menos efectos secundarios en el paciente y que genere una alta eficacia terapéutica (Zheng et al., 2016). Las bacterias Gram positivas como los actinomicetos y los *Bacillus* endófitos de plantas medicinales son capaces de sintetizar nuevos compuestos con utilidad farmacológica contra el cáncer, tales como compuestos aromáticos, polisacáridos y lipopéptidos (Zheng et al., 2016; Ghosh et al., 2019; Nafie et al., 2021; Ek-Ramos et al., 2019).

Los resultados en este estudio demuestran la actividad citotóxica de diversas bacterias endófitas de *I. sonorae*, una cucurbitácea nativa del norte de México, la cual ha demostrado que los extractos metanólicos y de acetato de etilo contienen cucurbitacinas con propiedades citotóxicas para diferentes líneas celulares de etiología cancerosas como HepG2, HeLa, L5178Y-R, A549, M12A, LS180 y MDA-MB-231 (Alarcon-Aguilar et al., 2005; Torres-Moreno et al., 2020, Vidal-Gutiérrez et al., 2021; Torres-Moreno et al., 2015). En el presente estudio, se logró aislar diferentes cepas de *B. subtilis*, el cual ya se ha demostrado que cerca del 50 % de las bacterias endófitas presentes en cucurbitáceas son especies de *Bacillus* (Khalaf et al., 2016).

Diversas bacterias Gram positivas endófitas presentes en diversos ambientes, han mostrado efectos antiicancerígenos contra un gran panel de líneas celulares, de las que destacan células de cáncer de hígado (Hep-G2), cáncer cervical (HeLa), cáncer pulmonar (A549), cáncer de mama (MCF7) y leucemia mieloide (SK-MEL-28) (Ek-Ramos et al 2019; Ferdous et al., 2018; Qi et al 2020). Los extractos a base de EtOAc de las cepas aisladas de *B. subtilis* ISE-B22, ISE-B26 y ISE-B27, mostraron una actividad citotóxica distinta entre ellas con una  $IC_{50}$  de  $56.8 \pm 1.143$ ,  $26 \pm 1.404$  y  $39.74 \pm 1.217$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, con IS mayores a 5 en células PBMC (Tabla 4). Esto podría deberse a la baja concentración de



compuestos orgánicos en el crecimiento de los microorganismos, el cual da como resultado cambios drásticos cuantitativos en la producción de metabolitos (Sansinenea et al., 2011). Por otro lado, se ha reportado actividad antitumoral de esta misma especie de *B. subtilis* contra diferentes líneas celulares, entre ellas MCF7, HeLa, Hep G2 y CaCo2, de los cuales ya se han determinado los posibles compuestos responsables de ejercer esta actividad citotóxica tal como el ácido gálico, eicosano, pentacosano, amicoumacinas, bacilosarcina e-Poli-L-Lisina y surfactina, los cuales podrían estar implicados en la detección del ciclo celular y la apoptosis (Ramasubburayan et al., 2015; Szende et al., 2002; Miller et al., 2012; Boul et al 2012; Meena et al., 2017).

En este estudio se demostró la influencia de la adición de suplementos en los medios de cultivo y actividad anticancerígena de las bacterias endófitas de *Ibervillea sonora*. Se demostró que la adición extra de fuentes de carbono como el "manitol" en los medios de cultivo ayudan a incrementar la producción de biomasa, el rendimiento del extracto y la actividad antitumoral en la línea celular de linfoma murino L5178Y-R. La modificación de la adición de manitol en el proceso de fermentación aumento el crecimiento bacteriano, sin embargo, no aumenta la actividad antitumoral, lo cual concuerda con Saha y colaboradores en el 2011 en el cual describen que no siempre que haya un mayor crecimiento de biomasa y rendimiento significa que tenga una mayor actividad biológica (Saha y Racine, 2011; Groisillier et al., 2015). En nuestros resultados el caldo ISP2 suplementado con manitol aumento el crecimiento significativo de las bacterias ISE-B22, ISE-B26 y ISE-B27. Pero, sin embargo, ningún aumento la inhibición del crecimiento de las células tumorales, por lo cual se decidió trabajar con el caldo ISP2 sin suplementación. Las bacterias endófitas en condiciones de crecimiento en laboratorio suelen ser muy susceptibles en la producción de compuestos bioactivos (Elvira y Van, 2000), los cambios de fuentes de carbono inducen la expresión de diferentes metabolitos primarios y secundarios en los cultivos bacterianos responsables de la actividad antitumoral y antimicrobiana (Reinhnlol y Hurek, 2011). Por lo tanto, un microorganismo endófito puede producir diferentes cantidades de compuestos bioactivos, dependiendo de los nutrientes presentes en los diversos medios de cultivo (Shaaban et al., 2013).

En la actualidad la tasa de incidencia y mortalidad del cáncer van en aumento en todo el mundo, donde el linfoma es uno de los 11 tipos de cáncer más prevalentes (GLOBOCAN, 2021). La capacidad de inhibición del crecimiento celular de las particiones del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 en este estudio, muestra que la partición a base de cloroformo ejerce una mejor IC<sub>50</sub> a una concentración de 34.62±0.180 µg/mL en células de linfoma murino L5178Y-R, este resultado es comparable con otros estudios, en los cuales lograron aislar un dipéptido mediante cloroformo de *Bacillus pumilus* AMK1 el cual tiene una actividad citotóxica y apoptótica significativa en las células de cáncer de hígado HepG2 (Karanam et al., 2020). Otro estudio, logro aislar proteínas solubles de cepas de *Bacillus thuringiensis* GM1, GM18 y HD-512 con actividad citotóxica contra linfoma murino L5178Y-R (Franco-Molina et al., 2016). Por otra parte, en este estudio la evaluación de la actividad hemolítica nos arrojó que la partición de cloroformo del extracto ejerce una IC<sub>50</sub> a una concentración alta de 1443±0.490 µg/mL, lo cual concuerda con resultados obtenidos por investigadores, en donde se han evaluados fracciones de acetato de etilo, las cuales no presentan actividad hemolítica en eritrocitos humanos (Nighat et al., 2020).

Los diversos compuestos generados por las bacterias endófitas son capaces de expresar y suprimir principales genes involucrados en diferentes vías de muerte celular, en este estudio la evaluación de la expresión de diversos genes nos arrojó que el tratamiento de 24 h con la IC<sub>50</sub> de extracto metanólico ISE-B27 (*B. subtilis*) suprimió la expresión de NFκB, BCL2 y AKT significativamente en base a nuestro control "células sin tratamiento". Por otro lado, se vio al alta la expresión significativamente de BAX, CAS3 y PARP1. Con respecto a la expresión de P53 no hubo diferencia significativa respecto al control. Lo cual, estos resultados concuerdan con otros estudios en donde se ve un aumento de la CAS3 y BAX mientras que una disminución de BCL2 en líneas de cáncer de mama MCF7 y células K562 utilizando como tratamiento *B. subtilis* NMK17 endófito de la esponja marina *Clathria frondifera* y lipopéptidos de *B. subtilis* generando una potente propiedad inductora de apoptosis a través de la vía intrínseca (Sirpu et al., 2018; Zhao et al., 2018). Con respecto al gen AKT se observó una supresión en los tratamientos, lo cual concuerda con estudios recientes en donde se han descubierto que los lipopéptidos de *B. subtilis* tienen efecto antitumoral contra cáncer de mama alterando la expresión de la vía AKT (Dey et al., 2015; Zhao et al., 2017).

Una de las características principales del género *Bacillus* es su naturaleza aeróbica, capaz de producir metabolitos secundarios con actividad biológica, en la actualidad se han descubierto más de 180 compuestos bioactivos (Zhang et al., 2022). Por lo general, las especies de *Bacillus* producen enzimas extracelulares, carbohidratos, proteasas, penicilinasas, nucleasas, fosfatasas, lipasa, fosfolipasa C, tiaminasa y enzimas bacteriolíticas (Meena et al., 2022). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio donde las pruebas químicas revelaron la presencia de compuestos conformados por triterpenos, cumarinas, taninos y alcaloides. Un estudio reciente demuestra que *Bacillus cereus* SVSK2 aislado de un pescado es capaz de producir ácido silico con actividad antitumoral en celula MFC7 y HepG2 con IC<sub>50</sub> de 150 y 300 µg/mL respectivamente (Seerangara et al., 2017).

En este estudio, se evaluó el potencial terapéutico *in vivo* de la partición clorofórmica del extracto metanólico de la bacteria endófito ISE-B27 (*B. subtilis*). Se encontró que la partición clorofórmica inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de linfoma murino L5178Y-R respecto al control no tratado, la eficacia antitumoral del tratamiento podría estar correlacionada con la sobreexpresión de BAX, CAS3 y PARP1, lo cual concuerda con estudios recientes donde evalúan la actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ratón con sarcoma 180, en donde observan una disminución en el crecimiento tumoral de sus tratamientos (Dey et al., 2016). Otro estudio realizado en el 2010 por Ma y colaboradores obtuvieron como resultado una reducción en el tamaño y peso del tumor utilizando como modelo un xenoinjerto de ratón de cáncer de colon humano tratado con compuestos sintetizados a partir de *B. polyfermenticus* (Ma et al., 2010). Por otra parte, otro grupo de investigación ha demostrado que la iturina A, extraída del extracto metanólico a base de *B. subtilis*, redujo el peso del tumor en un 58% a una dosis de 3 mg/kg/día en un modelo de xenoinjerto construido por células HepG2 (Zhao et al., 2021).

Poco ha sido explorado el campo de investigación en la interacción que juega las bacterias en la producción de compuestos bioactivos en plantas medicinales, este estudio abre pauta a la relación que podrían tener estas bacterias en la actividad biológica que ejercen estas plantas. Para ello se debe indagar en dilucidar los compuestos que ejercen esta actividad, así como su selectividad y mecanismos de muerte celular.

## 9. CONCLUSIONES

La presencia de bacterias Gram positivas asociadas a plantas medicinales muestra el potencial biotecnológico de nuevas fuentes de producción de moléculas con actividad antitumoral. La partición a base de cloroformo del extracto metanólico de *Bacillus subtilis*, endófito de *I. sonorae*, posee potencial antitumoral en un modelo *in vitro* e *in vivo* de linfoma murino L5178Y-R.

1. Los extractos obtenidos de la bacteria *B. subtilis*, endófito de *I. sonorae* poseen actividad antitumoral contra células del linfoma murino L5178Y-R, aumentando la expresión de BAX y CAS3 y disminuyendo la expresión de AKT y BCL2.
2. El extracto a base de cloroformo de *B. subtilis* posee una actividad hemoprotectora hacia eritrocitos humanos.
3. El extracto a base de cloroformo de *B. subtilis* disminuyó significativamente el peso y volumen tumoral en el modelo *in vivo* de linfoma murino L5178Y-R.
4. Los tratamientos a base de *B. subtilis* no ocasionan daño hepático en ratones hembra BALB/c portadores de linfoma L5178Y-R.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Purificar, caracterizar y evaluar los compuestos bioactivos presentes en la partición clorofórmica del extracto metanólico de *B. subtilis*.
2. Profundizar en las vías de muerte celular ocasionados por el extracto MeOH y sus compuestos.
3. Realizar más ensayos *in vivo*, en el cual se administren más dosis del tratamiento y ver más posibles modelos de estudio.
4. Complementar el estudio realizado a nivel *in vivo* con pruebas de daño hematológico y patológicas.

## **RODUCTOS ENTREGABLES**

- 1 artículo en revista JCR
- 1 artículo relacionado en colaboración en revista JCR
- Primer lugar en la Categoría de Ciencia Básica por la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica 2022.



Article

# In Vitro Antitumor Activity of Endophytic and Rhizosphere Gram-Positive Bacteria from *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene against L5178Y-R Lymphoma Cells

Ricardo Romero-Arguelles <sup>1</sup>, César Iván Romo-Sáenz <sup>1,\*</sup>, Karla Morán-Santibáñez <sup>1</sup>, Patricia Tamez-Guerra <sup>1</sup>, Ramiro Quintanilla-Licea <sup>2</sup>, Alonso Alberto Orozco-Flores <sup>1</sup>, Jesica María Ramírez-Villalobos <sup>1</sup>, Reyes Tamez-Guerra <sup>1</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla <sup>1</sup> and Ricardo Gomez-Flores <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Mexico; ricardoromeroarguelles@gmail.com (R.R.-A.); karlita\_moran@hotmail.com (K.M.-S.); patamez@hotmail.com (P.T.-G.); lacxelo@gmail.com (A.A.O.-F.); jescicamrv\_901@hotmail.com (J.M.R.-V.); reyes.tamezgr@uanl.edu.mx (R.T.-G.); crrodrig07@gmail.com (C.R.-P.)
- <sup>2</sup> Departamento de Química, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Mexico; rquintanilla.uanl@gmail.com
- \* Correspondence: cesar\_ivan\_romo@hotmail.com (C.I.R.-S.); rgomez60@hotmail.com (R.G.-F.)



**Citation:** Romero-Arguelles, R.; Romo-Sáenz, C.I.; Morán-Santibáñez, K.; Tamez-Guerra, P.; Quintanilla-Licea, R.; Orozco-Flores, A.A.; Ramírez-Villalobos, J.M.; Tamez-Guerra, R.; Rodríguez-Padilla, C.; Gomez-Flores, R. In Vitro Antitumor Activity of Endophytic and Rhizosphere Gram-Positive Bacteria from *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene against L5178Y-R Lymphoma Cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 894. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020894>

Academic Editor: Angela F. Cunha

Received: 19 November 2021

Accepted: 12 January 2022

Published: 14 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Plant-associated microorganisms represent a potential source of new antitumor compounds. The aim of the present study was to isolate endophytic and rhizosphere Gram-positive bacteria from *Ibervillea sonorae* and produce extracts with antitumor activity. Methanol and ethyl acetate extracts were obtained from 28 d bacterial fermentation, after which murine L5178Y-R lymphoma cells growth inhibition was evaluated at concentrations ranging from 15.62 µg/mL to 500 µg/mL by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide reduction colorimetric assay. IC<sub>50</sub> and the selectivity index (SI) were calculated and compared with healthy control human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Identification of the isolated strains was performed using the 16S ribosomal gene and by MALDI-TOF MS mass spectrometry. The endophytic and rhizosphere bacterial extracts from strains ISE-B22, ISE-B26, ISE-B27, ISS-A01, ISS-A06, and ISS-A16 showed significant ( $p < 0.05$ ) L5178Y-R cell growth inhibition, compared with an untreated control. The rhizosphere *Micromonospora echinospora* isolate ISS-A16 showed the highest (90.48%) percentage of lymphoma cells growth inhibition and SI (19.1) for PBMC, whereas the *Bacillus subtilis* ISE-B26 isolate caused significant ( $p < 0.01$ ) growth inhibition (84.32%) and a SI of 5.2. Taken together, results of the present study evidenced antitumor effects by *I. sonorae* endophytic and rhizosphere bacteria culture extracts. Further research will involve the elucidation of the compounds that exert the antitumor activity and their evaluation in pre-clinical studies.

**Keywords:** Cucurbitaceae; *Ibervillea sonorae*; antitumor; *Bacillus*; *Micromonospora*; endophytic bacteria; rhizosphere; Gram-positive

## 1. Introduction

Cancer is a multifactorial disease with a worldwide distribution and a current mortality rate of 9.9 million [1]. In particular, lymphoma has an incidence of 627,439 cases and a mortality rate of 283,169 cases per year, which represents one of the 10 most prevalent cancers globally [2]. Although chemotherapy is the treatment of choice, drug resistance has prompted an increasing demand for new antitumor compounds with low or null toxicity to normal cells [3,4].

Bioactive compounds produced by endophytic bacteria, isolated from medicinal plants, represent a source of new drugs with antitumor potential [5]. Medicinal plants have been extensively studied in recent years in the search for antitumor agents. However, the



Article

# In Vitro Tumor Cell Growth Inhibition Induced by *Lophocereus marginatus* (DC.) S. Arias and Terrazas Endophytic Fungi Extracts

Jesica M. Ramírez-Villalobos <sup>1</sup>, César I. Romo-Sáenz <sup>1,\*</sup>, Karla S. Morán-Santibañez <sup>1</sup>, Patricia Tamez-Guerra <sup>1</sup>, Ramiro Quintanilla-Licea <sup>2</sup>, Alonso A. Orozco-Flores <sup>1</sup>, Ricardo Romero-Arguelles <sup>1</sup>, Reyes Tamez-Guerra <sup>1</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla <sup>1</sup> and Ricardo Gomez-Flores <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Mexico; jescamrv\_901@hotmail.com (J.M.R.-V.); karlita\_moran@hotmail.com (K.S.M.-S.); patamez@hotmail.com (P.T.-G.); lacxelo@gmail.com (A.A.O.-F.); ricardoromeroarguelles@gmail.com (R.R.-A.); reyes.tamezgr@uanl.edu.mx (R.T.-G.); crrodrig07@gmail.com (C.R.-P.)

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Mexico; rquintanilla.uanl@gmail.com

\* Correspondence: cesar\_ivan\_romo@hotmail.com (C.I.R.-S.); rgomez60@hotmail.com (R.G.-F.)



**Citation:** Ramírez-Villalobos, J.M.; Romo-Sáenz, C.I.; Morán-Santibañez, K.S.; Tamez-Guerra, P.; Quintanilla-Licea, R.; Orozco-Flores, A.A.; Romero-Arguelles, R.; Tamez-Guerra, R.; Rodríguez-Padilla, C.; Gomez-Flores, R. In Vitro Tumor Cell Growth Inhibition Induced by *Lophocereus marginatus* (DC.) S. Arias and Terrazas Endophytic Fungi Extracts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9917. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189917>

Academic Editors: Angela F. Cunha and Paul B. Tchounwou

Received: 18 July 2021

Accepted: 19 September 2021

Published: 21 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Endophytic fungi have become potential sources of antitumor agents, particularly against antineoplastic-resistant cancer cells, with marginal or nil adverse effects for the oncological patient. Endophytic fungi were isolated from stems of the *Lophocereus marginatus* cactus, commonly found in Mexico. Methanol extracts were then obtained from fungus liquid cultures and their effects on tumor cell growth against murine lymphoma (L5178Y-R), human colorectal adenocarcinoma (HT-29), and human breast cancer (MCF-7) cells were evaluated at concentrations ranging from 31 µg/mL to 250 µg/mL via the colorimetric 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide reduction assay, using monkey kidney epithelial (MA-104) and human peripheral mononuclear (PBMC) cells as controls. Furthermore, we obtained the IC<sub>50</sub> and the selectivity index (SI) was calculated from the IC<sub>50</sub> ratio of normal and tumor cells. In addition, molecular identification of fungi showing cytotoxic activity was determined, using internal transcribed spacer molecular markers. PME-H001, PME-H002, PME-H005, PME-H007, and PME-H008 filamentous fungus strain extracts showed significant ( $p < 0.05$ ) tumor cell growth inhibition. In particular, they significantly ( $p < 0.05$ ) inhibited L5178Y-R cell growth, whereas the least susceptible cell line was HT-29. The endophytic strain PME-H008 of *Cladosporium* sp. caused the highest growth inhibition percentage against L5178Y-R and HT-29 cells with 96.6% ( $p < 0.01$ ) and 42.5% ( $p < 0.05$ ) respectively, and the highest SIs against L5178Y-R cells with 2.4 and 2.9 for MA-104 and PBMCs, respectively, whereas the PME-H005 extract showed SIs of 2.77 and 1.5 against MCF-7 and L5178Y-R cells, respectively, as compared with PBMCs. In addition, the endophytic strain PME-H007 of *Metarhizium anisopliae* caused the highest percentage of growth inhibition ( $p < 0.01$ ) against MCF-7 cells with 55.8% at 250 µg/mL. We demonstrated in vitro antitumor effects of *L. marginatus* endophytic fungi. Further research will involve the isolation and in vivo testing of bioactive compounds.

**Keywords:** antitumor; endophytic fungi; Cactaceae; *Lophocereus marginatus*; natural sources; environmentally friendly; Mexican plants; medicinal plants

## 1. Introduction

In 2020, around 9.9 million deaths by cancer were reported in the GLOBOCAN database [1], despite the existence of a variety of therapeutic approaches [2]. In particular, chemotherapy represents a common treatment, but severe side effects to the patients are usually observed. In addition, the emergence of antineoplastic-resistant cancer cells has





**XLVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana  
de Infectología y Microbiología Clínica**

**“Premio Jesús Kumate”**

*Otorga 1° Lugar  
Investigación Básica*


**Cartel n°: IB- 14**

**Título: Actividad biológica de extractos de Micromospora echinospora presente en la rizosfera  
de Ibervillea sonorae.**

**Autores:** \*\*Romero-Argüelles R1, Romo-Salenz C1, Moran-Santibañez K1, Tamez-Guerra P1, Pérez-González O1, Orozco-  
Flores A1, Tamez-Guerra R1, Rodríguez-Padilla C1, Gómez-Flores R1, (1) Universidad Autónoma de Nuevo León,  
México.

San Luis Potosí, 28 de Mayo de 2022

  
**Dr. Gerardo Martínez Aguilar**  
Presidente  
AMIMC A.C.

  
**Dra. Ma. Fernanda González Lara**  
Secretario Académico  
AMIMC A.C.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



UANL

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Botánica

Herbario FCB, UANL a 15 de diciembre del 2022

### A quien corresponda:

Por medio de la presente carta hago constar que los ejemplares con voucher 25588 (*Lophocereus marginatus*) y 25589 (*Ibervillea sonarae*), están depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Atte. María Magdalena Salinas Rodríguez

Curadora del Herbario FCB, UANL



c.c.p Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455  
8183294110, ext 6456

## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Zharani, M., Nasr, F. A., Alqahtani, A. S., Cordero, M. A. W., Alotaibi, A. A., Bepari, A., ... & Daradka, H. M. (2021). *In vitro* cytotoxic evaluation and apoptotic effects of *Datura innoxia* grown in Saudi Arabia and phytochemical analysis. *Applied Sciences*, 11(6), 2864.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Calzada-Bermejo, F., Hernandez-Galicia, E., Ruiz-Angeles, C., & Roman-Ramos, R. (2005). Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonorae* root extracts-II. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.035>
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., y Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972.
- Alonso-Castro, A.J.; Villarreal, M.L.; Salazar-Olivo, L.A.; Gomez-Sanchez, M.; Dominguez, F.; Garcia-Carranca, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 133, 945–972.
- Aly, A.H.; Debbab, A.; Edrada-Ebel, R.A.; Müller, W.E.G.; Kubbutat, M.H.G.; Wray, V.; Ebel, R.; Proksch, P. Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. *Mycosphere*, 2010, 1(2), 153-162.
- Aly, A.H.; Edrada-Ebel, R.A.; Wray, V.; Müller, W.E.; Kozytska, S.; Hentschel, U.; Proksch, P.; Ebel, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*, 2008, 69(8), 1716-1725.
- Azimi, M., Mehrzad, J., Ahmadi, A., Ahmadi, E., & Ghorbani Ranjbary, A. (2021). Apoptosis induced by *Ziziphora tenuior* essential oil in human colorectal cancer cells. *BioMed Research International*, 2021.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6-7), 499-503.
- Boul-Ela, H., & Shreadah, M. (2012). Isolation, cytotoxic activity and phylogenetic analysis of *Bacillus* sp. bacteria associated with the red sea sponge *Amphimedon ochracea*. *In Bioscience and ...*, 2012(November), 815–823. <http://search.proquest.com/openview/68e183239afc01096ee0adbd097ad0f8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=716372>

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G. y Zotchev, S. B. (2008). Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: Diversity and biological activity. *Mar Drugs*, 6, 12–24.
- Cárdenas Garza, G.R.; Elizondo Luévano, J.H.; Bazaldúa Rodríguez, A.F.; Chávez Montes, A.; Pérez Hernández, R.A.; Martínez Delgado, A.J.; López Villarreal, S.M.; Rodríguez Rodríguez, J.; Sánchez Casas, R.M.; Castillo Velázquez, U.; et al. Benefits of cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) and turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts for their applications as natural anti-inflammatory adjuvants. *Plants* 2021, 10, 1908–1924.
- Cardillo, F., Bonfim, M., da Silva Vasconcelos Sousa, P., Mengel, J., Ribeiro Castello-Branco, L. R., & Pinho, R. T. (2021). Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for cancer. *Vaccines*, 9(5), 439.
- Cerwenka, A., y Lanier, L. L. (2018). Natural killers join the fight against cancer. *Science*, 359(6383), 1460-1461.
- Chen, Y. T., Yuan, Q., Shan, L. T., Lin, M. A., Cheng, D. Q., & Li, C. Y. (2013). Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus*. *Oncology letters*, 5(6), 1787-1792.
- Christina, A.; Christopher, V.; Bhoire, S. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn. Rev.* 2013, 7, 11–16.
- Cruz, M. D. L. (1991). *Libellus de medicinalibus indorum herbis*: Manuscrito azteca de 1552 según traducción latina de Juan Badiano (No. 581.634 C78). Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2012). Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *International journal of biological macromolecules*, 51(3), 329-335.
- Dan, A. K., Manna, A., Ghosh, S., Sikdar, S., Sahu, R., Parhi, P. K., & Parida, S. (2021). Molecular mechanisms of the lipopeptides from *Bacillus subtilis* in the apoptosis of cancer cells-A review on its Current Status in different cancer cell lines. *Advances in Cancer Biology-Metastasis*, 3, 100019.
- Dey, G., Bharti, R., Banerjee, I., Das, A. K., Das, C. K., Das, S., ... & Mandal, M. (2016). Pre-clinical risk assessment and therapeutic potential of antitumor lipopeptide ‘Iturin A’ in an *in vivo* and *in vitro* model. *RSC advances*, 6(75), 71612-71623.
- Di Bucchianico, S., Cappellini, F., Le Bihanic, F., Zhang, Y., Dreij, K., y Karlsson, H. L. (2017). Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 32(1), 127-137.

- Dong-sheng, W., Quan-hong, X., Yun-yan, M., Xiao-li, W., Jie, C. y Fei, H. (2014). Oligotrophy is helpful for the isolation of bioactive actinomycetes. *Indian J Microbiol.*, 54, 178–184.
- Dragu, D. L., Necula, L. G., Bleotu, C., Diaconu, C. C., y Chivu-Economescu, M. (2015). Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World journal of stem cells*, 7(9), 1185.
- Ek-Ramos, M. J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A. A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G., & Tamez-Guerra, P. (2019). Bioactive products from plant-endophytic Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463>
- El-Neketi, M.; Ebrahim, W.; Lin, W.; Gedara, S.; Badria, F.; Saad, H.E.; Proksch, P. Alkaloids and polyketides from *Penicillium citrinum*, an endophyte isolated from the Moroccan plant *Ceratonia siliqua*. *J. Nat. Prod.*, 2013, 76(6), 1099-1104.
- Elizondo-Luévano, J. H., Castro-Ríos, R., López-Abán, J., Gorgojo-Galindo, O., Fernández-Soto, P., Vicente, B., ... & Chávez-Montes, A. (2021). Berberine: A nematocidal alkaloid from *Argemone mexicana* against *Strongyloides venezuelensis*. *Experimental Parasitology*, 220, 108043.
- Elizondo-Luévano, J. H., Castro-Ríos, R., Vicente, B., Fernández-Soto, P., López-Aban, J., Antonio, M. U. R. O., & Chávez-Montes, A. (2021). *In vitro* antischistosomal activity of the *Argemone Mexicana* methanolic extract and its main component berberine. *Iranian Journal of Parasitology*, 16(1), 91.
- Elizondo-Luévano, J. H., Hernández-García, M. E., Pérez-Narváez, O. A., 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, J. H., Pérez-Narváez, O. A., Sánchez-García, E., Castro-Ríos, R., Hernández-García, M. E., & Chávez-Montes, A. (2021). In-vitro effect of *Kalanchoe daigremontiana* and its main component, quercetin against *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Iranian journal of parasitology*, 16(3), 394.
- Elizondo-Luévano, J.H.; Castro-Ríos, R.; Sánchez-García, E.; Hernández-García, M.E.; Vargas-Villarreal, J.; Rodríguez-Luis, O.E.; Chávez-Montes, A. In vitro study of antiamebic activity of methanol extracts of *Argemone mexicana* on trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2018, 2018, 1–8.
- Elvira-Recuenco, M., & Van Vuurde, J. W. L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian journal of microbiology*, 46(11), 1036-1041.
- Estrada-Muñiz, E., Guerrero-Palomo, G., y Vega, L. (2006). Natural products: New anti-cancer agents derived from plants. *Toxicology*, 1.

- Estrada-Zúñiga, M. E., Arano-Varela, H., Buendía-González, L., y Orozco-Villafuerte, J. (2012). Fatty acids, phenols content, and antioxidant activity in *Ibervillea sonorae* callus cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 89-96.
- Feinberg, A. P. (2004, December). The epigenetics of cancer etiology. In *Seminars in cancer biology*. 14 (6), 427-432.
- Ferdous, U. T., Shishir, M. A., Khan, S. N., & Hoq, M. M. (2018). Bacillus spp.: Attractive Sources of Anti-cancer and Anti-proliferative Biomolecules. *Microbial Bioactives*, 1(1), E033–E045. <https://doi.org/10.25163/microbbioacts.11005b0408130818>
- Fiorillo, M., Verre, A. F., Iliut, M., Peiris-Pagés, M., Ozsvári, B., Gandara, R., ... y Lisanti, M. P. (2015). Graphene oxide selectively targets cancer stem cells, across multiple tumor types: implications for non-toxic cancer treatment, via “differentiation-based nano-therapy”. *Oncotarget*, 6(6), 3553.
- Franco-Molina, M., A., Edgar, Mendoza-Gamboa., M, E, Roman-Calderon., Pablo, Zapata-Benavides., Lydia, G., Rivera-Morales., L, Zapata-Monsivais., E, E, Coronado-Cerda., Crystel, A, Sierra-Rivera., Reyes, Tamez-Guerra., C, Rodriguez-Padilla. (2016). Actividad antitumoral in vitro de extractos de proteínas solubles de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Africana de Investigación de Microbiología*, doi: 10.5897/AJMR2015.7551
- Gao, Z., Jiang, J., Hou, L., & Ji, F. (2022). Lysionotin induces ferroptosis to suppress development of colorectal cancer via promoting Nrf2 degradation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Gerson-Cwilich, R.; Serrano-Olvera, A.; Villalobos-Prieto, A. Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 2006, 8, 200–207.
- Ghosh, A., Sutradhar, S., & Baishya, D. (2019). Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2605-1>
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Compant, S., Sessitsch, A., Katzir, N., Portnoy, V., & Yaron, S. (2015). Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 91(7), fiv074.
- Gomez-Flores R., Hernández-Martínez H., Tamez-Guerra P., Quintanilla-Licea R., Monreal-Cuevas E., Rodríguez-Padilla C., 2010, Antitumor and Immunomodulating potential of *Coriandrum sativum*, *Piper nigrum* and *Cinnamomum zeylanicum*, *Journal of Natural Products*, 3, 54-63.
- Gos, F. M., Savi, D. C., Shaaban, K. A., Thorson, J. S., Aluizio, R., Possiede, Y. M., ... y Glienke, C. (2017). Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from

- the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Frontiers in microbiology*, 8, 1642.
- Groissillier, A., Labourel, A., Michel, G., & Tonon, T. (2015). The mannitol utilization system of the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1799-1812.
- Güneş, H.; Alper, M.; Çelikoğlu, N. Anticancer effect of the fruit and seed extracts of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on human cancer cell lines. *Trop. J. Pharm. Res.* 2019, 18, 2057–2065.
- Hassan, S. E. D., Fouda, A., Radwan, A. A., Salem, S. S., Barghoth, M. G., Awad, M. A., ... y El-Gamal, M. S. (2019). Endophytic actinomycetes *Streptomyces* spp. mediated biosynthesis of copper oxide nanoparticles as a promising tool for biotechnological applications. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(3), 377-393.
- Hernández-Galicia, E., Calzada, F., Roman-Ramos, R., y Alarcón-Aguilar, F. J. (2007). Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: isolation and hypoglycemic activity. *Planta medica*, 73(03), 236-240.
- Hernández-Martínez, H.C.; Gómez-Flores, R.; Tamez-Guerra, P.; Quintanilla-Licea, R.; Samaniego-Escamilla, M.A.; Monreal-Cuevas, E.; Tamez-Guerra, R.; Rodríguez-Padilla, C. Antitumor activity of *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton Rose extracts against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells. *J. Med. Plants Res.* 2016, 10, 635–639.
- Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran Jr, W. J., Wu, Y. L., y Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*, 389(10066), 299-311.
- Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Ishiyama, A., Matsumoto, A., Hirose, T., Oshita, J., ... y Otaguro, K. (2015). Actinoallolides A–E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036. *Organic letters*, 17(4), 864-867.
- Jacobo-Herrera, N.J.; Jacobo-Herrera, F.E.; Zentella-Dehesa, A.; Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M.; Pérez-Plasencia, C. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *J. Ethnopharmacol.* 2016, 179, 391–402.
- Jacobo-Salcedo, M. D. R., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Alvarez, C., González-Espíndola, L. Á., Domínguez, F., ... y Estrada-Castillón, E. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural product communications*, 6(12), 1934578X1100601234.
- Jaganathan, R. M., Mahendra, L., Mahendra, J., Kumanan, V., y Kathaperumal, K. (2015). Ethnomedical herbs and various approaches in development of new drugs. *World J. Pharm. Res.* 5, 869-876.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., y Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.

- Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Sierras-Canchola, D., Lapizco-Vázquez, R., Ortiz-Sandoval, C., ... y Robles-Zepeda, R. E. (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 12.
- Jiménez, D. P. (2011). Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintetas tipo I en *Bacillus* aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* (Tesis doctoral). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela De Química De Bucaramanga. p 109.
- Karanam, G., Arumugam, M. K., & Sirpu Natesh, N. (2020). Anticancer effect of marine sponge-associated *Bacillus pumilus* AMK1 derived dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr) in human liver cancer cell line through apoptosis and G2/M phase arrest. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 445-457.
- Khalaf, E. M., & Raizada, M. N. (2016). Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0743-2>
- Kim, H.J.; Park, J.H.Y.; Kim, J.K. Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2014, 219, 1–8.
- Lebel, S., Ozakinci, G., Humphris, G., Mutsaers, B., Thewes, B., Prins, J., ... y Butow, P. (2016). From normal response to clinical problem: definition and clinical features of fear of cancer recurrence. *Supportive Care in Cancer*, 24(8), 3265-3268.
- Lozoya, X. (1994). Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. *Ethnobotany and the search for new drugs*, 130-152.
- Ma, E. L., Choi, Y. J., Choi, J., Pothoulakis, C., Rhee, S. H., & Im, E. (2010). The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *International journal of cancer*, 127(4), 780-790.
- MacMahon, B., Cole, P., y Brown, J. (1973). Etiology of human breast cancer: a review. *Journal of the National Cancer Institute*, 50(1), 21-42.
- Mansour, K. A., El-Neketi, M., Lahloub, M. F., & Elbermawi, A. (2022). Nanoemulsions of *Jasminum humile* L. and *Jasminum grandiflorum* L. essential oils: An approach to enhance their cytotoxic and antiviral effects. *Molecules*, 27(11), 3639.
- Matsumoto, A., y Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 514.
- Meena, K. R., Sharma, A., & Kanwar, S. S. (2017). Microbial Lipopeptides and their Medical Applications. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(11), 1–5.



- Meena, K. R., Sharma, A., & Kanwar, S. S. (2020). Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 423-433.
- Miller, K. I., Qing, C., Sze, D. M. Y., Roufogalis, B. D., & Neilan, B. A. (2012). Culturable Endophytes of Medicinal Plants and the Genetic Basis for Their Bioactivity. *Microbial Ecology*, 64(2), 431–449. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0044-8>
- Minarni, Artika, I. M., Julistiono, H., Bermawie, N., Riyanti, E. I., Hasim, & Hasan, A. E. Z. (2017). Anticancer activity test of ethyl acetate extract of endophytic fungi isolated from soursop leaf (*Annona muricata* L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(6), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.06.004>
- Montbriand, M. J. (2004, July). Herbs or Natural Products That Decrease Cancer Growth. In *Oncology nursing forum* (Vol. 31, No. 4).
- Nafie, M. S., Awad, N. M., Tag, H. M., Abd El-Salam, I. M., Diab, M. K., & El-Shatoury, S. A. (2021). *Micromonospora* species from rarely-exploited Egyptian habitats: chemical profile, antimicrobial, and antitumor activities through antioxidant property. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2427–2439. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11177-2>
- Nguyen, S. T., Nguyen, H. T.-L., & Truong, K. D. (2020). Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7(7), 3855–3859. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i7.614>
- Nighat, F., Mushtaq, Z., Maqsood, M., Shahid, M., Hanif, M. A., & Jamil, A. (2020). Cytotoxic,  $\alpha$ -amylase inhibitory and thrombolytic activities of organic and aqueous extracts of *Bacillus clausii* KP10. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(1).
- Nikitina, V. S., Kuz'mina, L. Y., y Melent'ev, A. I. (2007). Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of Geraniaceae and Rosaceae families. *Applied biochemistry and microbiology*, 43(6), 629-634.
- Nuñez-Gastelum, A., J., Hernández-Rivas, R., Rodrigo-García, J., de la Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E., Gabriel Díaz-Sánchez, A., ... y Martínez-Martínez, A. (2018). Polyphenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ibervillea sonorae* root. *BIOTECNIA*, 20(3), 23-27.
- O'Neill, K. A., Murphy, M. F., Bunch, K. J., Puumala, S. E., Carozza, S. E., Chow, E. J., ... y Von Behren, J. (2015). Infant birthweight and risk of childhood cancer: international population-based case control studies of 40 000 cases. *International journal of epidemiology*, 44(1), 153-168.
- Passari, A. K., Mishra, V. K., Saikia, R., Gupta, V. K., y Singh, B. P. (2015). Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with

- medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in microbiology*, 6, 273.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., ... & Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(9), 1769-1777.
- Prihanto, A. A., Firdaus, M., & Nurdiani, R. (2011). Endophytic Fungi Isolated from Mangrove ( *Rhizophora mucronata* ) and Its Antibacterial Activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(January), 386–389.
- Qi, S., Gui, M., Li, H., Yu, C., Li, H., Zeng, Z., & Sun, P. (2020). Secondary Metabolites from Marine Micromonospora: Chemistry and Bioactivities. *Chemistry and Biodiversity*, 17(4). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000024>
- Quintanilla-Licea, R.; Gomez-Flores, R.; Samaniego-Escamilla, M.Á.; Hernández-Martínez, H.C.; Tamez-Guerra, P.; Morado-Castillo, R. Cytotoxic effect of methanol extracts and partitions of two Mexican desert plants against the murine lymphoma L5178Y-R. *Am. J. Plant Sci.* 2016, 7, 1521–1530.
- Radha Abbas Hasoon, M.; Jawad Kadhim, N. Improvement of the selectivity index (SI) and cytotoxicity activity of doxorubicin drug by *Panax ginseng* plant extract. *Arch. Razi Inst.* 2021, 76, 659–666.
- Raguz, S., & Yagüe, E. (2008). Resistance to chemotherapy: New treatments and novel insights into an old problem. *British Journal of Cancer*, 99(3), 387–391. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604510>
- Rahman, M. M., Reza, A. A., Khan, M. A., Sujon, K. M., Sharmin, R., Rashid, M., ... & Alam, A. K. (2021). Unfolding the apoptotic mechanism of antioxidant enriched-leaves of *Tabebuia pallida* (lindl.) miers in EAC cells and mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114297.
- Rai, P.K.; Lalramnghinglova, H. Ethnomedicinal plant resources of Mizoram, India: Implication of traditional knowledge in health care system. *Ethnobot. Leaflet*. 2010, 14, 274–305.
- Rajivgandhi, G., Ramachandran, G., Maruthupandy, M., Saravanakumar, S., y Manoharan, N. (2018). Antibacterial effect of endophytic actinomycetes from marine algae against multi drug resistant Gram negative bacteria. *Exam. Mar. Biol. Oceanogr.*, 4, 1-8.
- Ramírez-Villalobos, J. M., Romo-Sáenz, C. I., Morán-Santibañez, K. S., Tamez-Guerra, P., Quintanilla-Licea, R., Orozco-Flores, A. A., ... & Gomez-Flores, R. (2021). In vitro tumor cell growth inhibition induced by *Lophocereus marginatus* (Dc.) S. Arias and terrazas endophytic fungi extracts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9917.

- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 435-443.
- Rodríguez-Garza, N. E., Quintanilla-Licea, R., Romo-Sáenz, C. I., Elizondo-Luevano, J. H., Tamez-Guerra, P., Rodríguez-Padilla, C., & Gomez-Flores, R. (2023). In Vitro Biological Activity and Lymphoma Cell Growth Inhibition by Selected Mexican Medicinal Plants. *Life*, 13(4), 958.
- Romero-Arguelles, R., Romo-Sáenz, C. I., Morán-Santibáñez, K., Tamez-Guerra, P., Quintanilla-Licea, R., Orozco-Flores, A. A., ... & Gomez-Flores, R. (2022). In vitro antitumor activity of endophytic and rhizosphere gram-positive bacteria from *Ibervillea sonora* (S. Watson) greene against L5178Y-R lymphoma cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(2), 894.
- Saha, B. C., & Racine, F. M. (2011). Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 879-891.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, 4, 406–425.
- Salehi, B.; Quispe, C.; Sharifi-Rad, J.; Giri, L.; Suyal, R.; Jugran, A.K.; Zucca, P.; Rescigno, A.; Peddio, S.; Bobiş, O.; et al. Antioxidant potential of family Cucurbitaceae with special emphasis on *Cucurbita* genus: A key to alleviate oxidative stress-mediated disorders. *Phytother. Res.* 2021, 35, 3533–3557.
- Samaniego Escamilla, M. Á. (2016). Identificación de compuestos de *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton y Rose e *Ibervillea sonora* (Watson) con actividad citotóxica contra el linfoma murino L5178Y-R Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Sánchez E, Heredia N, García S. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6888-6894.
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523–1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Ramasubburayan, R., Sumathi, S., Magi Bercy, D., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2015). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of mangrove associated bacterium *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* RG. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.01.004>
- Seerangaraja, V., Surulia, K., Vijayakumarb, U., Meganathanc, B., Seerangarad, V., Selvame, S., ... & Selvaraj, J. (2017). Isolation and characterization of bioactive compounds for *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* from *Oreochromis mossambicus* and *Labeo rohita*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 43(2), 71-77.

- Shaaban, M., Nasr, H., Hassan, A. Z., & Asker, M. S. (2013). Bioactive secondary metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus*: Structural elucidation and bioactivity studies. *Revista latinoamericana de química*, *41*(1), 50-60.
- Shan, W., Zhou, Y., Liu, H., & Yu, X. (2018). Endophytic actinomycetes from tea plants (*Camellia sinensis*): isolation, abundance, antimicrobial, and plant-growth-promoting activities. *BioMed research international*, 2018.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., y Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, *69*(1), 7-34.
- Singh, M.; Kumar, A.; Singh, R.; Pandey, K.D. Endophytic bacteria: A new source of bioactive compounds. *3 Biotech* 2017, *7*, 1–14.
- Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., Miyabe, A., Murata, S., Saito, T., & Nomura, F. (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(7), 1905–1911. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4877-7>
- Stach, J. E., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., y Bull, A. T. (2003). New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental microbiology*, *5*(10), 828-841.
- Stewart, B. W., y Kleihues, P. (Eds.). (2003). World cancer report.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209-249.
- Szende, B., Szokan, G., Tyiha, E., Pal, K., Gaborjanyi, R., Almas, M., & Khlafulla, A. (2002). Antitumor effect of lysine-isopeptides. *Cancer Cell International*, *2*(1), 4. <http://www.cancerci.com/content/2/1/4>
- Thompson, J., Higgins, D. y Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, *22*(22), 4673-4680.
- Tomasetti, C., Li, L., y Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, *355*(6331), 1330-1334.
- Torres-Moreno, H., Marcotullio, M. C., Velázquez, C., Ianni, F., Garibay-Escobar, A., & Robles-Zepeda, R. E. (2020). Cucurbitacin IIB, a steroidal triterpene from *Ibervillea sonora* induces antiproliferative and apoptotic effects on cervical and lung cancer cells. *Steroids*, *157*, 108597. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108597>
- Torres-Moreno, H., Velázquez, C. A., Garibay-Escobar, A., Curini, M., Marcotullio, M. C., & Robles-Zepeda, R. E. (2015). Antiproliferative and apoptosis induction of

cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Industrial Crops and Products*, 77, 895–900. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.055>

- Torres-Moreno, H., Velázquez, CA, Garibay-Escobar, A., Curini, M., Marcotullio, MC y Robles-Zepeda, RE (2015). Inducción antiproliferativa y apoptosis de triterpenos de tipo cucurbitacina de *Ibervillea sonorae*. *Cultivos y productos industriales*, 77, 895-900.
- Torres-Moreno, H.; Marcotullio, M.C.; Velazquez, C.; Arenas-Luna, V.M.; Hernández-Gutiérrez, S.; Robles-Zepeda, R.E. Cucurbitacin IIb from *Ibervillea sonorae* induces apoptosis and cell cycle arrest via STAT3 inhibition. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2020, 20, 1188–1196.
- Torres-Moreno, H.; Marcotullio, M.C.; Velázquez, C.; Ianni, F.; Garibay-Escobar, A.; Robles-Zepeda, R.E. Cucurbitacin IIb, a steroidal triterpene from *Ibervillea sonorae* induces antiproliferative and apoptotic effects on cervical and lung cancer cells. *Steroids* 2020, 157, 108597.
- Troisi, R., Bjørge, T., Gissler, M., Grotmol, T., Kitahara, C. M., Myrtveit Saether, S. M., ... y Glimelius, I. (2018). The role of pregnancy, perinatal factors and hormones in maternal cancer risk: a review of the evidence. *Journal of internal medicine*, 283(5), 430-445.
- Uzor, P.F.; Ebrahim, W.; Osadebe, P.O.; Nwodo, J.N.; Okoye, F.B.; Müller, W.E.; Lin, W.; Liu, Z.; Proksch, P. Metabolites from *Combretum dolichopetalum* and its associated endophytic fungus *Nigrospora oryzae*-evidence for a metabolic partnership. *Fitoterapia*, 2015, 105, 147-150.
- Vega-Ávila, E., Espejo-Serna, A., Alarcón-Aguilar, F., y Velasco-Lezama, R. (2009). Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. In *Proceedings of the Western Pharmacology Society* (Vol. 52, pp. 78-82).
- Vidal-Gutiérrez, M., Torres-Moreno, H., Hernández-Gutiérrez, S., Velazquez, C., Robles-Zepeda, R. E., & Vilegas, W. (2021). Antiproliferative activity of standardized phytopreparations from *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene. *Steroids*, 169(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108824>
- Wang, D. S., Xue, Q. H., Ma, Y. Y., Wei, X. L., Chen, J., & He, F. (2014). Oligotrophy is helpful for the isolation of bioactive actinomycetes. *Indian journal of microbiology*, 54, 178-184.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wyld, L., Audisio, R. A., & Poston, G. J. (2015). The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(2), 115-124.
- Xolalpa-Molina, S. (1994). Flora medicinal del mayo de la región de El Fuete y Choix, Sinaloa. *Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana*, 363-411.

- Zaman, W.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Amina, H.; Lubna; Saqib, S.; Ullah, F.; Ayaz, A.; Bahadur, S.; Park, S. Diversity of medicinal plants used as male contraceptives: An initiative towards herbal contraceptives. *Indian J. Tradit. Knowl.* 2022, 21, 616–624.
- Zaman, W.; Ye, J.; Ahmad, M.; Saqib, S.; Shinwari, Z.K.; Chen, Z. Phylogenetic exploration of traditional Chinese medicinal plants: A case study on *Lamiaceae* (angiosperms). *Pakistan J. Bot.* 2022, 54, 1033–1040.
- Zapata-Bustos, R., Alonso-Castro, Á. J., Gómez-Sánchez, M., y Salazar-Olivo, L. A. (2014). *Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. *Journal of ethnopharmacology*, 152(3), 546-552.
- Zein, N., Elewa, Y. H. A., Alruwaili, M. K., Dewaard, M., Alorabi, M., Albogami, S. M., ... & Zahran, M. H. (2022). Barhi date (*Phoenix dactylifera*) extract ameliorates hepatocellular carcinoma in male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 156, 113976.
- Zhang, H., Bai, X., Zhang, M., Chen, J., y Wang, H. (2018). Bioactive natural products from endophytic microbes. *The Natural Products Journal*, 8(2), 86-108.
- Zhang, L., & Yi, H. (2022). Potential antitumor and anti-inflammatory activities of an extracellular polymeric substance (EPS) from *Bacillus subtilis* isolated from a housefly. *Scientific Reports*, 12(1), 1383.
- Zhao, H., Yan, L., Guo, L., Sun, H., Huang, Q., Shao, D., ... & Shi, J. (2021). Effects of *Bacillus subtilis* iturin A on HepG2 cells in vitro and vivo. *AMB Express*, 11(1), 1-12.
- Zheng, L. P., Zou, T., Ma, Y. J., Wang, J. W., & Zhang, Y. Q. (2016). Antioxidant and DNA damage protecting activity of exopolysaccharides from the endophytic bacterium *Bacillus Cereus* SZ1. *Molecules*, 21(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21020174>
- Zou, L., Wang, H., He, B., Zeng, L., Tan, T., Cao, H., ... y Li, Y. (2016). Current approaches of photothermal therapy in treating cancer metastasis with nanotherapeutics. *Theranostics*, 6(6), 762.
- Zucchi, T. D., Guidolin, A. S. y Cónsoli, F. L. (2011). Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus* Brunneus (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiol Res.*, 166, 68–76.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Ricardo Romero Arguelles

Candidato para el grado de:

**Doctorado en Ciencias con orientación en Inmunobiología**

**Tesis:**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS Y PARTICIONES BIOACTIVAS DE CULTIVOS DE *BACILLUS SP.* ENDÓFITOS AISLADOS DE *IBERVILLEA SONORAE* (S. WATSON) GREENE CONTRA EL LINFOMA MURINO L5178Y-R

**Campo de estudio:** Inmunología

**Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Navojoa, Sonora, el 24 de Octubre de 1993, hijo de Jesús Arguelles Samaniego y Ricardo Romero Arguelles.

**Educación:**

- Egresado de la Universidad de Sonora, grado obtenido: Licenciado Químico Biólogo Clínico en el 2017 con mención honorífica.
- Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Maestría en ciencias con orientación en Microbiología en el 2020.