



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

**“MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE BEAUVERICINA EN CULTIVO  
SÓLIDO PARA SU USO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO”**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en C. Farmacéuticas José Norberto Vásquez Bonilla**

Director: **Dr. Octavio Loera Corral**

Co-Director: **Dr. Juan Esteban Barranco Florido**

Asesor: **Dra. Edith Ponce Alquicira**

Ciudad de México a 04 de Noviembre del 2022

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

Ciudad de México a 04 de Noviembre del 2022

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
tesis

**" MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE BEAUVERICINA EN CULTIVO  
SÓLIDO PARA SU USO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO "**

que presentó

M. en C. Farmacéuticas José Norberto Vásquez Bonilla

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Co-Director: Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

**Jurado:**

Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquicira

Secretario: Dr. Javier Barrios Gonzáles

Vocal: Dra. Aida Hamdan Partida

Vocal: Dr. Cesar Espinoza Ramírez

## RESUMEN

La beauvericina (BEA), es un metabolito secundario de interés farmacéutico que producen algunas especies de hongos entomopatógenos y fitopatógenos, tiene diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica, antiviral y antitumoral; de hecho, se ha corroborado su potencial terapéutico como agente anticanceroso en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de hongos pueden desarrollarse en cultivos sólidos los cuales poseen un gran potencial para la síntesis de metabolitos secundarios y compuestos bioactivos de interés farmacéutico.

En el presente estudio se realizó una identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos y fitopatógenos, posteriormente se amplificó parcialmente el gen de la beauvericina sintetasa y se realizó una comparación en la producción de BEA entre cultivo en estado líquido y cultivo en estado sólido, utilizando dos medios de composiciones diferentes, después se aplicaron estrategias biotecnológicas para aumentar la producción de beauvericina como: el uso de medio de cultivo más concentrado en SSF de PUF y realizar cultivos mixtos, finalmente la beauvericina fue purificada por HPLC y caracterizada por espectroscopia de masas (MALDI-TOF y ESI-TOF), para utilizarse en ensayos *in vitro* para determinar su efecto antibacteriano en combinación con diferentes antibióticos.

Los resultados mostraron que la producción de beauvericina aumenta en el cultivo en estado sólido en comparación con el cultivo en estado líquido, utilizando el mismo medio de cultivo. El medio de cultivo que presentó la mayor producción de beauvericina fue el concentrado 3X y se utilizó para realizar cultivos mixtos, alcanzando la máxima producción de beauvericina en tan solo siete días de cultivo, lo que supera el tiempo de producción de cualquier sistema de cultivo reportado hasta ahora. Finalmente se encontró que cuando se combina con diferentes antibióticos la beauvericina posee un fuerte efecto sinérgico frente a *Staphylococcus aureus*, pero un fuerte efecto antagonista en *Salmonella typhimurium*.

## ABSTRACT

Beauvericin (BEA), is a secondary metabolite of pharmaceutical interest produced by some species of entomopathogenic and phytopathogenic fungi. It has various biological activities: antimicrobial, antifungal, antiviral and antitumor; in fact, its therapeutic potential as an anticancer agent has been confirmed in *in vitro* and *in vivo* tests. This type of fungi can grow in solid cultures which have great potential for the synthesis of secondary metabolites and bioactive compounds of pharmaceutical interest.

In the present study, a molecular identification of strains of entomopathogenic and phytopathogenic fungi was carried out, subsequently the beauvericin synthetase gene was partially amplified and a comparison was made in the production of BEA between culture in liquid state and culture in solid state, using two media of different compositions, then biotechnological strategies were applied to increase the production of beauvericin such as: the use of culture medium more concentrated in PFS of PUF and performing mixed cultures, finally the beauvericin was purified by HPLC and characterized by mass spectroscopy (MALDI-TOF and ESI-TOF), to be used in *in vitro* tests to determine its antibacterial effect in combination with different antibiotics.

The results showed that beauvericin production is increased in solid state culture compared to liquid state culture, using the same culture medium. The culture medium that presented the highest production of beauvericin was the 3X concentrate and used for mixed cultures, reaching the maximum production of beauvericin in just seven days of culture, which exceeds the production time of any culture system reported so far. Finally, it was found that when combined with different antibiotics, beauvericin has a strong synergistic effect against *Staphylococcus aureus*, but a strong antagonistic effect against *Salmonella typhimurium*.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi querido director de tesis el Dr. Octavio Loera, que me acepto en su grupo de trabajo, pese a que me conocía muy poco, me dio la confianza de desarrollar mi propuesta de investigación y trabajar a mi ritmo. Estoy seguro de que no te decepcione Dr. más que un director de tesis, te considero un buen amigo con quien puedo confiar.

A mi codirector de tesis el Dr. Esteban Barranco, que de alguna manera vio en mi un potencial depositando su confianza en mi desde el servicio social hasta ahora.

A mi asesora de tesis la Dra. Edith Ponce, por aceptar ser mi asesora sin conocerme y brindarme la confianza de entrar a su laboratorio.

A mis padres, Irene Bonilla y Bulfrano Vásquez, por formarme como la persona que soy, enseñándome a ser honesto, justo, agradecido y humilde. Los amo.

A mi amigo, Eduardo Juárez, por hacerme ver el camino correcto en los momentos difíciles, a lo largo de todos estos años que llevo de conocerlo.

A mi mejor amiga Yasmin Santos, por acompañarme en las buenas y en las malas durante todos estos años.

A mi mejor amigo Marco Antonio Gómez Solano, por todos estos años de amistad, la confianza que me ha brindado y el apoyo en las buenas y en las malas.

***Existen tantos átomos en una sola molécula de tu ADN como existen estrellas en una galaxia promedio.***

Neil deGrasse Tyson

## **ABREVIATURAS**

**HE:** Hongos entomopatógenos

**BEA:** Beauvericina

**RFLP:** Análisis de los productos de digestión

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

**BbBeas:** Beauvericina sintetasa en la especie *Beauveria bassiana*

**D-HYIV:** D-2-hidroxiisovalerato

**L-Phe:** L-fenilalanina

**Hbu:** Ácido DL-2-hexabutírico

**RPMI:** Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos

**PKA:** Proteína quinasa A

**RTKs:** Receptor de tirosina quinasa

**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico

**PDA:** Agar dextrosa-papa

**SSF:** Cultivo en estado sólido

**SmF:** Cultivo en estado líquido

**a<sub>w</sub>:** Actividad de agua (*water activity*)

**ROS:** especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

**ac:** autoclaveado

**PBS:** Buffer fosfato salino (*Phosphate-buffered saline*)

**BEAS:** Beauvericina sintetasa

**BbBEAS:** Beauvericina sintetasa en *B. bassiana*

**bbBeas:** Gen de la beauvericina sintetasa en *B. bassiana*

**ES:** Enniatina sintetasa

**BS:** Bassianoloide sintetasa

**PS:** Péptido sintetasa

**HP:** Proteína hipotética

**ABC:** Área bajo la curva

**EFS:** Extracción en fase sólida

**MS:** Espectroscopia de masas

**MALDI:** Desorción/ionización láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

**ESI:** Ionización por electrospray

**TOF:** Tiempo de vuelo (Time-Of-Flight)

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Hongos entomopatógenos</b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Proceso de infección de los HE .....	3
2.1.2 <i>Beauveria bassiana</i> .....	3
2.1.3 Género <i>Cordyceps</i> .....	4
<b>2.2 Hongos fitopatógenos</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Género <i>Fusarium</i> .....	4
<b>2.3 Hongos oportunistas</b> .....	<b>5</b>
2.3.1 <i>Epicoccum nigrum</i> .....	5
<b>2.4 Métodos de identificación de hongos filamentosos</b> .....	<b>6</b>
2.4.1 Identificación bioquímica .....	6
2.4.2 Análisis de los patrones de digestión .....	7
2.4.3 Regiones ITS y genes ribosomales .....	7
2.4.4 $\beta$ -Tubulina.....	8
2.4.5 Actina .....	8
2.4.6 Factor de elongación alfa .....	9
<b>2.5 Metabolitos secundarios</b> .....	<b>9</b>
2.5.1 Regulación de la producción de metabolitos secundarios .....	10
2.5.1.1 regulación por catabolitos de carbono.....	10
2.5.1.2 Regulación por nitrógeno y fosforo .....	10
2.5.1.3 Regulación por retroalimentación.....	11
2.5.1.4 Regulación por estímulos ambientales y transducción de señales.....	12
2.5.1.5 Otros tipos de regulación.....	12
<b>2.6 Beauvericina</b> .....	<b>13</b>
2.6.1 Síntesis de la beauvericina .....	13
2.6.2 Producción de beauvericina .....	14
2.6.3 Purificación de la beauvericina.....	16
2.6.4 Actividad biológica de la beauvericina .....	16
2.6.4.1 Actividad insecticida .....	17
2.6.4.2 Actividad antibacteriana.....	17
2.6.4.3 Actividad antifúngica .....	19
2.6.4.4 Actividad antiviral.....	19
2.6.5 Actividad citotóxica de la beauvericina en ensayos <i>in vitro</i> .....	20
2.6.6 Actividad antitumoral de la beauvericina en ensayos <i>in vivo</i> .....	21
2.6.7 Mecanismo de acción de la beauvericina sobre células cancerígenas .....	22

2.6.7.1 MAP quinasas .....	23
2.6.7.2 Capacidad ionófora de la beauvericina .....	24
2.6.7.3 Proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas: Familia Bcl-2.....	25
2.6.7.4 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial .....	25
<b>2.7 Fermentación en estado sólido .....</b>	<b>26</b>
2.7.1 Producción de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido .....	26
2.7.2 Ventajas de la fermentación en estado sólido .....	27
<b>2.8 Estrés oxidante.....</b>	<b>28</b>
<b>2.9 Actividad de agua.....</b>	<b>29</b>
<b>2.10 Ensayos de viabilidad celular .....</b>	<b>30</b>
2.10.1 Ensayo de MTT .....	30
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>4. HIPOTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 Objetivo general .....	32
5.2 Objetivos particulares .....	32
<b>6. DIAGRAMA DE ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>33</b>
<b>7.MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>34</b>
7.1 Microorganismo.....	34
7.2 Identificación molecular.....	34
7.2.1 Extracción de ADN.....	34
7.2.2 Amplificación de las regiones ribosomales ITS, gen de actina y gen del factor de elongación $\alpha$ .....	35
7.2.3 Amplificación del gen de la beauvericina sintetasa.....	36
7.2.4 Purificación de los productos de PCR.....	38
7.2.5 Secuenciación.....	38
7.3 Filogenia .....	38
7.4 Condiciones del cultivo sólido .....	39
7.4.1 Cultivos mixtos.....	39
7.4.2 Tratamiento del caparazón .....	40

7.4.3 Obtención de restos celulares .....	40
7.4.4 Pulsos oxidantes .....	40
7.4.5 Actividad de agua .....	41
<b>7.5 Purificación de la beauvericina .....</b>	<b>41</b>
7.5.1 Extracción de los metabolitos secundarios .....	41
7.5.2 Prepurificación de los metabolitos secundarios.....	42
7.5.3 Análisis cromatográfico .....	42
7.5.4 Análisis por espectroscopia de masas ESI-TOF .....	42
7.5.5 Análisis por espectroscopia de masas MALDI-TOF .....	43
<b>7.6 Ensayos in-vitro.....</b>	<b>44</b>
7.6.1 Líneas celulares.....	44
7.6.2 Citotoxicidad de la BEA .....	44
7.6.3 Cepas bacterianas .....	45
7.6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....	45
7.6.5 Determinación de sinergismo .....	46
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>8.1 Extracción de ADN.....</b>	<b>48</b>
<b>8.2 Identificación molecular.....</b>	<b>50</b>
<b>6.3 Amplificación del gen de la beauvericina sintetasa .....</b>	<b>56</b>
<b>8.4 Filogenia .....</b>	<b>61</b>
<b>8.5 Análisis cromatográfico.....</b>	<b>63</b>
<b>8.6 Producción de beauvericina .....</b>	<b>65</b>
8.6.1 Producción de beauvericina en SSF y SmF.....	65
<b>8.7 Espectroscopia de masas ESI-TOF y MALDI-TOF .....</b>	<b>73</b>
<b>8.8 Concentración del medio de cultivo .....</b>	<b>78</b>
<b>8.9 Cinética de producción de BEA.....</b>	<b>81</b>
<b>8.10 Actividad de agua (a<sub>w</sub>).....</b>	<b>83</b>
<b>8.11 Pulsos oxidantes.....</b>	<b>86</b>
<b>8.12 Cultivos mixtos.....</b>	<b>90</b>
<b>8.13 Ensayos <i>in-vitro</i> con células cancerígenas .....</b>	<b>97</b>
<b>8.14 Efecto antimicrobiano de la beauvericina .....</b>	<b>103</b>

<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	111
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	113
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	114
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	115
<b>13. ANEXOS</b> .....	131

## 1. INTRODUCCIÓN

La beauvericina (BEA) es una micotoxina de la familia de moléculas conocida como depsipéptidos cíclicos y es producida por algunos hongos como *B. bassiana* y los del género de *Fusarium sp.* (Wang & Xu, 2012). Se sintetiza por una vía no ribosomal característica de los hongos, es decir se lleva a cabo unión de aminoácidos fuera del ribosoma, en el caso de la BEA lo hace mediante la enzima beauvericina sintetasa, la cual está codificada por el gen *bbBeas* en la especie *B. bassiana* o *foBeas* en la especie *F. oxysporum* y lleva a cabo la biosíntesis tomando como sustrato el ácido D-2-hidroxiisovalérico (D-HYIV) y la L-fenilalanina (L-Phe) (Wang & Xu 2012; Jiang *et al.*, 2013). La beauvericina presenta gran variedad de actividades biológicas como: insecticida, antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral (Agahi *et al.*, 2021; Ganassi *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2009; Meca *et al.*, 2010; Wang & Xu, 2012).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial con casi 10 millones de defunciones en 2020 (OMS, 2022), por lo que ha incrementado el interés en mejorar la producción de BEA y en su estudio como agente antitumoral, debido a su efecto citotóxico en gran variedad de células cancerosas, disminución de peso y tamaño de tumores en ensayos *in vivo* (Cheng *et al.*, 2009; Heilos *et al.*, 2017), y por sus mecanismos de acción propuestos como: aumento intracelular de calcio, participación de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, liberación del citocromo C, entre otros (Kouri *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Wätjen *et al.*, 2014). La BEA también ha mostrado un efecto sinérgico en combinación con antimicóticos (Zhang *et al.*, 2007), sin embargo, hasta el momento no se han llevado a cabo ensayos que demuestren si también existe un efecto sinérgico al combinar BEA con antibióticos o antitumorales como el cisplatino que es uno de los antitumorales más prescritos para tratar el cáncer de pulmón.

La producción de BEA se lleva a cabo mediante cultivos líquidos, también conocidos como cultivos sumergidos, de hongos productores de BEA y para su purificación primero se utiliza generalmente una extracción en fase sólida que aproveche sus

propiedades fisicoquímicas, y posteriormente una purificación final por HPLC preparativo (Meca *et al.*, 2010; Valencia *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013).

El cultivo en estado sólido es un sistema de bajo costo que presenta una alta productividad de compuestos bioactivos, donde los microorganismos crecen sobre materiales sólidos insolubles e inertes que poseen suficiente agua libre para que se lleven a cabo las reacciones metabólicas (Ruiz-Leza *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2013). Diferentes estudios describen las ventajas del cultivo en estado sólido para producir compuestos bioactivos de valor agregado como: enzimas, metabolitos secundarios, antibióticos, ácidos orgánicos, pigmentos, factores de crecimiento, alcaloides, compuestos aromáticos entre muchos otros (Singhania *et al.*, 2009; Nagavalli *et al.*, 2015; Farinas, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017). En el cultivo en estado sólido es posible realizar cultivos mixtos (cultivos donde coexisten dos o más microorganismos donde al menos uno de ellos está viable) que aumentan aún más la producción y variabilidad de metabolitos secundarios, además posee numerosas ventajas frente a la fermentación líquida o sumergida, y al llevarse a cabo en biorreactores pequeños y cerrados facilita el escalamiento a nivel industrial (Behera & Ray, 2016; Bertrand *et al.*, 2014; Chagas *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2011). Sin embargo, este tipo de cultivo no se ha utilizado para la producción de BEA.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos (HE), son aquellos que parasitan diferentes órdenes de insectos, incluidas especies consideradas plagas agrícolas lo que los convierte en alternativas sustentables para el manejo de plagas (Meyling *et al.*, 2007; Rondot & Reineke 2018), a diferencia de los insecticidas químicos, los HE no causan resistencia en las plagas ni contaminan los alimentos agrícolas obtenidos, como lo hacen los insecticidas químicos (Fernandes & Bittencourt 2008). Esto ha derivado en la formulación de bioinsecticidas basados en conidios de HE, especialmente de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Faria & Wraight 2007; Muñoz-Paredes *et al.*, 2017).

### **2.1.1 Proceso de infección de los HE**

El proceso de infección de los HE comienza con el contacto directo del conidio con la cutícula externa del insecto, este contacto genera interacciones no covalentes como hidrofóbicas, que deriva en la adhesión del conidio a la cutícula la adhesión del conidio a la cutícula externa del insecto, posteriormente inicia la producción de diferentes enzimas líticas por parte del hongo las cuales le abren paso a los nutrientes de la hemolinfa. Estos procesos activan la vía de señalización responsable de la síntesis de gran variedad de metabolitos secundarios, de hecho, empiezan a ser sintetizados en esta etapa de la infección. Finalmente estos metabolitos causarán la muerte al insecto, mientras el hongo produce metabolitos secundarios también aumenta la expresión genes antioxidantes, que ayudan al hongo a resistir el estrés oxidativo, ocasionado por el sistema inmune del insecto; por otra parte, los HE también han desarrollado otras estrategias para evadir el sistema inmune de los insectos como cambiar su estructura celular otorgando resistencia a diversos factores, o lo enmascaran haciéndolo imperceptible frente al sistema inmune del insecto (Pedrini *et al.*, 2007; Dubovskiy *et al.*, 2013 Mascarin *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2017).

### **2.1.2 *Beauveria bassiana***

Se trata de un HE ascomiceto y mitospórico descrito en el año 1835 por el entomólogo italiano Agostino Bassi de donde deriva su nombre, este hongo se encuentra presente en los suelos de todo el mundo siendo capaz de infectar a diferentes órdenes de insectos, siendo uno de los HE más estudiados y distribuido en el mundo como bioinsecticida para el control de diferentes plagas de interés agrícola (Xiao *et al.*, 2012; Valero-Jimenez *et al.*, 2016). Debido a la amplia diversidad genética en aislados de esta especie, existe variabilidad en su capacidad de infectar por lo que la industrialización de esta especie contempla una selección de aislados, siendo los mejores los más virulentos y patógenos, esta variabilidad se deriva de las diferencias de cada aislado en su capacidad para producir enzimas que participan en el proceso infectivo, cantidad de metabolitos secundarios que

producen y tolerancia a factores ambientales (Xiao *et al.*, 2012; Galidevara *et al.*, 2016; Gasmi *et al.* 2021).

### **2.1.3 Género *Cordyceps***

Se trata de un género de HE ascomicetos capaces de infectar diferentes órdenes de insectos, por lo que algunas especies como *C. fumosorosea* y *C. javanica* han sido utilizadas como micoinsecticidas. La capacidad de estos hongos para el control de plagas deriva de su amplia gama de metabolitos secundarios que produce, los cuales han sido aislados para su uso como insecticidas (Wu *et al.*, 2021). Sin embargo, algunas especies como *C. militaris*, *C. cicadae*, *C. guangdongensis* y *C. sinensis* han sido producidas para su uso como suplementos alimenticios y medicina tradicional debido a su contenido de adenosina, metabolitos de interés farmacéutico y minerales, así en los últimos años ha aumentado el número de investigaciones acerca de la seguridad en el consumo de estos hongos, ya que gran número de estos metabolitos tienen propiedades neurotóxicas y citotóxicas (Chen *et al.*, 2020).

## **2.2 Hongos fitopatógenos**

Los hongos fitopatógenos son aquellos que pueden infectar plantas y causarles enfermedad, siendo los responsables de hasta el 25% de las pérdidas totales de los principales cultivos de consumo humano a nivel mundial como arroz, trigo, maíz, papa, soya, hortalizas, pepino, tomate, melón, frijoles, la pimienta, remolacha, zanahoria entre otras (INECOL, 2021). Los géneros de hongos fitopatógenos de mayor importancia son *Fusarium*, *Giberella*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Alternaria* y *Botrytis*, siendo las especies del género *Fusarium* las de mayor prevalencia, la infección de estos hongos produce en la planta diferentes tipos de enfermedades que culminan en marchitez vascular y muerte de la planta, mientras que en los frutos y semillas son contaminados con micotoxinas dañinas para los mamíferos (Rojas-Badia *et al.*, 2017).

### **2.2.1 Género *Fusarium***

Se trata de un género de hongos filamentosos ampliamente distribuido por el suelo, la mayoría de las especies son saprofitas y se asocian directamente con las plantas. Sin embargo, algunas especies son fitopatógenas causando serias lesiones necróticas en diferentes partes de la planta, que derivan en los casos más graves en su muerte (Rojas-Badia *et al.*, 2017). Las especies de *Fusarium* son capaces de producir gran variedad de micotoxinas que contaminan alimentos de origen vegetal, pero solo algunas de estas son consideradas importantes para la salud humana como lo son fumosinas, tricotecenos y zearalenonas; por otra parte, diferentes especies del género *Fusarium* son importantes productoras de metabolitos secundarios de interés industrial y farmacéutico con interesantes actividades biológicas tales como antibacteriana, antifúngica, antiviral, inmunosupresoras y antitumoral de los cuales destacan los terpenoides, alcaloides y otros como la BEA (Ferrari & Reyes, 2012).

### **2.3 Hongos oportunistas**

Los hongos oportunistas son considerados un grupo de microorganismos patógenos para cierto tipo de organismos superiores vulnerables, como mamíferos o plantas, siendo su vulnerabilidad dada por inmunosupresión causada por un agente patógeno en los mamíferos o por medicamentos en el ser humano, y en el caso de las plantas por una infección patógena previa o por daños físicos en esta (Pappas, 2010). Muchos hongos oportunistas de ciertas especies de plantas pueden encontrarse en otras de forma endófitas, es decir que no van a causar enfermedad en la planta, por el contrario, pueden proporcionar protección a ésta frente a otros patógenos al generar metabolitos secundarios inocuos o poco tóxicos, además de modificar la producción de metabolitos de la propia planta que en conjunto evitan la infección de agentes patógenos como bacterias y hongos fitopatógenos (Barenstrauch *et al.*, 2020; Sarsaiya *et al.*, 2020).

#### **2.3.1 *Epicoccum nigrum***

Se trata de un hongo saprófito que puede ser fitopatógenos o endófito extendido globalmente en diferentes tipos de suelo, produce conidios que van de los 15 a los 25 µm de diámetro y posee un rápido crecimiento, pudiendo alcanzar colonias de 6

cm en dos días, las cuales presentan coloración que va del amarillo hasta el rojo o café debido a pigmentos y metabolitos secundarios de interés industrial y farmacéutico por su actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antitumoral, mismos que protegen a la planta donde se encuentran como endófitos de infecciones de hongos fitopatógenos u otros patógenos como bacterias (Alcock *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2020; El-Sayed *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2020). Las investigaciones recientes sobre *Epicoccum nigrum* se basan principalmente en estrategias biotecnológicas que aumenten la producción de sus metabolitos de interés o la purificación de estos (Kaur *et al.*, 2019; Kaur & Mumbarkar, 2019).

## **2.4 Métodos de identificación de hongos filamentosos**

La identificación de hongos filamentosos resulta de gran importancia para reconocer e identificar las especies con las que se va realizar una investigación, así como seleccionar especies candidatas a ser una alternativa biológica a los insecticidas en el caso de los HE, siendo uno de los métodos más utilizados la identificación morfológica basada en la observación macroscópica de los hongos como forma y color de la colonia, así como la observación microscópica de la morfología de las hifas y los conidios (Nizamani *et al.*, 2021). Otro de los métodos de identificación se basa en las características bioquímicas de cada microorganismo para producir enzimas o metabolitos secundarios fácilmente detectables con pruebas de laboratorio, las cuales son características de cada género de hongos filamentosos. Uno de los métodos de identificación más contundentes es la identificación molecular, ya que permite la diferenciación de especies cercanas que no pueden ser distinguidas mediante identificación morfológica o bioquímica. La identificación molecular se basa en la amplificación y secuenciación de diferentes partes características del genoma y únicas de cada especie, por lo que son una herramienta fiable para la identificación de especies (Al-hemaid *et al.*, 2014; Sarsaiya *et al.*, 2020).

### **2.4.1 Identificación bioquímica**

La identificación bioquímica se basa en las características tintoriales y bioquímicas de los microorganismos, considerando las capacidades de estos para producir

enzimas o moléculas que se detectan con facilidad, estas moléculas o enzimas son características de especies estrechamente relacionadas, ya que especies relacionadas o que pertenecen al mismo género modifican de manera característica el ambiente donde se encuentran, mediante la captación de sustancias necesarias para su crecimiento (Trindade *et al.*, 2016). Estas reacciones bioquímicas producto ocasionadas por el hongo y su medio de cultivo representan una herramienta útil para su identificación y clasificación (Santos & Linardi, 2003).

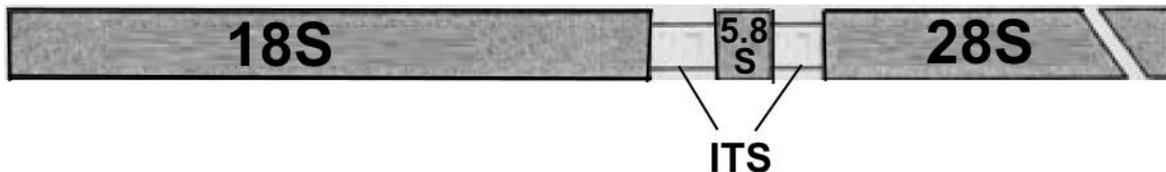
#### **2.4.2 Análisis de los patrones de digestión**

Se trata de un análisis actualmente poco usado para la identificación de especies, en especial de especies estrechamente relacionadas ya que ha sido remplazado por otros métodos moleculares, sin embargo, este método sigue teniendo importancia en la tipificación de aislados sin la necesidad de herramientas moleculares más complejas. Se basa en el análisis de secuencias particulares de cada especie, las cuales son obtenidas mediante PCR y posteriormente los productos de PCR son digeridos por enzimas de restricción, lo que deriva en la obtención de patrones de bandas (de tamaño definido y medible) para cada una de las enzimas de restricción, estas bandas resultantes pueden distinguirse por electroforesis de gel de agarosa y compararse con otros patrones de bandas (Dashtipour *et al.*, 2021); sin embargo, los fragmentos originados son muchas veces difícilmente diferenciados entre ellos, ya que es común que posean longitudes similares que deriva en migraciones en el gel de agarosa muy similar, generando una identificación errónea de especies. Otra de sus desventajas es que no es posible observar cambios en el genoma como mutaciones (Poczai *et al.*, 2013).

#### **2.4.3 Regiones ITS y genes ribosomales**

Las secuencias ITS (internal transcribed spacer) son secuencias que separan los genes ribosomales entre sí (figura 1) y son altamente conservadas entre especies lo que las hace útiles para su amplificación y secuenciación junto con los genes ribosomales para la identificación de especies, incluso si están estrechamente relacionadas, cosa que no ocurre con otros métodos como la identificación

morfológica o bioquímica (Al-hemaid *et al.*, 2014). Otra de las ventajas de este método es que los genes ribosomales y regiones ITS tienen gran cantidad de copias en el genoma lo que facilita su amplificación y secuenciación, lo cual no ocurre con la identificación molecular mediante la amplificación de otros genes que solo tienen un número limitado de copias en el genoma (Huang *et al.*, 2009; Stielow *et al.*, 2015).



**Figura 1:** Genes ribosomales y regiones ITS. Modificada de White 1990.

#### 2.4.4 $\beta$ -Tubulina

Las tubulinas son una familia de proteínas con una similitud de hasta el 40% entre ellas y se conforman por las las tubulinas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), siendo las tubulinas alfa y beta subunidades esenciales de los microtúbulos de las células eucariontes, ya que se originaron junto con la aparición de las células eucariontes, por lo anterior los genes que codifican para estas tubulinas presentan una gran divergencia de una especie a otra, lo que las hace ideales para la identificación molecular de especies; sin embargo, la divergencia evolutiva que sirve para la identificación molecular solo se encuentra en gen que codifica para el extremo terminal de las tubulinas alfa y beta, ya que el resto está altamente conservado debido a la función esencial que lleva a cabo en la célula (Llanos *et al.*, 1999; Oakley, 2000). Debido a esta divergencia evolutiva la amplificación y secuenciación de los genes de las tubulinas alfa y beta es un método utilizado para la identificación molecular de especies, posee ventaja frente a los métodos de identificación morfológica y bioquímica por diferenciar las especies a nivel molecular (Mohamed-Moustafa *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020).

#### 2.4.5 Actina

Se trata de una familia de proteínas que forman los microfilamentos, componentes fundamentales del citoesqueleto de todos los organismos eucariotas, y cumplen importantes funciones celulares como la motilidad celular y cambios de forma de la célula durante la división celular, organización del citoplasma, incluso la actina genera fuerzas mecánicas dentro de la célula como respuesta de señales extracelulares, lo que deriva en una alta conservación en su secuencia a lo largo de la evolución. Por lo anterior, se utiliza ampliamente para la identificación molecular de especies, aun si están muy relacionadas con otras, ocasionando que sean difícilmente diferenciadas entre sí por otros métodos como los morfológicos, por lo tanto, utilizado especialmente en la identificación de hongos filamentosos (Guirado *et al.*, 2002; Gunning *et al.*, 2015).

#### **2.4.6 Factor de elongación alfa**

Es una proteína que se expresa de manera constitutiva y de forma abundante, juega un rol crucial para la traducción de proteínas eucariotas actuando simultánea con el ARN de transferencia para proporcionar los aminoácidos para la formación de cadenas peptídicas (Ríos & Ríos, 2011). Debido a que el gen que lo codifica muestra un alto nivel de polimorfismo entre cada especie, incluso en las que están relacionadas entre sí, su amplificación y posterior secuenciación o digestión con enzimas de restricción son métodos ampliamente utilizados para la identificación molecular de especies, siendo junto a otros métodos basados en la amplificación y secuenciación de genes como los ribosomales y la tubulina, los más usados para una identificación más específica, lo que representa una alternativa a métodos no moleculares y menos específicos como la identificación morfológica o bioquímica (Hafez *et al.*, 2020; Mirhendi *et al.*, 2015).

#### **2.5 Metabolitos secundarios**

Se trata de compuestos orgánicos con varias y sofisticadas estructuras químicas producidos por microorganismos después de su fase de crecimiento (trofofase), durante una fase llamada idiofase, estos compuesto no son esenciales para el crecimiento del microorganismo pero poseen un enorme rango de actividades biológicas, por lo que juegan un rol importante en el proceso infectivo en el caso de

los HE, ya que la mayor producción de estos se lleva durante este y provocan la muerte al insecto (Barrios-Gonzales, 2012; Barrios-Gonzales, 2018; Pucheta *et al.*, 2006).

### **2.5.1 Regulación de la producción de metabolitos secundarios**

Las rutas de regulación de los metabolitos secundarios pueden ser globales y están conectadas a las vías de regulación de los metabolitos primarios por lo que la inducción, regulación o retroalimentación por catabolitos de carbono, agotamiento de ciertos nutrientes y cambios en los factores ambientales como temperatura y pH afectan la biosíntesis de metabolitos secundarios. Por otro lado, también puede existir una regulación más específica de la producción de metabolitos secundarios dada por factores de transcripción específicos para un grupo de metabolitos secundarios (Barrios-González, 2018).

#### **2.5.1.1 Regulación por catabolitos de carbono**

Se trata de una regulación negativa para la producción de metabolitos secundarios dada por la fuente de carbono del medio. En este tipo de regulación la presencia de glucosa reprime los genes biosintéticos de los metabolitos secundarios al mismo tiempo que reprime la expresión de enzimas que interfieren en el aprovechamiento de fuentes de carbono más complejas o directamente inhibiendo enzimas responsables de la síntesis de metabolitos, para evitar este tipo de inhibición en la producción de metabolitos secundarios se opta por utilizar fuentes de carbono de compleja asimilación como el almidón y mantener a la glucosa en concentraciones bajas o subreguladoras (Barrios-González, 2018; Demian, 1989; Miao *et al.*, 2019).

#### **2.5.1.2 Regulación por nitrógeno y fosforo**

La producción de diferentes metabolitos secundarios fúngicos como la penicilina, la cefalosporina C y las aflatoxinas, se ve afectada por la presencia de nitrógeno especialmente de amoníaco, por lo que una estrategia para fomentar la alta productividad de metabolitos secundarios es la limitación de nitrógeno fácilmente asimilable por el microorganismo y se opta por usar fuentes complejas de nitrógeno

como la harina de soja y la semilla de algodón entre otros subproductos de la industria agrícola (Barrios-González, 2018).

Por otro lado, al igual que como ocurre con el nitrógeno, el fósforo también presenta una regulación negativa en la producción de metabolitos secundarios algunos ejemplos de metabolitos que disminuyen su producción por la presencia de fósforo son las cefalosporinas, tilosina y la vancomicina, por lo que la producción de estos compuestos se lleva a cabo en condiciones nutricionales limitadas de fosfato. El mecanismo de como el fosfato posee una regulación negativa en la producción de metabolitos secundarios se ha propuesto es a nivel de una cascada de transducción de señales, dada por el sistema PhoR-PhoP. La proteína PhoR es una quinasa (sensor de fosfato) de membrana que al activarse fosforila a PhoP la cual una vez activa regula la respuesta de unión al ADN e inhibe la expresión de genes productores de metabolitos secundarios (Barrios-González, 2018; Martín, 2004)

### **2.5.1.3 Regulación por retroalimentación**

Este mecanismo controla la síntesis de metabolitos primarios como como los aminoácidos, nucleótidos y vitaminas. Se ha observado que muchos metabolitos secundarios como el cloranfenicol, idomicina, rastomicina, alcaloides, tilosina, penicilina, entre otros regulan su propia biosíntesis, Sin embargo, la regulación de muchos metabolitos secundarios no se lleva a cabo por una autorregulación sino que se ven regulados por un metabolito primario, por ejemplo la inhibición de la producción de un aminoácido (autorregulable) puede disminuir la síntesis de metabolitos secundarios que utilicen ese aminoácido como sustrato para su síntesis. Sin embargo, la regulación por retroalimentación no siempre disminuye la producción de metabolitos secundarios, ya que es posible que la inhiba la producción de un metabolito primario, lo que ocasione un aumento en las concentraciones del precursor de este metabolito primario el cual a su vez puede ser precursor de un metabolito secundario lo que deriva en un aumento en la producción de este (Barrios-González, 2018; Drew & Wallis, 1983)

#### **2.5.1.4 Regulación por estímulos ambientales y transducción de señales**

Las cascadas de transducción de señales están estrechamente relacionadas con los estímulos ambientales, una de estas cascadas de transducción incluye vías de señalización MAPK y PKA bien estudiadas en hongos filamentosos, que se sabe operan a través de la detección de nutrientes y funcionan en paralelo a la vía de las MAP quinasas, muchas veces inician por cascadas de señalización de tipo proteína quinasa A dependiente de AMPc y de tipo MAPK, las cuales están mediadas por receptores anclados a proteínas G, y en HE son generalmente activadas en etapas de infección (Barrios-González, 2018; Barranco *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunos casos subunidades de la proteína G puede regular negativamente factores de transcripción específicos de algunos metabolitos (Barrios-González, 2018). Los metabolitos secundarios proporcionan al hongo una adaptabilidad a su entorno y un mejor desarrollo en procesos infectivos (Carollo *et al.*, 2010).

#### **2.5.1.5 Otros tipos de regulación**

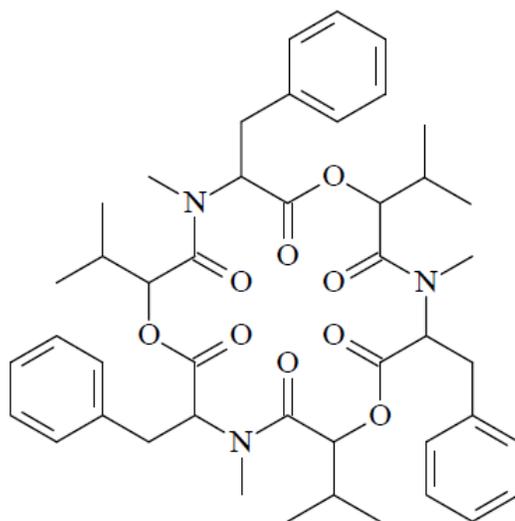
Se han descrito otros tipos de regulación de la producción de metabolitos secundarios como la regulación epigenética, la cual se basa en metilaciones y acetilaciones de histonas y en desmetilaciones de ADN que convierten la heterocromatina en eucromatina y con ello dan paso a los factores de transcripción provocando que enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios se expresen (De la peña & Loyola, 2017; Strauss & Reyes-Domínguez, 2011). También se ha observado que condiciones ambientales poco favorables para el crecimiento del microorganismo, son capaces de activar una proteína nuclear llamada *LaeA* la cual es capaz de realizar cambios en la cromatina y al igual que el caso anterior promover el acceso a los factores de transcripción y aumentar la producción de metabolitos secundarios (Keller *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2007).

Otro tipo de regulación puede ser un estímulo ambiental dado por la comunicación entre diferentes especies que inducen la producción de metabolitos secundarios mediante la acetilación de una de las subunidades de una histona lo que deriva en

un relajamiento de la cromatina y con ello la expresión de genes responsables de la producción de metabolitos secundarios (Barrios-González, 2018).

## 2.6 Beauvericina

La beauvericina (figura 2), es una micotoxina producida por varios hongos filamentosos, entomopatógenos como *B. bassiana* y *Cordyceps sp.* y fitopatógenos como *Fusarium sp.* pertenece a la familia de los depsipéptidos cíclicos (Wang & Xu, 2012). Su estructura está conformada por tres residuos de D-HYIV y tres residuos de metilfenilalanina de forma alternada, y es análoga a las enniatinas pero poseen diferencias en su actividad biológica (Meyling & Eilenberg, 2007).

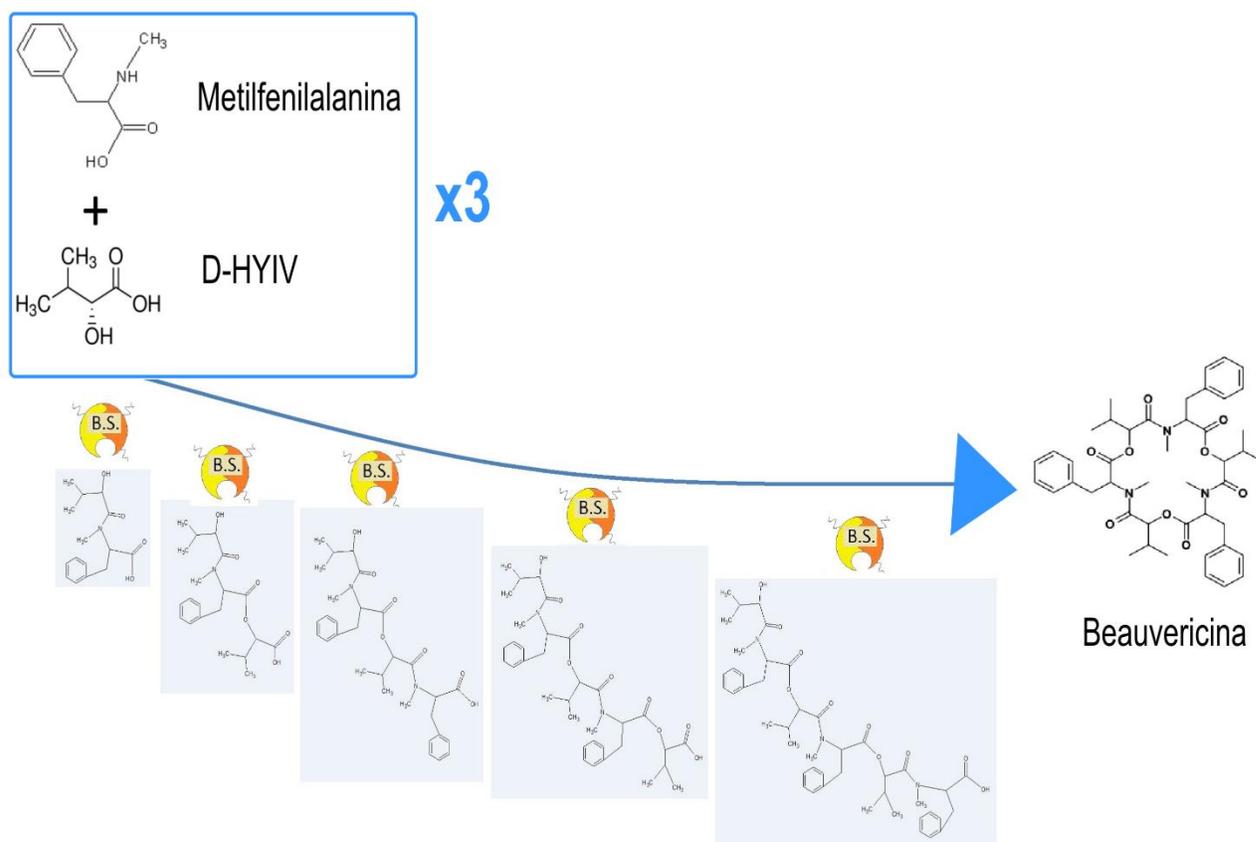


**Figura 2.** Molécula de la Beauvericina. Tomada de Wang & Xu, 2012.

### 2.6.1 Síntesis de la beauvericina

La síntesis de la beauvericina se lleva a cabo por un mecanismo no ribosomal característico de los hongos, el cual lleva a cabo unión de aminoácidos mediante una enzima, es decir existe unión de aminoácidos fuera del ribosoma, la enzima responsable de su síntesis es la beauvericina sintetasa (BEAS), la cual utiliza como sustratos D-HYIV y L-Phe (figura 3) (Wang & Xu, 2012). Sin embargo, la parte del genoma donde se encuentra el gen que codifica para esta enzima es altamente propensa a mutaciones ocasionando una la variabilidad genética alta en este gen

entre especies (Luangsa *et al.*, 2009). Existen otras enzimas estrechamente relacionadas a la BEAS pero difieren con esta por la selectividad de sustratos especialmente en la selección de los aminoácidos (Wang & Xu, 2012). Por otro lado, se ha reportado que cepas de *B. bassiana* producen una BEAS que es capaz de utilizar el ácido DL-2-hexabutirico (Hbu) y la DL-3-fluorofenilalanina como sustratos ocasionando la producción de análogos de BEA (Sivanathan & Scherckenbeck, 2014).



**Figura 3.** Síntesis de beauvericina. Representación esquemática que muestra la vía no ribosomal de síntesis de la BEA, catalizada por la enzima BEAS tomando como sustratos la metilfenilalanina y ácido D-2-hidroxiisovalérico.

## 2.6.2 Producción de beauvericina

La mayoría de los estudios reportan la producción de BEA mediante cultivos en estado líquido o sumergido, sin embargo, llevar a cabo la producción de BEA por este sistema requiere de condiciones asépticas, y mantener un buen

funcionamiento de los biorreactores que suelen ser de gran tamaño y requieren generalmente una fuente de energía eléctrica lo que los hace un proceso costoso. Por otra parte, se utiliza una gran cantidad de medio de cultivo para producir pequeñas cantidades de BEA la cual terminado el tiempo de cultivo es difícil de purificar debido a los altos volúmenes del medio de cultivo, por lo que la producción de BEA es altamente costosa si se produce en un medio líquido (Jiang *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2009).

### **2.6.2.1 Medios de cultivo productores de beauvericina**

La producción de BEA ha sido evaluada en diversos medios de cultivo líquido como medios mínimos, medios complejos como caldo dextrosa-papa y medios definidos que usan varias fuentes de carbono que van desde la glucosa hasta el sorbitol, la maltosa y la galactosa, además de diversas fuentes de nitrógeno como gran variedad de aminoácidos, peptona y nitrógeno inorgánico como sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), entre otros, incluso se han llevado a cabo combinaciones de fuentes de nitrógeno complejas e inorgánicas (Xu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011)

Los resultados de aquellos estudios que buscan optimizar un medio de cultivo que aumente la producción de BEA (Lee *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011) indican que la mejor fuente de carbono para la producción de BEA es la glucosa, por el contrario, algunos estudios indican que la fuente de carbono con la menor producción de BEA es la fructosa o la arabinosa, estos datos sugieren que no se lleva a cabo una inhibición en la producción de BEA por catabolitos de carbono. En cuanto las fuentes de nitrógeno la mejor fuente reportada para la producción de BEA es la peptona (Xu *et al.*, 2010), sin embargo, otro estudio (Lee *et al.*, 2008) indica que utilizar fuentes complejas de nitrógeno, como aminoácidos no aumenta la producción de BEA en comparación a fuentes inorgánicas como el nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) o el nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>), incluso obtienen la mayor producción específica de BEA al utilizar nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), como principal fuente de nitrógeno, aunque al utilizar sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) como principal fuente de nitrógeno la producción de BEA disminuye

considerablemente, lo que podría sugerir que hay una regulación negativa cuando el amonio se encuentra presente en el medio.

Por otra parte, Lee *et al.*, (2011) observaron que la producción de BEA no se ve afectada cuando se agregan al medio de cultivo aminoácidos que utiliza la beauvericina sintetasa como sustratos para la producción de BEA como la fenilalanina o L-valina lo que indica que no se lleva a cabo una regulación por retroalimentación que afecte su producción. Finalmente, para obtener una alta producción de BEA resulta ser más importante la selección de cepas que la del medio de cultivo, ya que se ha observado que la diferencia en la producción de BEA es demasiada alta entre una cepa y otra incluso cuando se trata de la misma especie de hongo (Luangsa *et al.*, 2009) debido a las variaciones genéticas que presenta el gen de la beauvericina sintetasa (Jirakkakul *et al.*, 2008), por lo que la mayor producción de BEA reportada hasta ahora (3.2 mg de BEA / gramo de biomasa) se debe a la cepa utilizada y no al medio de cultivo (Logrieco *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2008)

### **2.6.3 Purificación de la beauvericina**

Los procesos de purificación aprovechan las características fisicoquímicas de la BEA y utilizan solventes no polares donde sea soluble para su extracción, estos solventes polares se mezclan con la biomasa de los cultivos, posteriormente se separan los restos sólidos del solvente, los metabolitos extraídos con el solvente se someten a una purificación previa generalmente por extracción en fase sólida (EFS) usando una columna de sílica, C8 o C18 con el fin de separar los componentes polares previamente obtenidos de acuerdo a su grado de polaridad. Generalmente esta prepurificación se complementa con la purificación final HPLC preparativo, posterior a esto se necesita un análisis de identificación como espectroscopia de masas o resonancia magnética (Jiang *et al.*, 2013; Logrieco *et al.*, 2002; Meca *et al.*, 2010; Rachmawati *et al.*, 2018; Yiping *et al.*, 2007).

### **2.6.4 Actividad biológica de la beauvericina**

#### **2.6.4.1 Actividad insecticida**

Los HE productores de BEA comienzan a producir BEA y otros metabolitos secundarios cuando entran en contacto con la hemolinfa del insecto, una vez producidos se distribuyen fácilmente por el cuerpo del insecto lo que provoca la muerte del insecto (Whang & Xu, 2012).

La primera actividad biológica descrita para la BEA vez que se demostró que la beauvericina poseía esta actividad biológica fue en un modelo de *Artemia salina* en el año de 1969, desde ahí empezaron a realizarse diferentes estudios que muestran el potencial de la BEA como agente insecticida ya que muestra actividad contra *Calliphora erythrocephala*, *Aedes aegypti* y *Schizaphis graminum*, entre otros, donde se observa que la BEA supera la actividad insecticida de los controles utilizados y la de otros metabolitos análogos como las eniانتinas (Grove & Pople, 1980; Ganassi *et al.*, 2002). En cuanto a los mecanismos de acción de esta actividad biológica han sido poco descritos hasta ahora, pero se ha observado que la BEA posee actividad insecticida en especies de insectos resistentes a diferentes insecticidas (Al Khoury *et al.*, 2021).

#### **2.6.4.2 Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana de la BEA, ha sido observada en diferentes especies de bacterias de interés clínico como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, donde la BEA es capaz de inhibir su crecimiento tanto en cultivos líquidos como en cultivos sólidos, sin embargo, los mecanismos de acción de como la BEA posee este efecto permanecen sin elucidar, pero se ha propuesto que no inhibe la síntesis de peptidoglicano ya que no distingue entre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Meca *et al.*, 2010; Sondergaard *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011; Wang & Xu, 2012).

Por otro lado, la resistencia bacteriana a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial, aunque la resistencia a antibióticos es un fenómeno natural, el uso indebido de antibióticos está acelerando el proceso,

ocasionando un aumento en el número de infecciones por ejemplo, neumonía, tuberculosis, gonorrea y salmonelosis cuyo tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos actuales, estas infecciones pueden afectar a cualquier persona independientemente de su edad o país en el que viva, además, la resistencia a los antibióticos aumenta los costos médicos y la mortalidad de las infecciones. Debido a lo anterior la OMS tiene como objetivo una iniciativa para el año 2023 que tiene como objetivo desarrollar nuevos tratamientos mediante el desarrollo de nuevos antibióticos, así como la mejora de los ya existentes (OMS, 2022).

Debido al efecto antibacteriano de la BEA y a la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos, es posible analizar el efecto sinérgico de la BEA en combinación con antibióticos que permitan el desarrollo de nuevas terapias contra infecciones bacterianas en especial especies bacterianas de interés clínico como *Staphylococcus aureus* la cual se trata de una bacteria anaeróbica facultativa, grampositiva no esporulada distribuida por todo el mundo, se estima que alrededor de un 30% de la población humana se encuentra colonizada por ella, aunque no infectadas o con una enfermedad relacionada. Es productora de catalasa y coagulasa, así como la responsable de producir gran variedad de enfermedades que van desde benignas tales como foliculitis, conjuntivitis y abscesos profundos, hasta enfermedades que pueden llegar a ser mortales como sepsis endocarditis y neumonía, también puede causar enfermedades gastrointestinales debido a la producción de toxinas y es considerada como la principal causa de infecciones nosocomiales. Debido a lo anterior y a la emergente resistencia a antibióticos que se ha observado en esta especie, ha aumentado la investigación para encontrar nuevos antibióticos eficaces contra *S. aureus* (Maluda, 2017).

Por otra parte, tenemos a *Salmonella enterica* (*S. enterica*) que se trata de un bacilo gramnegativa y es considerado como un patógeno universal que se encuentra principalmente en aves y sus huevos, así como en reptiles. En humanos causa diarrea, dolor abdominal, vómitos y náuseas síntomas que en general no suelen perdurar por más de siete días, el serotipo *Typhimurium* de esta especie es el

principal causante de contaminación en comida, debido a que es el serotipo más común; actualmente se hace referencia a este solo como *S. typhimurium* y aunque genera síntomas similares a la fiebre tifoidea, no suele ser mortal en personas con un sistema inmune sano y es fácilmente tratada con fluoroquinolonas y cefalosporinas (Swanson *et al.*, 2007; Yilmaz, 2014). Sin embargo, en los últimos años se han detectado cepas resistentes a estos compuestos, mediada por bombas de eflujo activo que expulsan al fármaco de la bacteria, aunque se sabe poco de los genes responsables que codifican para estas bombas de eflujo, por lo que la investigación para hallar nuevos tratamientos contra *S. enterica* ha ido en aumento (Fabrega *et al.*, 2016).

#### **2.6.4.3 Actividad antifúngica**

Se ha demostrado que la beauvericina posee un efecto antifúngico inhibiendo el crecimiento de diferentes hongos de interés clínico, además de un fuerte efecto de sinergismo cuando se administra en conjunto con concentraciones subinhibitorias de ketoconazol, ya que se aumentó de manera significativa la supervivencia de ratones inmunosuprimidos infectados por *Candida parapsilosis*, además disminuyó el número de UFC de este hongo en órganos de los ratones como riñones, pulmones y cerebro, superando incluso el grupo que se trató con concentración terapéutica de ketoconazol (Zhang *et al.*, 2007). Aunque se desconoce el mecanismo de acción de la BEA, los resultados prometedores de sinergismo en combinación con ketoconazol llevaron a Tingting *et al.*, (2016) a realizar una formulación farmacéutica, combinando ambas sustancias, encontrando una alta estabilidad tanto de BEA como de ketoconazol, por lo que la beauvericina administrada en conjunto con otros fármacos antimicóticos puede dar lugar a nuevas terapias antimicóticas.

#### **2.6.4.4 Actividad antiviral**

Se ha observado que la BEA es capaz de inhibir de manera selectiva la integrasa del virus del VIH-1. En comparación a otros metabolitos análogos a la BEA como las enniatinas la concentración requerida para inhibir la integrasa del VIH-1 es hasta 10 veces menor (Shin *et al.*, 2009). Debido a que los fármacos actuales para tratar

la infección de VIH-1 no van dirigidos a la integrasa de este virus, la BEA podría ser una prometedora alternativa para el desarrollo de nuevos tratamientos. Más recientemente se ha observado en estudios *in-silico* que posee efecto antiviral en contra del nuevo coronavirus SARS-CoV-2, uniéndose a proteínas esenciales para la replicación del virus (Al-Khoury *et al.*, 2022), lo que representa un área emergente de investigación.

### **2.6.5 Actividad citotóxica de la beauvericina en ensayos *in vitro***

La actividad citotóxica de la BEA ha sido demostrada en diferentes líneas celulares de cáncer las cuales son una importante herramienta en la investigación científica de diferentes procesos biológicos como investigaciones metabólicas, pruebas de citotoxicidad, pruebas antidopaje, generación de tejidos, síntesis de productos biológicos e investigación genética (Pruteanu *et al.*, 2022). Estas células provienen de tumores y una de sus principales aplicaciones es la investigación del tipo de cáncer del que fueron aisladas, ya que poseen todas las alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en el tumor, esta propiedad hace posible que extrapolar las respuestas a terapias o fármacos obtenidas con las líneas celulares a modelos *in-vivo* de cáncer (Salvadores *et al.*, 2020; Wroblewska-Luczka *et al.*, 2021). Las líneas celulares de cáncer actualmente utilizadas en la investigación están bien estudiadas a nivel genético y se conoce la o las alteraciones que las hacen ser cancerígenas (Salvadores *et al.*, 2020).

La actividad citotóxica de la BEA en ensayos *in vitro* ha sido demostrada en gran variedad de líneas celulares de cáncer como: leucemia linfoblástica humana CCRF-CEM, cáncer de mama BC-1, carcinoma epidermoide KB y KBv200, cáncer de pulmón de células no pequeñas A549, cáncer de mama metastásico MDA-MB-231, cáncer de próstata metastásico PC-3M, cáncer de colon humano HCT-8 y HCT116, melanoma humano MDA-MB43, hepatoma humano HepG2, cáncer cerebral SF295, hepatoma de rata H4IIE, entre otras. Otra línea celular cancerígena donde la BEA podría tener un potencial efecto antitumoral es la H-1975 ya que se trata de una línea celular de cáncer de pulmón aislada en 1988 de los pulmones de una mujer no fumadora con cáncer de pulmón de células no pequeñas, posee mutaciones en

los genes CDKN2A, TP53 y pik3ka que codifican para proteínas supresoras de tumores. El gen EGFR es un receptor que actúa como factor de crecimiento epidermoide, debido a estas características y bien conocidas mutaciones en su genoma comúnmente encontradas en este tipo de cáncer, esta línea celular se usa para inmunooncología e investigación de cáncer de pulmón, como modelo para probar el efecto de diferentes tipos de compuestos con actividad antitumoral (ATCC, 2022; Zhou *et al.*, 2021).

Al igual que la línea celular H-1975, la H-1275 es una línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas con morfología epitelial, aislada de un hombre no fumador de 43 años, posee una delección (p53) en el gen TP53, el cual codifica para una proteína supresora de tumores que regula la apoptosis y la senescencia de células con daño en su ADN, siendo una delección común en este tipo de cáncer, de hecho está presente en otras cinco líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas ampliamente en la investigación e inmunooncología, sirviendo como modelos *in-vitro* para probar la efectividad de diferentes compuestos con actividad antitumoral (ATCC, 2022; Wang & Zuo, 2021). Sin embargo, no se ha elucidado un mecanismo de acción de cómo la BEA lleva a cabo la apoptosis celular, aunque se han propuesto varios, ninguno de estos es específico para una línea celular en particular.

Los mecanismo de acción no han sido del todo descritos pero se han propuesto algunos como: la activación de diferentes MAP quinasas, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, regulación de las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, activación de caspasas, liberación del citocromo C y aumento intracelular de calcio, aunque ninguno de estos se ha visto relacionado únicamente con un tipo de línea celular (Do Nascimento *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2016; Vásquez-Bonilla *et al.*, 2017; Wätjen *et al.*, 2014).

### **2.6.6 Actividad antitumoral de la beauvericina en ensayos *in vivo***

La beauvericina ha demostrado actividad antitumoral en modelos murinos. Sin embargo, sólo se han reportado dos ensayos *in vivo* de la actividad antitumoral de la beauvericina. En los dos ensayos *in vivo* se observa una disminución significativa

del tamaño y peso de los tumores en comparación a los grupos control. En el primero de estos estudios, el ensayo *in vivo* se realizó con ratones desnudos de cinco semanas de edad y se les administró células de retinoblastoma Y79 ( $2 \times 10^6$  células). El tratamiento con BEA se llevó a cabo administrando  $3 \mu\text{M}$  de beauvericina semanalmente en zonas cercanas al tumor durante ocho semanas. Los resultados indicaron que el peso y el tamaño del tumor disminuyó significativamente, respecto al grupo control (Cheng *et al.*, 2009).

El segundo y más reciente ensayo *in vivo* donde se demuestra la actividad antitumoral de la BEA fue llevado a cabo en ratones BALB/c y CB-17/SCID de 6 a 8 semanas de edad, a los cuales se les administró células de carcinoma de colon de un modelo murino CT26 ( $4 \times 10^5$  células) y además células humanas de carcinoma cervical KB3-1 ( $1 \times 10^6$  células), respectivamente. El tratamiento con BEA para ambos tipos de cáncer consistió en 5 mg de beauvericina por kilogramo de peso del ratón diariamente durante 11 (excepto en los días 6 y 7). Los resultados evidenciaron que en ambos casos el peso y tamaño del tumor disminuyó de manera significativa, respecto al grupo control al que solo se le administró el vehículo, además también se observaron áreas necróticas y fragmentación del ADN dentro de los tumores, sin afectar tejidos de órganos donde no había presencia de células cancerígenas (Heilos *et al.*, 2017).

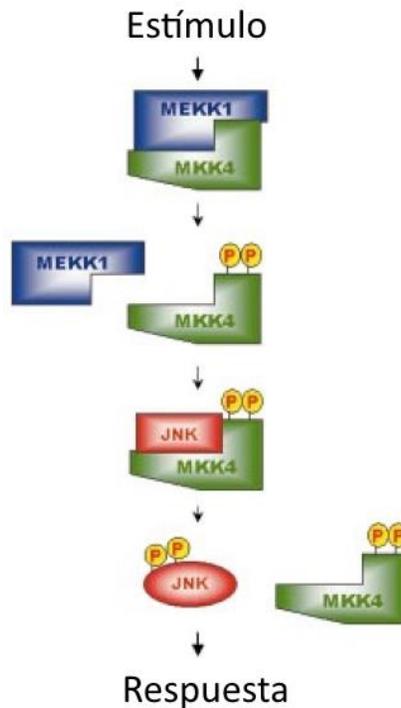
### **2.6.7 Mecanismo de acción de la beauvericina sobre células cancerígenas**

Varios mecanismos de acción han sido propuestos para la actividad antitumoral de la BEA tanto en ensayos *in vitro* como en *in vivo*, pero la mayoría de estos requieren ser dilucidados por completo, además existen varios mecanismos propuestos para cada línea celular de cáncer (Rios *et al.*, 2015; Heilos *et al.*, 2017). Entre los mecanismos propuestos destacan la capacidad de modificar las concentraciones iónicas intracelulares, inducción de apoptosis mediante la vía mitocondrial, modificación de las funciones celulares, activación de MAP quinasas y la activación de caspasas (Rios *et al.*, 2015; Vásquez-Bonilla *et al.*, 2017).

### **2.6.7.1 MAP quinasas**

Las MAP quinasas (MAPK por sus siglas en inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*), son proteínas quinasas de serina o treonina que fosforilan sustratos que modifican la expresión génica afectando así la mitosis, programación de muerte celular, motilidad, proliferación y metabolismo celular (Chang & Karin, 2001). La vía de las MAPK es el resultante de la activación de receptores de tirosina en la superficie de la célula, dicha activación comienza por estímulos mitogénicos como citoquinas y factores de crecimiento, que desencadenan su propia activación (figura 4). Esta vía se encuentra activa en al menos 30% de las líneas celulares de cáncer, producto de mutaciones en Ras, Braf y RTKs; las mutaciones de cada de ellas se encuentra relacionada al menos con un tipo de carcinoma (Baraja 2009; Prior *et al.*, 2012; Luke *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016).

En diferentes estudios se ha observado que la BEA es capaz de inhibir de forma selectiva la fosforilación de varias proteínas quinasas relacionadas con metástasis, angiogénesis y supervivencia de células cancerígenas (Vásquez-Bonilla *et al.*, 2017; Wätjen *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Secuencia de la interacción en una cascada de MAPK para generar una respuesta. Donde MEKK1 interactúa con MKK4 inactiva para formar un complejo MEKK1-MKK4. MEKK1 fosforila y activa a MKK4 originando una disociación del complejo. MKK4 libre y activa lleva a cabo interacciones específicas con JNK. Una vez que JNK es activada, el complejo MKK4-JNK se disocia y JNK activada va cuesta abajo adentrándose al núcleo para llevar a cabo la modificación de la expresión génica y con ello el efecto (Modificada de Chang & Karin, 2001).

### 2.6.7.2 Capacidad ionófora de la beauvericina

La beauvericina presenta una estructura similar a algunos antibióticos con propiedades ionóforas. Un ionóforo es aquel capaz de introducir o expulsar iones de manera específica o inespecífica a través de la membrana celular, mediante canales o transportadores. El transporte de iones altera el contenido normal de iones de la célula y produce un efecto tóxico en ella, lo que induce a la muerte celular (Benz, 1978; Kouri *et al.*, 2005).

Se ha observado que la BEA tiene la capacidad de modificar el balance iónico de la célula, inhibiendo el metabolismo celular mediante ya que despolariza la membrana mitocondrial (Kouri *et al.*, 2005). Este mecanismo es parecido al de algunos agentes desacoplantes mitocondriales (FCCP, por sus siglas en inglés) como carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona y la valinomicina los cuales incrementan el consumo de oxígeno ya que interrumpen la cadena transportadora

de electrones produciendo hipoxia (Prince *et al.*, 1974; Vásquez-Bonilla *et al.*, 2017).

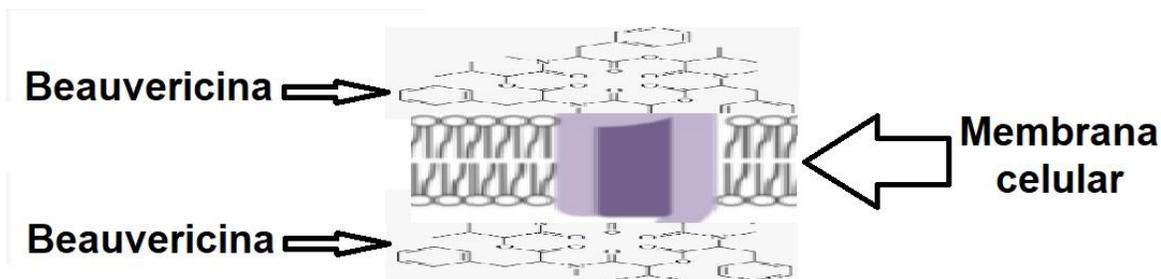
### **2.6.7.3 Proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas: Familia Bcl-2**

Las proteínas de la familia Bcl-2 son aquellas que se encargan de la regulación de la permeabilidad mitocondrial por lo que juegan roles importantes en la apoptosis celular e interaccionan con receptores de muerte celular mitocondriales que liberan el citocromo C (Adams & Cory, 1998). Las proteínas Bcl-2 son familias homólogas, la primera está conformada por Bad, Bak y Bax las cuales son proapoptóticas, es decir, inducen la apoptosis, y la familia conformada por Bcl-2 Y Bcl-XL las cuales son antiapoptóticas e inhiben la apoptosis (McDonnell *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2005).

Algunos mecanismos de acción sobre la actividad citotóxica que presenta la beauvericina están relacionados con estas proteínas. Se ha reportado una disminución en expresión la regulación de la familia Bcl-2, sin que afecte la expresión de las proteínas proapoptóticas como Bad y Bak (Lin *et al.*, 2005; Vásquez-Bonilla *et al.*, 2017).

### **2.6.7.4 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial**

Se ha observado que a BEA induce la formación de canales selectivos de cationes (Kouri *et al.*, 2003; Kouri *et al.*, 2005). Las características ionóforas de la BEA hacen que sea capaz de formar poros selectivos en la membrana celular, se ha propuesto un modelo que explique la formación de estos poros el cual sugiere la formación de un complejo tipo “*Sandwich*”, es decir, dos moléculas de beauvericina alineadas de forma vertical, capaces de entrar a la bicapa lipídica de la membrana celular y que permiten el acceso o escape de iones a la célula (figura 5), originando un gradiente electroquímico (Ivanov *et al.*, 1973; Kouri *et al.*, 2003; Kouri *et al.*, 2005;). La formación de estos complejos afecta el potencial de membrana mitocondrial especialmente el aumento de  $Ca^{2+}$  lo que desencadena la liberación de citocromo C y la activación de caspasas, que lleva a la muerte celular (Lin *et al.*, 2005; Kouri *et al.*, 2005; Wang & Xu, 2012; Vásquez-Bonilla *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Complejo de beauvericina tipo sándwich formando un poro en la membrana celular

## 2.7 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido es un medio de cultivo caracterizado por su bajo costo energético asociado a una alta productividad de compuestos bioactivos. Los microorganismos, como hongos y bacterias, crecen sobre materiales sólidos inertes que poseen niveles de humedad desde un 30 a un 80% (Ruiz-Leza *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2013). Este sistema puede utilizar como sustratos gran cantidad de desechos agroindustriales lo que los hace ser de bajo costo comparado a otros medios de cultivo que utilizan otros tipos de sustratos (An *et al.*, 2021).

En los últimos años el cultivo en estado sólido ha sido una atractiva alternativa frente a la fermentación líquida o sumergida, ya que la fermentación en estado sólido provee al microorganismo de tres fases para su desarrollo; una fase líquida, una sólida y una gaseosa que genera un ambiente similar al natural donde se puede encontrar el microorganismo, esta similitud influye positivamente en la producción de compuestos bioactivos como metabolitos secundarios (Hölker *et al.*, 2003; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017; Singhania *et al.*, 2009).

### 2.7.1 Producción de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en inglés) es un proceso atractivo de producción de compuestos bioactivos; por ejemplo, Barrios-González *et al.*, (2005) y Singhania *et al.*, (2009) muestran la capacidad del SSF de producir gran cantidad de metabolitos secundarios y enzimas producidos por diferentes microorganismos, como es el caso de Cuadra *et al.*, (2008) que producen cefalosporina C, Campos *et al.*, (2012) que producen penicilina, Baños *et al.*, (2009)

que producen lovastatina, entre otros como: ácidos orgánicos, pigmentos, aminoácidos, alcaloides, surfactantes, antibióticos, antimicóticos, factores de crecimiento, biopesticidas y compuestos fenólicos (Bibián *et al.*, 2020; Campos *et al.*, 2008; López-Calleja *et al.*, 2012; Sath *et al.*, 2018; Yazid *et al.*, 2017; Yilmazer *et al.*, 2021).

En gran mayoría de casos la producción de metabolitos secundarios está asociada a la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo y su regulación presenta interesantes mecanismos específicos y globales, donde factores ambientales son clave (Barrios-González, 2018; Bibián *et al.*, 2020), por ello en muchos casos solo son producidos cuando el microorganismo se encuentra creciendo en su hospedero o hábitat natural, por lo que la SSF representa un área de oportunidades para la producción de metabolitos secundarios. También se ha observado que los microorganismos que crecen en SSF, expresan genes que se ha observado solo expresan cuando se encuentran en su ambiente natural o en modelos de infección *in vivo*. Además, el escalamiento de la SSF es más sencillo que otros tipos de cultivo (Balakrishnan *et al.*, 2021; Mayorga-Reyes *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015).

### **2.7.2 Ventajas de la fermentación en estado sólido**

La fermentación en estado sólido posee varias ventajas frente a los procesos convencionales como lo son los cultivos en fase líquida, fermentación sumergida (SmF, por sus siglas en inglés), que son a menudo utilizados para la producción de compuestos de interés industrial, además es una alternativa adecuada para la productividad elevada de compuestos bioactivos y de biomasa de mayor calidad, lo que representa una serie de ventajas frente a la SmF, ya que esta última presenta un considerable gasto de agua y energético, al momento de mantener en funcionamiento los biorreactores y extraer los compuestos bioactivos (Cui *et al.*, 2021; Farinas, 2015; Tabaraie *et al.*, 2012).

La SSF a diferencia de la SmF, que utiliza sustratos comerciales de valor elevado, la SSF utiliza residuos agroindustriales que se pueden adquirir fácilmente, además supera considerablemente a la fermentación sumergida o líquida en cuanto a la

cantidad de biocompuestos producidos (Qi *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017).

Por otra parte, la SSF debido a sus características no necesita de cantidades elevadas de agua y brinda al hongo un hábitat similar al natural, lo que promueve la producción de metabolitos y compuestos bioactivos que en el cultivo líquido se producen con un bajo rendimiento o no se producen. Esta diferencia marcada en la producción de compuestos bioactivos se ha atribuido a la presencia de las fases gaseosa, líquida, sólida con las que el microorganismo entra en contacto durante la SSF, mientras que, en cuanto a los nutrientes, la disponibilidad de estos es diferente entre la fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida o líquida (Cui *et al.*, 2021; Yanfang *et al.*, 2021). La SSF se puede realizar en biorreactores pequeños y cerrados, lo que facilita el escalamiento a nivel industrial, aunque una buena producción de metabolitos en SmF, la SSF la supera en costo y beneficio (Campos *et al.*, 2021; Jain *et al.*, 2013; Behera & Ray, 2016).

Un ejemplo de sustrato usado en SSF es el caparazón de camarón el cual se trata del exoesqueleto de la especie *Penaeus aztecus* y al igual que el exoesqueleto de los artrópodos terrestres posee en su estructura principalmente cadenas de quitina, y otros sustituyentes como carbonato cálcico y proteínas tales como: resilina, esclerotina y artropodina que en conjunto son denominadas escleroproteínas y otorgan rigidez al exoesqueleto. Teniendo como únicas diferencias pequeñas variaciones en su estructura y en la cantidad de resilina, presencia de pigmentos y cantidad de carbonato cálcico, este último se encuentra en más cantidad en los crustáceos que en los insectos (Heredia *et al.*, 2007; Michels *et al.*, 2016; Phuong *et al.*, 2021), debido a esta similitud con los insectos es utilizado en cultivos de HE.

## **2.8 Estrés oxidante**

El oxígeno en el crecimiento de microorganismo aeróbicos es un nutriente esencial, sin embargo, también puede ser citotóxico en concentraciones mayores dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Las ROS se generan en el metabolismo normal de los microorganismos, de hecho, el 90% son producidas en la mitocondria resultado de la respiración celular (producción

endógena) (Arellano-Plaza *et al.*, 2017). El aumento de las ROS puede ocasionarse por diferentes tipos de estrés como temperatura y aumento de oxígeno en el ambiente, lo que desencadena en el microorganismo un aumento en la producción de metabolitos secundarios y enzimas con propiedades antioxidantes, como los compuestos polifenólicos y las enzimas superóxido dismutasa y catalasa. Debido a lo anterior el aumento de ROS mediante el aumento de temperatura o de oxígeno en los cultivos de diferentes microorganismos ha sido utilizado para el aumento en la producción de compuestos bioactivos de interés industrial y para aumentar la calidad y resistencia de los microorganismos (García-Ortiz *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2020).

Por otro lado, se ha observado que en la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) al inicio de la idiofase (fase de producción) aumenta significativamente la concentración de ROS en el micelio y que permanece durante toda la fase de producción (Miranda *et al.*, 2013), posteriormente se reportó que las ROS regulan genes de biosíntesis de lovastatina en *A. terreus* (Miranda *et al.*, 2014), también se reportó que las ROS se acumulan y son capaces de regular positivamente los genes responsables de la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, y de cefalosporina en *Acremonium chrysogenum* (Bibíán *et al.*, 2020; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017). Al parecer es un nuevo mecanismo que regula el metabolismo secundario en hongos (Bibíán *et al.*, 2020; Barrios-González *et al.*, 2020.)

También se encontró que la respiración alternativa en la mitocondria se enciende durante la idiofase y con ello modula y mantiene estables los niveles de ROS durante la producción de metabolitos secundarios (Pérez-Sánchez *et al.*, 2017). Finalmente es importante mencionar que se ha observado que en SSF la concentración de ROS en la idiofase es hasta 10 veces mayor que en SmF (Barrios-González, 2018).

## **2.9 Actividad de agua**

La actividad de agua ( $a_w$ ) se trata de la humedad en equilibrio de un producto, alimento o cultivo, está determinada por la presión parcial del vapor de agua en su

superficie y puede variar con la humedad ambiental o el calor, también puede definirse como la cantidad de agua libre que se encuentra disponible para el crecimiento microbiano (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2007; Carboue *et al.*, 2020). En las últimas décadas se ha observado que una disminución en la  $a_w$  en los cultivos microbianos aumenta de producción de compuestos bioactivos como enzimas y metabolitos secundarios, debido al estrés osmótico y a la generación de ROS que activan ciertas vías de señalización que aumentan la síntesis de compuestos, que regulan la osmolaridad y enzimas que contrarrestan las ROS, por lo que diferentes estudios han optado por disminuir la  $a_w$  en cultivos microbianos como una estrategia para aumentar la producción de compuestos bioactivos de alto valor agregado (Carboue *et al.*, 2020; Martiniere *et al.*, 2019; Montiel-Gonzales *et al.*, 2004; Ruijter *et al.*, 2004).

## **2.10 Ensayos de viabilidad celular**

### **2.10.1 Ensayo de MTT**

Este bioensayo se basa en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este compuesto es una sal de tetrazolio soluble en agua y de color amarillo, pero al ser reducido por parte de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables forma un formazano, el cual es insoluble en agua y de color morado intenso. En este bioensayo el formazano formado es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y leído a 570 nm, la intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de células viables, por lo que esta prueba es ampliamente utilizada para la determinación de la viabilidad celular después de que estas han sido expuestas a compuestos antitumorales, determinando así su citotoxicidad (Ghasemi *et al.*, 2021; Stockert *et al.*, 2018).

## **3. JUSTIFICACIÓN**

La BEA presenta diversas actividades biológicas de interés farmacéutico y posee un costo muy elevado (aproximadamente mil pesos cada miligramo). Lo anterior se explica por sus bajos rendimientos bajos y tiempos prolongados de producción en los cultivos líquidos explorados hasta ahora.

Debido a lo anterior, resulta de suma importancia la implementación de técnicas biotecnológicas que permitan aumentar su producción en el menor tiempo posible. Por estas razones es importante determinar la factibilidad de la SSF y otras estrategias como la concentración del medio de cultivo, aplicación de pulsos oxidantes, disminución de actividad de agua y cultivos mixtos en la producción de BEA. Todas son técnicas que aumentan la producción de metabolitos de interés industrial y farmacéutico.

La BEA muestra un espectro antibacteriano en diferentes especies de bacterias patógenas, sin embargo, hasta ahora no se ha realizado un estudio que determine un efecto sinérgico en combinación con otros antibióticos, como se ha observado al administrarse con algunos antimicóticos. Esto representa un área de oportunidad en la investigación de nuevas moléculas con actividad antibiótica, así como en el desarrollo de adyuvantes que potencialicen el efecto terapéutico de los antibióticos actuales, con la finalidad de combatir la resistencia bacteriana, así como prevenir y disminuir los efectos adversos de los antibióticos.

Por lo tanto, la relevancia de este estudio radica en la producción de BEA en un cultivo en estado sólido basado en medios líquidos embebidos en soportes sólidos, y en el efecto que la BEA pueda tener al ser utilizada en conjunto con otros antibióticos en contra de diferentes bacterias patógenas.

#### **4. HIPOTESIS**

1. La producción de beauvericina aumentará si el medio líquido se embebe en un soporte inerte (PUF o bagazo de caña), y se aplican diferentes técnicas biotecnológicas como la aplicación de pulsos oxidantes, la disminución de la actividad de agua y la realización de cultivos mixtos.
2. La BEA potencializa el efecto antibacteriano de diferentes antibióticos mostrando un efecto sinérgico contra diferentes especies bacterianas y posee un efecto sinérgico en combinación con antitumorales en diferentes líneas celulares de cáncer.

## **5. OBJETIVOS**

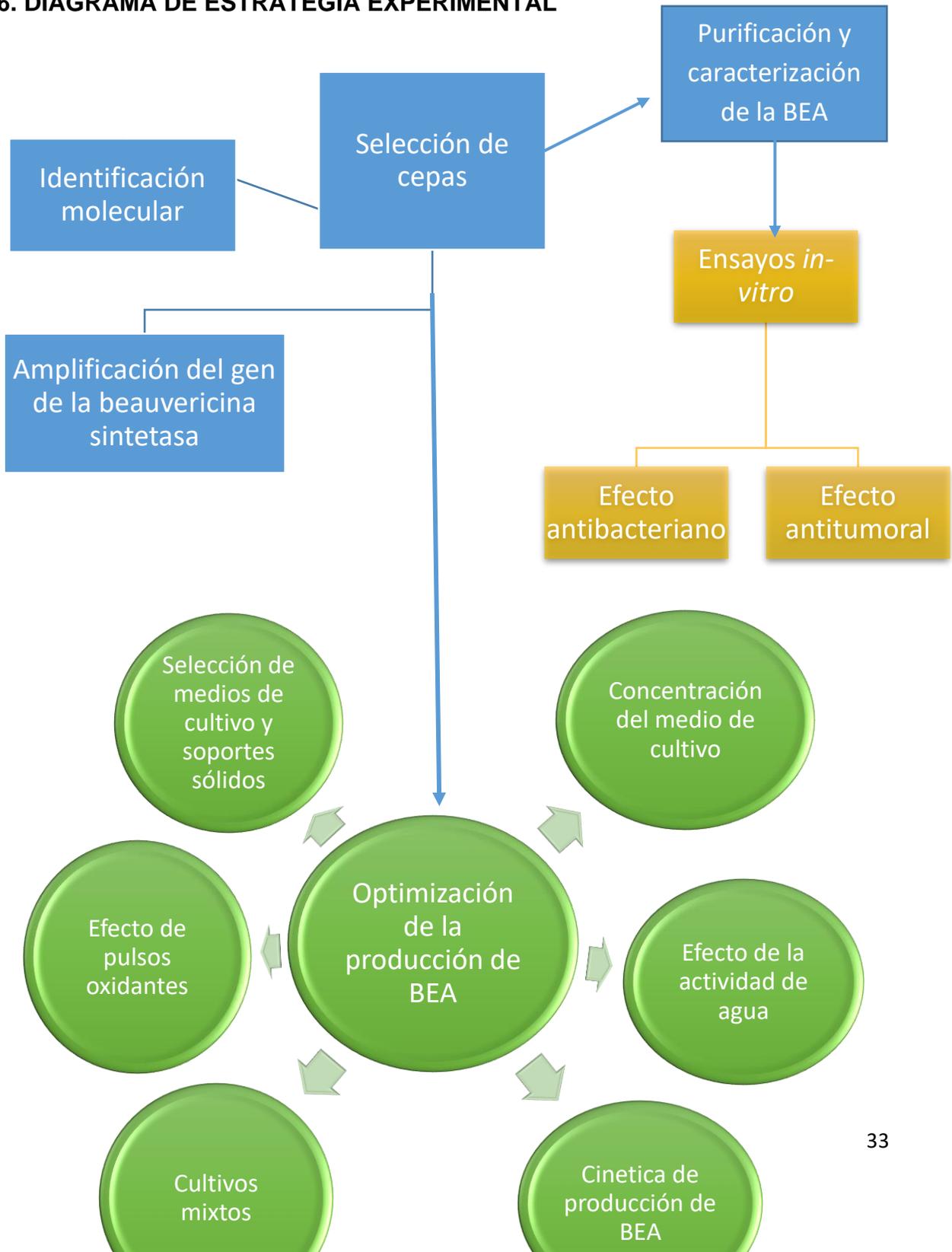
### **5.1 Objetivo general**

Mejorar la producción de beauvericina en un medio de cultivo en estado sólido, así como determinar su efecto antibacteriano en combinación con diferentes antibióticos y su efecto antitumoral en combinación con fármacos antitumorales.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Comparar la producción de beauvericina en diferentes cepas de *Beauveria bassiana*, *Fusarium* y *Cordyceps* en medios de cultivo líquidos y en estado sólido.
2. Seleccionar un soporte y sistema de cultivo para la producción de BEA
3. Corroborar la producción de BEA a partir de los extractos del cultivo en estado sólido
4. Determinar el efecto de las variaciones de condiciones impuestas en el cultivo sobre la producción de BEA
5. Determinar el efecto que posee la BEA al ser combinada con antitumorales en contra de diferentes líneas celulares de cáncer
6. Determinar el efecto que posee la BEA al ser combinada con diferentes antibióticos en contra de diferentes bacterias patógenas

## 6. DIAGRAMA DE ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **7.MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Microorganismo**

Los cultivos monoespóricos de dos cepas de *B. bassiana* (882.5 y Tac 1.1 originarias del cepario de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa y de la zona agrícola de Tláhuac respectivamente), una cepa de *Cordyceps javanica*, una cepa de *Cordyceps fumosorosea* (CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302 respectivamente) originarias del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico y de la colección del servicio de Investigación Agrícola de los Estados Unidos (Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi: ARSEF), una previamente aislada de una tortilla e identificada morfológicamente como del género *Epicoccum*, por lo que fue llamada cepa TORT y dos del género *Fusarium* una de ellas la cepa Schltl de *F. oxysporum* y otra la cepa AB2 identificada solo morfológicamente como perteneciente al género *Fusarium*, ambas originarias del cepario de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, fueron activadas en agar dextrosa-papa (Difco®), recolectadas utilizando una barra de agitación magnética y 50 mL de tween 80 al 0.05%, posteriormente en una solución al 15% de glicerol, y finalmente conservadas a -70°C con el fin de garantizar su viabilidad.

La producción de conidios se utilizaron 50 gramos de arroz precocido y esterilizado en autoclave en un matraz Erlenmeyer, inoculando  $2 \times 10^6$  conidios por cada gramo de arroz, después se incubó durante 9 días a 25°C moviendo cada tercer día para evitar aglomeración de los granos de arroz, finalizado este tiempo los conidios se cosecharon agregando 100 mL de tween 80 al 0.05% al matraz, agitando con un vórtex, los conidios se recolectaron en tubos Falcon estériles para su posterior uso.

### **7.2 Identificación molecular**

#### **7.2.1 Extracción de ADN**

Se puso a crecer un cultivo monoespóric del hongo a identificar en cajas Petri, con agar dextrosa papa a 25°C durante 15 días, al terminar el tiempo de crecimiento el micelio de las cajas fue tomado para la extracción de ADN, la cual se llevó a cabo en un área aséptica utilizando materiales previamente esterilizados con el fin de

eliminar DNAsas. El micelio se colocó en un mortero de porcelana con ayuda de una espátula de metal y a éste se agregó nitrógeno líquido para congelar el micelio y poder lisar las células con ayuda de un pistilo, inmediatamente después de consumirse el nitrógeno fueron transferidos aproximadamente 100 mg del pulverizado a un microtubo de 1.5 mL, este se cerró después de que todas las trazas de nitrógeno se consumieran y se puso en un recipiente de unicel con nitrógeno líquido. Posteriormente, se utilizó el kit comercial DNeasy Plant mini Kit (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones de manufactura, finalmente el ADN se conservó en refrigeración entre 4 y 8°C.

La cuantificación del ADN y su análisis de calidad fueron llevados a cabo en un Nanodrop (Thermo scientific®), mientras que la integridad del ADN fue analizada con una electroforesis de gel de agarosa al 1% teñido con 1 µL de RledGel® y corrida a 85 volts durante 25 minutos en una cámara de electroforesis (BIO-RAD®).

### **7.2.2 Amplificación de las regiones ribosomales ITS, gen de actina y gen del factor de elongación $\alpha$**

Para la identificación molecular de aquellas cepas a utilizar y que no estuvieran identificadas molecularmente se amplificaron las regiones ITS1 e ITS2, así como el gen ribosomal 5.8 utilizando los oligonucleótidos universales TS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') y ITS5 (5' -GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G- 3') (Stielow *et al.*, 2015), el gen de actina utilizando los oligonucleótidos ACTF (5' - GAA TGG AAT TAA TAA TTA GAA GAA TCC - 3') y ACTR (5' - TGT TTC AGA TCC CTT TAG TTC CAG - 3') (Carbone & Kohn, 1999) y el factor de elongación alfa utilizando los oligonucleótidos EF1-728F (5' - CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG - 3') y EF1-986R (5' - TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC - 3') (Rehner & Buckley, 2005). Esto se hizo mediante la técnica de PCR realizando cuatro reacciones con un volumen de reacción de 50 µL, cada una contenía 20 ng del ADN molde, 20 µmol de cada oligonucleótido, 2 mM de una mezcla de dNTP's, 5 µL de buffer de *Taq* a una concentración de 10X con 20 mM de MgCl<sub>2</sub> incluido (Thermo scientific®), una unidad de *Taq* polimerasa (Thermo scientific®) y con lo que basta para 50 µL de agua libre de nucleasas.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MAXIGENE II (AXIGEN®) utilizando las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C seguida de 31 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 57°C para regiones ITS, 56.7°C para actina y 57.4°C para factor de elongación alfa, y 45 segundos de elongación a 72°C, finalmente un ciclo de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron corridos y visualizados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con 1 µL de RedGel® y corrido a 85 volts durante 30 min en una cámara de electroforesis (BIO-RAD®), fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz UV (ULTRA VIOLET PRODUCTS®).

### **7.2.3 Amplificación del gen de la beauvericina sintetasa**

Como uno de los métodos de selección de cepas productoras de BEA se consideró la amplificación del gen de la beauvericina sintetasa, para ello fueron diseñados oligonucleótidos a partir de las secuencias conservadas de alineamientos de secuencias de ADN y ARNm del gen de la beauvericina sintetasa de diferentes especies de hongos productores de BEA. Se incluyeron otros genes estrechamente relacionados de diferentes especies de hongos productores de beauvericina, esto para encontrar las secuencias conservadas en todas las secuencias.

Las secuencias utilizadas fueron: ADN del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Beauveria bassiana* aislado Bb0062 (código de acceso GenBank: JQ617289.1), ARNm del gen beauvericina sintetasa de la especie *Fusarium venenatum* (código de acceso GenBank: JX975482.1), ADN del gen de una ciclopéptido sintetasa de la especie *Fusarium oxysporum* (código de acceso del GenBank: GU294760.1), ADN del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Beauveria bassiana* clon BbBVRC (código de acceso GenBank: HQ141932.1), ARNm del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Beauveria bassiana* aislado ARSEF 2860, ARNm de una péptido sintetasa no ribosomal de la especie *Fusarium fujikuroi* (código de acceso del GenBank: XM\_0253568817.1), (código de acceso del GenBank: XM\_00864824.1), ADN del gen de una ciclopéptido sintetasa de la especie *Fusarium oxysporum* (código de acceso del GenBank: GU294760.1)

y ARNm del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Cordyceps fumosorosea* (código de acceso del GenBank: XM\_018843786.1).

Las secuencias se obtuvieron del portal del GenBank en formato FASTA, se cargaron al programa MEGA 11 y se realizaron dos alineamientos múltiples seleccionando la opción Multiple sequence Alignment. Para el primer alineamiento se consideraron todas las secuencias, y en el segundo solamente secuencias de los géneros *Cordyceps* y *Fusarium*, finalmente se localizaron las regiones conservadas en todas las secuencias cargadas y se diseñaron los oligonucleótidos, considerando la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y su tamaño, así como el tamaño del fragmento a amplificar.

Para la amplificación parcial del gen de la beauvericina sintetasa en las diferentes especies de hongos fueron diseñados dos pares de oligonucleótidos. El primer par fue Beau\_synFW (Forward) 5'-ATT-GGA-TGA-TGG-CTA-CAC-CG-3' y Beau\_syn2 (Reverse) 5'-CTT-TCC-GGT-GGC-AGT-GCG-3' (IDT®), diseñados para amplificar un fragmento del gen de la beauvericina sintetasa de 777 pb en cepas de los géneros *Beauveria*, *Cordyceps* y *Fusarium*. El segundo par fue FoBEAif (Forward) 5'-AAR-GGY-ATC-ATG-ATY-GAR-CAY-C-3' y ReBEAif (Reverse) 5'-CKR-ATY-TTG-ACC-TGC-GAR-TC-3' (IDT®), diseñados para amplificar un fragmento del gen de la beauvericina sintetasa de 736 pb en cepas de los géneros *Cordyceps* y *Fusarium*.

La amplificación del gen de la beauvericina sintetasa se realizó mediante la técnica de PCR, en una reacción de 50 µL que contenía 20 ng del ADN molde, 20 µmol de cada oligonucleótido, 2 mM de una mezcla de dNTP's, 5 µL de buffer de *Taq* a una concentración de 10X con 20 mM de MgCl<sub>2</sub> incluido (Thermo scientific®), una unidad de *Taq* polimerasa (Thermo scientific®) y con lo que basta para 50 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MAXIGENE II (AXIGEN®) con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C seguida de 31 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 60°C para el primer par de oligonucleótidos (Beau\_synFW y Beau\_syn2), y 54°C para el segundo par de

oligonucleótidos (FoBEAif y ReBEAif), 45 segundos de elongación a 72°C finalmente un ciclo de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con RedGel® y corrido a 100 volts durante 20 min en una cámara de electroforesis (BIO-RAD®), fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz UV (ULTRA VIOLET PRODUCTS).

#### **7.2.4 Purificación de los productos de PCR**

Para la purificación del producto de PCR, cuatro reacciones de PCR de 50 µL cada una fueron homogeneizadas y corridas en una electroforesis de gel de agarosa al 1.5% en un pozo de 2 cm de largo por 0.5 cm de ancho, se corrió a 60 volts durante 5 minutos y posteriormente a 80 volts durante 45 minutos. Al terminar la electroforesis la banda del gel de agarosa fue recortada con una navaja, recortada y purificada con el kit comercial kit QIAquick PCR Purification gel Kit®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **7.2.5 Secuenciación**

Los fragmentos amplificados y purificados fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular y en el Instituto de Biología de la UNAM, por el método de dideoxiterminación. Cada secuencia se comparó con la base de datos GenBank. Las secuencias se analizaron considerando los valores la descripción, cobertura e identidad de las secuencias del GenBank más homologas a las obtenidas. Finalmente, las secuencias correspondientes a la identificación molecular fueron subidas a la base del GenBank, siguiendo las instrucciones del sitio web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>.

### **7.3 Filogenia**

Con la finalidad de conocer la relación filogenética de las secuencias amplificadas de las cepas utilizadas, con las secuencias del gen de la beauvericina sintetasa, enniatina sintetasa, bassianoloide sintetasa y otras depsipéptido sintetisas de diferentes especies de hongos, se descargaron secuencias en formato FASTA de la base de datos del GenBank, pertenecientes a secuencias de péptido sintetisas

de diferentes especies de hongos. Estas se agruparon en un solo archivo FASTA junto con las secuencias previamente amplificadas y secuenciadas de las cepas utilizadas, posteriormente todas las secuencias se editaron eliminando los extremos no alineados de todas ellas, utilizando el programa MEGA 11. Finalmente, se realizó un árbol filogenético utilizando el método estadístico de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud, un modelo de sustitución de nucleótidos de Jukes-Cantor y evaluando la robustez de los nodos con 1000 repeticiones de *bootstrap*.

#### **7.4 Condiciones del cultivo sólido**

Los cultivos utilizados para la selección de cepas fueron dos, el primero (medio 1): 3 g·L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1 g·L<sup>-1</sup> de NaCl, 15 g·L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 g·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.028 g·L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.032 g·L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 6 g·L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa, 60 g·L<sup>-1</sup> de caparazón de camarón y un pH final de 6.6 (Barranco-Florido *et al.*, 2002); el segundo (medio 2) fue un medio de cultivo líquido donde se ha observado una producción elevada de BEA cuya composición es: 49 g·L<sup>-1</sup> de glucosa, 13 g·L<sup>-1</sup> de peptona, 0.6 g·L<sup>-1</sup> de NaCl, 0.6 g·L<sup>-1</sup> de KHPO<sub>4</sub>, 0.2 g·L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0.2 g·L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>, un pH final de 6.6 y un contenido de humedad inicial de 85% (Xu *et al.*, 2010), con un inóculo de 2x10<sup>6</sup> conidios por mL de medio, en ambos casos provenientes de un cultivo monoespórico. Se realizaron cultivos con 20 mL de medio cada uno, los cultivos en medio líquido se sometieron a una agitación de 150 rpm, para los cultivos en medio sólido se utilizó 1 gramo de PUF (densidad seca de 17 kg/m<sup>3</sup>) cortado en cubos de 0.7 cm, o 6 gramos de bagazo de caña como soportes sólidos y se dejaron crecer durante 9 días a 25°C. Todos los cultivos fueron realizados por triplicado.

##### **7.4.1 Cultivos mixtos**

Para los cultivos mixtos se hizo un cultivo en estado sólido siguiendo la metodología anterior, pero el inóculo del cultivo comprendía de dos hongos viables diferentes, un hongo viable y restos celulares de otro hongo. Los inóculos cultivos mixtos fueron 95% del hongo A + 5% del hongo B, 85% del hongo A + 15% del hongo B, 50% del hongo A + 50% del hongo B, 25% del hongo A + 75% del hongo B, 100% del hongo

A + 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares del hongo B, y finalmente 100% del hongo B + 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares del hongo A. Todos los cultivos fueron realizados por triplicado.

#### **7.4.2 Tratamiento del caparazón**

Se utilizó caparazón de *Litopenaeus vannamei* obtenido de diferentes basureros de marisquerías. La preparación del caparazón consistió primero en retirar antenas, extremidades y cabeza del crustáceo, así como restos de tejido del cuerpo. Se trató con una solución de 0.1M de NaOH durante 30 minutos con agitación, después se lavó dos veces con agua destilada, y enseguida con una solución 0.2M de HCl durante otros 30 minutos, y nuevamente se lavó con agua destilada. El caparazón se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se molió, utilizando una licuadora y se tamizó con una malla número 32.

#### **7.4.3 Obtención de restos celulares**

Los restos celulares utilizados para el cultivo mixto se obtuvieron a partir del crecimiento durante 10 días de los diferentes hongos en 10 cajas Petri, con agar dextrosa-papa, terminando el tiempo de crecimiento el micelio se retiró del agar cuidadosamente con ayuda de una espátula de metal, previamente esterilizada, y colocado en un vidrio de reloj para posteriormente secarlo en una estufa a 60°C durante 6 horas, pasado este tiempo se pulverizó con ayuda de un mortero y un pistilo. Finalmente, los restos celulares antes de ser utilizados fueron esterilizados.

#### **7.4.4 Pulsos oxidantes**

Para determinar el cambio en el perfil de producción de BEA que ocasiona el cambio en la concentración de oxígeno a un 26% en la atmósfera del cultivo, se cambió el tapón de algodón de los cultivos en estado sólido por un tapón de hule, posteriormente por medio de dos agujas se realizó el cambio de atmósfera del cultivo, en una primera aguja se llevó a cabo el ingreso de oxígeno durante 5 min. con un flujo de 13.8 cm<sup>3</sup>·s<sup>-1</sup> durante 5 min. , mientras que por la segunda aguja funciono como la salida durante el remplazo de la atmósfera (Garcia-Ortiz *et al.*, 2015). El cambio de atmósfera se realizó en los días 3, 4 y 5 de cultivo,

adicionalmente en otros cultivos se realizó el cambio de atmosfera diariamente durante los días 3, 4 y 5.

#### **7.4.5 Actividad de agua**

Para determinar el cambio en el perfil de producción de BEA que ocasiona la disminución de la  $a_w$  en los cultivos, se agregó 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 30% de etilenglicol (EG) al medio líquido antes de incorporar al soporte sólido (Montiel-González *et al.*, 2004), posteriormente la  $a_w$  fue medida utilizando un medidor de  $a_w$  (AQUALAB® 4TEV) usando como blanco agua destilada. Posteriormente la determinación de la producción de BEA, biomasa y los cultivos fueron realizados de manera habitual.

### **7.5 Purificación de la beauvericina**

#### **7.5.1 Extracción de los metabolitos secundarios**

En un primer paso al termino de cultivo, la biomasa de los cultivos se lavó, en el caso de los cultivos en estado sólido fue lavado utilizando 150 mL de agua destilada; en el caso de los cultivos líquidos se filtró la biomasa en ambos casos usando un embudo Buchner, un matraz Kitasato y papel filtro Whatman® #1, el agua destilada con la que se realizó el lavado de los medios en estado sólido, así como el filtrado de los medios líquidos, fue conservada en congelación (0 - -8°C) para la posterior medición de azúcares reductores. El soporte sólido con la biomasa de los cultivos en estado sólido, así como la biomasa filtrada de los cultivos líquidos se secaron en una estufa a 60°C durante seis horas, para posteriormente medir la cantidad de biomasa producida pesando directamente la biomasa filtrada de los cultivos líquidos, o por diferencia de peso del soporte sólido en el caso de los cultivos en estado sólido.

Para la obtención de los metabolitos secundarios toda la biomasa obtenida de los cultivos líquidos, o una cuarta parte del soporte sólido con la biomasa de los cultivos en estado sólido, fue colocada en tubos de ensayo de 50 mL con 20 mL de metanol al 84% en agua (v/v) (Juan *et al.*, 2020; Urbaniak *et al.*, 2019), sometidos a tres baños ultrasónicos (500 W) (BRANSONIC® CPX2800H Danbury, USA) de 30 min cada uno con 1 min de agitación entre cada uno de ellos (Jiang *et al.*, 2013; Juan *et*

*al.*, 2020), finalmente el metanol se filtró y se eliminaron todos los restos del soporte sólido y micelio.

### **7.5.2 Prepurificación de los metabolitos secundarios**

Se realizó una prepurificación utilizando un cartucho C18 (Sep-Pak C18 1g Cartridge®), para ello el cartucho fue activado haciéndole pasar 3 mL de metanol grado HPLC al 100% y posteriormente 3mL de buffer PBS (phosphate buffered saline) 0.01M (1X, pH = 7.4). Una vez activado se le hicieron pasar los 20 mL de metanol con los metabolitos secundarios extraídos, previamente mezclados con 40 mL de buffer PBS 0.01M (1X, pH = 7.4) (razón 2:1), después se realizó un lavado con 10 mL de agua desionizada, finalmente los metabolitos fueron elucidados con 6 mL de metanol grado HPLC al 100%, antes de inyectar al cromatógrafo se filtró con un filtro Acrodisk® de 0.22 µm (modificado de Logrieco *et al.*, 2002; Rachmawati *et al.*, 2018).

### **7.5.3 Análisis cromatográfico**

Los extractos prepurificados de los diferentes cultivos fueron analizados por HPLC en un cromatógrafo 1260 infinity Agilent Technologies® de bomba cuaternaria y un detector UV-VIS 1200 infinity Agilent Technologies®. Se inyectó un volumen de 50 µL, utilizando una columna en fase reversa C18 (Agilent® C18 150 by 4.6 mm, 1.8 µm, 40°C) y una fase móvil isocrática de MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20), con un flujo de 1.5 mL·min<sup>-1</sup> (modificado de Jiang *et al.*, 2013; Meca *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2022). Antes de realizar las corridas cromatográficas se purgaron las mangueras de los contenedores de los constituyentes de la fase móvil y se realizó una curva de calibración, utilizando concentraciones de 2.5, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 µg·mL<sup>-1</sup> del estándar de BEA (Sigma®).

### **7.5.4 Análisis por espectroscopia de masas ESI-TOF**

Una muestra de cada tipo de cultivo analizado por HPLC fue separada en fracciones de 1.5 mL cada una, es decir una fracción por cada minuto de la corrida cromatográfica, posteriormente estas fracciones se analizaron de manera individual

por HPLC siguiendo las mismas condiciones cromatográficas. Aquella fracción que presentó el pico al que se le atribuía la presencia de BEA fue analizada por espectroscopia de masas.

El análisis de masas se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución MicrOTOF II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), equipado con una fuente de ionización en electrospray (ESI Elctrospray Ionisation Source) y un analizador de tiempo de vuelo (TOF: Time Of Flight). Las muestras fueron disueltas en metanol al 80% y ácido fórmico al 0.01%, y analizadas por infusión directa usando el modo de ionización positiva directa. El instrumento fue operado por el software Compass OtofControl 3.2 y el espectro fue procesado con el software Compass DataAnalysis 4.1.362.7, y se utilizó nitrógeno para secar el gas nebulizado (modificado de Jiang *et al.*, 2013; Urbaniak *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2022).

#### **7.5.5 Análisis por espectroscopia de masas MALDI-TOF**

Las muestras se analizaron por Matrix-Assisted Laser Desorption (MALDI) con un equipo Autoflex Speed® (Bruker Daltonik GmbH Bremen, Germany), las condiciones de análisis fueron: flujo del gas de solvatación de 4 L·min<sup>-1</sup>, temperatura de fuente de 180°C, capilaridad de voltaje de 4.5 kV, mezcla de péptidos (Pepmix II®, Bruker Daltonics, Germany) como calibrante externo, escaneo iónico de 50-3000 m/z y una matriz de ácido α-cyano-4-hydroxycinnamic (CHCA) [10 mg·mL<sup>-1</sup> en 50% acetonitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético], la cual se mezcló en volúmenes iguales (3 µL) con la muestra, posteriormente se colocaron 2 µL de ésta mezcla en la placa de muestreo del equipo. El software para la adquisición de espectros y su procesamiento fueron el Compass 3.4 FlexControl y el FlexAnalysis respectivamente, la adquisición se realizó utilizando el método de reflexión positiva. La desorción de la muestra se realizó con un láser en estado sólido SmartBeam II® (laser power 33%, 200 scans, 2kHz) (modificado de Palyzova *et al.*, 2019; Tuiche *et al.*, 2014).

## **7.6 Ensayos *in-vitro***

### **7.6.1 Líneas celulares**

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas: la H-1975 ATCC y la H-1299 ATCC. Ambas provenientes del Instituto de Cancerología de la Ciudad de México. Se cultivaron en cajas de cultivo celular con 5 mL de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 20 mM de L-glutamina y 100 U·mL<sup>-1</sup> de penicilina/estreptomina a 37 °C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, hasta que las células alcanzarán una confluencia superior al 90% (de 2 a 4 días), posteriormente las células fueron despegadas con 1 mL de 0.25% tripsina / 0.5mM EDTA y centrifugadas en tubos Falcon de 15 mL durante 5 minutos a 1000 rpm, el botón de células resultante se lavó con 5 mL de buffer PBS 1X, finalmente las células fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 y según el caso fueron cultivadas en nuevas cajas de cultivo celular para proliferación, o en placas de 96 pozos para llevar a cabo bioensayos o en microtubos de 1.5mL con 10% de suero fetal bovino y 10% de DMSO para su conservación en congelación a -70°C.

### **7.6.2 Citotoxicidad de la BEA**

Para determinar la citotoxicidad de la BEA se llevó a cabo la prueba de MTT en placas de 96 pozos, primero para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI50) de la BEA y cisplatino a las líneas celulares H-1975 y H-1299, para ello se utilizaron concentraciones de 5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 y 0.25 µM para BEA, y 11, 6, 3, 1.5 y 0.75 µM para cisplatino. Para esto se cultivaron 30,000 células en cada pozo de la placa con 100 µL de medio de cultivo, la placa se incubó durante 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, transcurrido este tiempo se desechó el medio de cultivo de la placa y se agregaron 100 µL de medio nuevo con 5 µL de medio conteniendo 10 mg·mL<sup>-1</sup> de MTT a cada pozo. Posteriormente la placa se incubó de nuevo durante 4 horas, al finalizar este tiempo se desechó otra vez el medio de cultivo y se agregaron 100 µL de DMSO a cada pozo, se agitó la placa durante 5 minutos y se leyó en un lector de placas MULTISKAN G0 (Thermo SCIENTIFIC®) a 570 nm. Una

vez determinada la CI50, tanto de BEA como de cisplatino, se llevó nuevamente a cabo la prueba de MTT combinando concentraciones por debajo de la CI50 de BEA, con concentraciones por debajo de la CI50 de cisplatino, con la finalidad de determinar si existe un efecto sinérgico al combinar ambas sustancias. Se utilizó como control negativo solo medio de cultivo sin tratamiento y como control positivo 100 µL de cisplatino. Todos los ensayos fueron llevados a cabo en repeticiones de seis.

### **7.6.3 Cepas bacterianas**

Se utilizaron dos cepas de *S. aureus*, ATCC 43300 resistente a meticilina y oxacilina y la ATCC 25923 sin resistencia a antibióticos. También se utilizó la cepa de *S. typhimurium*, ATCC 14028, todas las cepas fueron otorgadas por la doctora Aida Hamdan Partida de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. Las cepas fueron cultivadas en caldo de soya tripticaseína (TSB) (BD Bioxon®) a 37°C con agitación de 150 rpm durante 24 horas, posteriormente para la conservación de las cepas, 100 µL de este cultivo se añadieron a 900 µL de medio de medio TSB con 10% de glicerol y fueron conservadas en congelación a -70°C.

Un cultivo de 24 horas de cada cepa bacteriana se tomó para realizar diluciones seriadas 1:1, 1:10, 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000; después 100 µL de estas diluciones se cultivaron en cajas Petri con agar Mueller Hinton con la finalidad de conseguir unidades formadoras de colonia (UFC) aisladas. A continuación, una de estas UFC se tomó con un asa bacteriológica y se cultivó en 3 mL de caldo Mueller Hinton (BD Bioxon®) a 37°C, con agitación de 150 rpm durante 24 horas, finalmente la suspensión bacteriana se ajustó a 1 en la escala de McFarland utilizando agua estéril, esta nueva suspensión equivale a  $3 \times 10^8$  UFC por cada mL, y se utilizó para los ensayos *in-vitro*. Este procedimiento se hizo cada vez que se realizaron ensayos para garantizar que las cepas bacterianas no poseían contaminación, y que se encontraran en fase exponencial antes de cada prueba.

### **7.6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

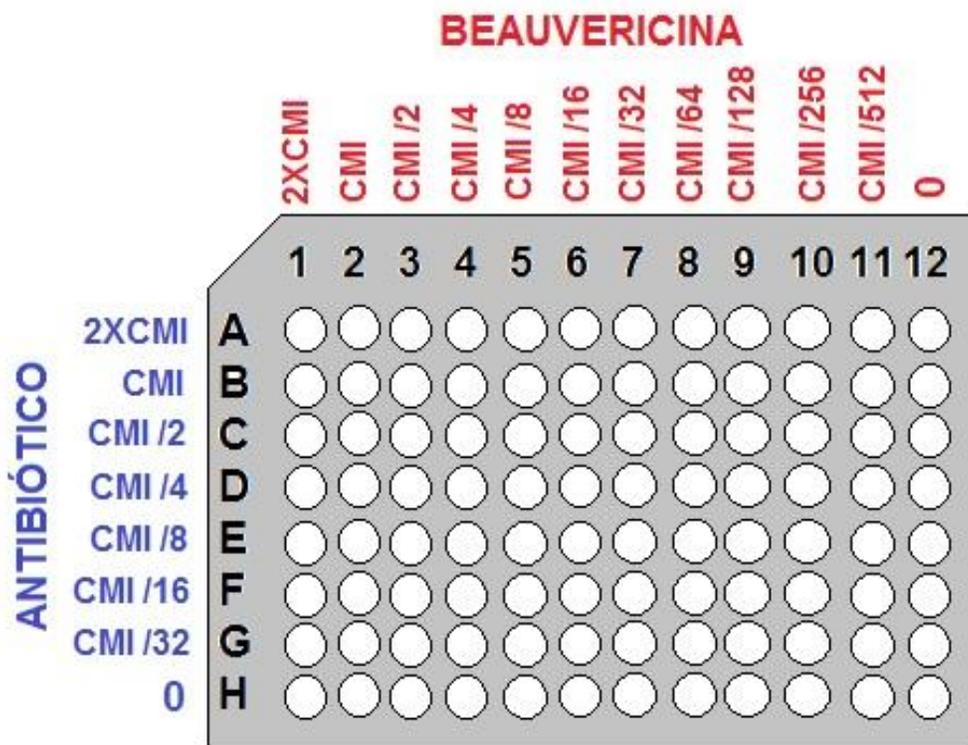
Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizó la técnica microdilución en caldo. Para las cepas ATCC 43300 y ATCC 25923 de *S. aureus* se determinó la CMI de BEA, lincomicina y oxacilina; mientras que para la cepa ATCC 14028 de *S. typhimurium* se determinó la CMI de BEA y ciprofloxacino. Estos antibióticos se eligieron por ser los más prescritos para tratar infecciones causadas por estos microorganismos.

La técnica de microdilución se realizó colocando 100 µL de caldo Mueller Hinton en cada pozo de una placa de 96 pozos, añadiendo concentraciones seriadas de 20 a 0.078 µM de BEA para las cepas de *S. aureus*, y de 60 a 10 µM para *S. typhimurium*, así como concentraciones seriadas de 1.28 mM a 0.019 µM de lincomicina, concentraciones seriadas de 0.25 a 0.0039 µM para oxacilina y concentraciones seriadas de 20 µM a 0.15 nM para ciprofloxacino. A continuación, se inoculó cada pozo con 5 µL de la suspensión bacteriana ajustada a 1 en la escala de McFarland, equivalente a  $1.5 \times 10^6$  UFC, finalmente la placa fue incubada a 37°C durante 24 horas y leída en un lector de placas Synergy HT (BioTek®) a 600nm, para determinar los pozos en los que hubo crecimiento bacteriano (Esteban *et al.*, 2021; Morales-Ubaldo *et al.*, 2020). Se utilizó como control negativo 50 mM de lincomicina, como control positivo solo medio de cultivo con el inóculo bacteriano, un control con solamente medio de cultivo para descartar contaminación en la placa y un control con medio de cultivo, inóculo y vehículo para descartar cualquier efecto que pudiera tener el vehículo en el crecimiento bacteriano. Todas las determinaciones de la CMI fueron llevadas a cabo por triplicado y con repeticiones de tres dentro de cada placa para cada una de las concentraciones de antibióticos utilizadas.

#### **7.6.5 Determinación de sinergismo**

Para la determinación de sinergismo entre la BEA y los antibióticos se usó la técnica de tablero (*checkerboard test*), colocando en las columnas de la caja de 96 pozos concentraciones de 2xCMI, CMI, CMI/2, CMI/4, CMI/8, CMI/16, CMI/32, CMI/64, CMI/128, CMI/256 y CMI/512 de BEA; por otro lado, en las filas de la caja de 96 pozos se colocaron concentraciones de 2xCMI, CMI, CMI/2, CMI/4, CMI/8, CMI/16 y CMI/32 del antibiótico (figura 6) posteriormente todos los pozos se inocularon con

5 µL de suspensión bacteriana ajustada a 1 en la escala de McFarland, equivalente a  $1.5 \times 10^6$  UFC, finalmente la placa fue incubada a 37°C durante 24 horas y leída en un lector de placas Synergy HT (BioTek®) a 600nm, para determinar los pozos en los que hubo crecimiento bacteriano (Canut-Blasco *et al.*, 2020; Hossain *et al.*, 2020).



**Figura 6.** Representación de la técnica de tablero, mostrando las diferentes combinaciones de BEA y antibiótico.

Para conocer si hubo un efecto sinérgico en las combinaciones de BEA con los antibióticos, primero se determinó la concentración inhibitoria fraccional (CIF) para BEA y para el antibiótico utilizando la siguiente expresión matemática:

$$CIF \text{ del antibiotico} = \frac{CMI \text{ del antibiotico en combinación con BEA}}{CMI \text{ del antibiotico}}$$

$$CIF \text{ de la BEA} = \frac{CMI \text{ de BEA en combinación con el antibiotico}}{CMI \text{ de la BEA}}$$

Una vez conociendo la CIF, tanto para el antibiótico como para la BEA, se determinó el índice de la concentración inhibitoria fraccional de la combinación (ICIF) utilizando la siguiente expresión matemática:

$$ICIF = CIF \text{ del antibiotico} + CIF \text{ de la BEA}$$

El valor de ICIF se utilizó para conocer el tipo de efecto que hay entre las interacciones de BEA con los antibióticos, siendo la interpretación de resultados la siguiente:

**ICIF  $\leq$  0,5:** la combinación es sinérgica

**ICIF = 1:** la combinación es aditiva

**ICIF  $>$  0,5 -  $\leq$  4:** la combinación es indiferente o hay ausencia de interacción

**ICIF  $>$  4:** la combinación es antagónica

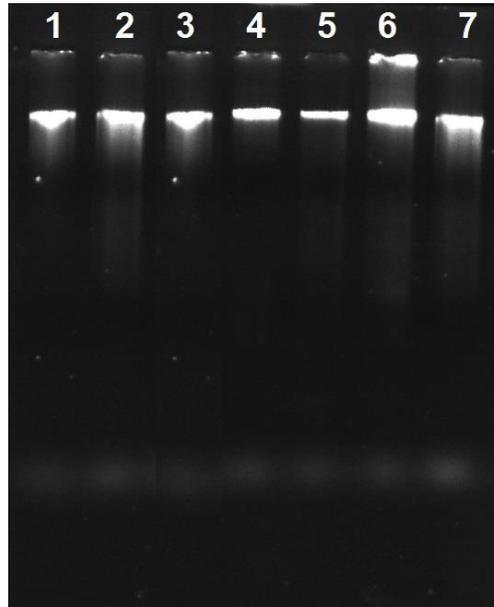
Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando GraphPad PRISM (version 8.01).para Windows. Los datos de absorbancia obtenidos en cada pozo se compararon con los controles. En cada valor de absorbancia, el valor obtenido en el control negativo (que sólo contenía el medio) fue restado, y el porcentaje de viabilidad se calculó con respecto al crecimiento en ausencia de antimicrobianos. Se realizó un ANOVA de una vía con respecto al control positivo (Esteban *et al.*, 2021).

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **8.1 Extracción de ADN**

El ADN extraído de las diferentes cepas obtuvo una buena integridad (figura 7), con concentraciones de 11 hasta los 39.1 ng· $\mu$ L<sup>-1</sup>, con valores por arriba de 1.6 y por debajo de 2 para la relación 260/280 nm, y valores de entre 1.79 y 3.1 para la relación 260/230 (tabla 1), lo que indica que el ADN obtenido de todas las cepas posee una pureza de aceptable a óptima, ya que estos valores son indicativos de bajas concentraciones de proteínas y carbohidratos respectivamente (Solomon *et al.*, 2016). Basándose en la concentración de ADN obtenida, su integridad y su pureza se puede decir que el kit de extracción DNease Plant mini kit (Qiagen®) y la

lisis celular físico de congelación utilizando nitrógeno líquido, mortero y pistilo, fue un método adecuado para la obtención de ADN a partir de hongos filamentosos.



**Figura 7.** Gel de agarosa al 1%, mostrando la integridad del ADN de las cepas. 1: *B. bassiana* 882.5. 2: *B. bassiana* tac1.1. 3: *C. javanica* CHE-CNRCB 303. 4: *C. fumosorosea* ARSEF 3302. 5: *F. oxysporum* Schltl. 6: *Fusarium* sp. AB2. 7: *Epicoccum* sp. TORT.

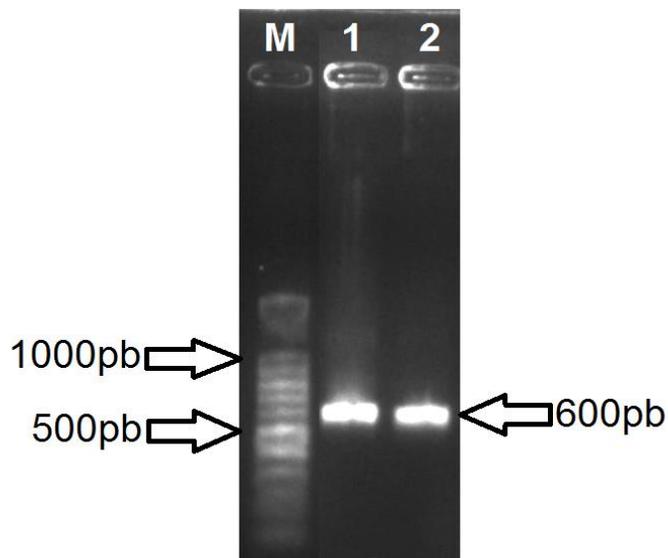
**Tabla 1.** Pureza y concentración del ADN obtenido

<b>Cepa</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>Relación 260/230</b>	<b>Concentración de ADN (ng·µL<sup>-1</sup>)</b>
<i>Beauveria bassiana</i> cepa 882.5	1.95	2.1	39.1
<i>Beauveria bassiana</i> cepa tac1.1	1.87	2.22	11
<i>Cordyceps javanica</i> CHE- CNRCB 303	1.79	2.19	20.5
<i>Cordyceps fumosorosea</i> ARSEF 3302	1.79	2	24
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltl	2	2.11	11.1
<i>Fusarium sp.</i> AB2	1.99	2.07	16.2
<i>Epicoccum sp.</i> TORT	1.85	2.3	79.8

## 8.2 Identificación molecular

La amplificación de las regiones ITS y el gen ribosomal 5.8S, utilizando los oligonucleótidos ITS4 y ITS5, generaron fragmentos de aproximadamente 600 pb tanto para *Fusarium sp.* AB2, como para *Epicoccum sp.* TORT (figura 8). La secuenciación de estos fragmentos indicó que el producto de PCR para *Fusarium sp.* AB2 tiene una longitud de 592 pb y posee una homología superior al 99% con diferentes aislados de la especie *F. oxysporum* (tabla 2), según la base de datos del GenBank. Por otro lado, el producto de PCR de *Epicoccum sp.* TORT indicó que tiene una longitud de 595 pb y pose una homología superior al 98% con aislados de la especie *E. nigrum* (tabla 3) según la base de datos del GenBank. Los códigos de acceso del GenBank otorgados para las secuencias de estas cepas fueron

MT093266.1 y MW079850.1 para *F. oxysporum* AB2 y *E. nigrum* TORT respectivamente.



**Figura 8.** Gel de agarosa al 1%, mostrando los productos de PCR de los genes ribosomales y secuencias ITS, de las cepas identificadas molecularmente. M: Marcador de peso molecular, 1: *F. oxysporum* AB2, 2: *E. nigrum* TORT.

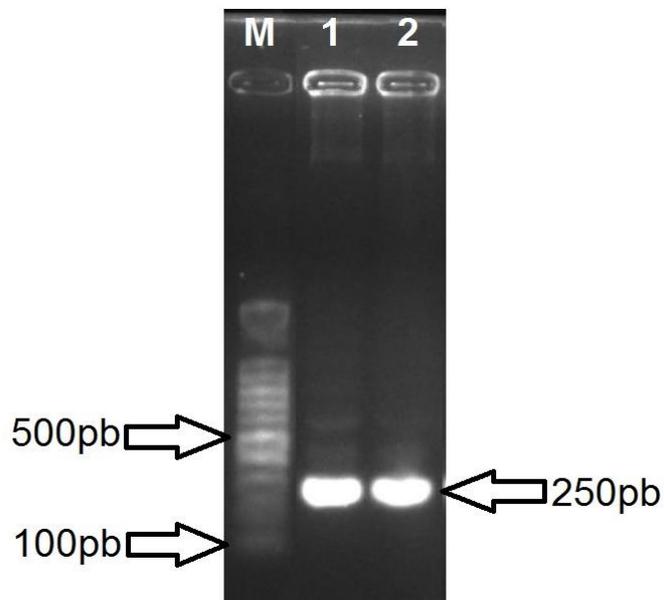
**Tabla 2.** Identidad de las regiones ITS y gen ribosomal 5.8S de *F. oxysporum* AB2 con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado FT	100	99.62	<a href="#">MT020427.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado SF_234	99	99.62	<a href="#">MT529510.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado SF_993	99	99.62	<a href="#">MT530269.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado SF_964	99	99.62	<a href="#">MT530240.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado SF_690	99	99.62	<a href="#">MT529966.1</a>

**Tabla 3.** Identidad de las regiones ITS y gen ribosomal 5.8S de *E. nigrum* TORT con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa K36	99	98.40	<a href="#">MG655162.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa EECC-664	99	98.21	<a href="#">KP942891.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa EECC-628	99	98.21	<a href="#">KP942869.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa ALE-171	99	98.20	<a href="#">MF380871.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> aislado DO67	99	98.20	<a href="#">KP050622.1</a>

La amplificación del gen de actina utilizando los oligonucleótidos ACTF y ACTR generaron fragmentos de aproximadamente 250 pb, tanto para *F. oxysporum* AB2 como para *E. nigrum* TORT (figura 9), la secuenciación de estos fragmentos indicó que el producto de PCR para *F. oxysporum* AB2 tiene una longitud de 243 pb y posee una homología superior al 99% con diferentes aislados de la especie *F. oxysporum*, incluyendo una cepa de *F. foetens* (tabla 4) según la base de datos del GenBank. Por otro lado, el producto de PCR de *E. nigrum* TORT indicó que tiene una longitud de 242 pb y posee una homología superior al 93% con aislados de la especie *E. nigrum* (tabla 5) según la base de datos del GenBank.



**Figura 9.** Gel de agarosa al 1%, mostrando los productos de PCR del gen de actina de las cepas identificadas molecularmente. M: Marcador de peso molecular, 1: *F. oxysporum* AB2, 2: *E. nigrum* TORT.

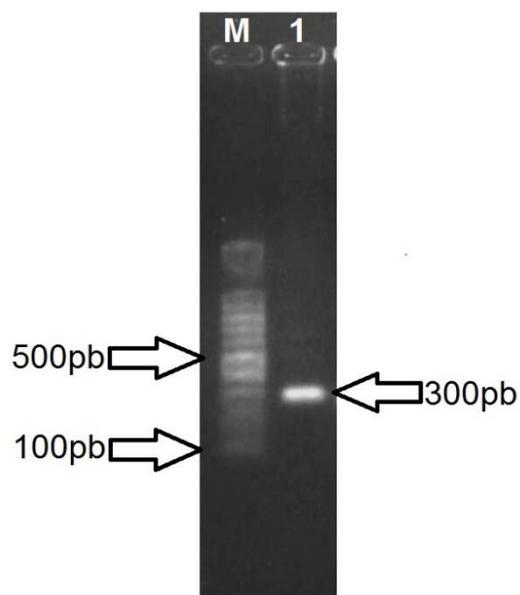
**Tabla 4.** Identidad del gen de actina de *F. oxysporum* AB2 con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Fusarium oxysporum</i> cepa Fod008	100	99.57	<a href="#">MT020427.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> cepa Fod001	100	99.57	<a href="#">MT529510.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado 44	100	99.57	<a href="#">MT530269.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado 170	100	99.57	<a href="#">MT530240.1</a>
<i>Fusarium foetens</i> cepa CBS:110286	100	99.57	<a href="#">MT529966.1</a>

**Tabla 5.** Identidad del gen de actina de *E. nigrum* TORT con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa FP-027-C2	100	97.78	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1585243816 MH102070.1">gi 1585243816 MH102070.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa CBS 115825	100	97.78	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 238557575 FJ426891.1">gi 238557575 FJ426891.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> aislado ET1-1	100	96.0	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1912459758 MN836590.1">gi 1912459758 MN836590.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa CBS 505.85	100	93.86	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 238557573 FJ426890.1">gi 238557573 FJ426890.1</a>
<i>Epicoccum nigrum</i> cepa CBS 125.82	97	94.55	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 238557569 FJ426888.1">gi 238557569 FJ426888.1</a>

La amplificación del gen del factor de elongación alfa, utilizando los oligonucleótidos EF1-728F y EF1-986R, generó un fragmento de aproximadamente 300 pb para *F. oxysporum* AB2 (figura 10). La secuenciación de estos fragmentos indicó que el producto de PCR para *F. oxysporum* AB2 tiene una longitud de 265 pb y posee una homología superior al 98% con diferentes aislados de la especie *F. oxysporum* (tabla 6) según la base de datos del GenBank.



**Figura 10.** Gel de agarosa al 1%, mostrando los productos de PCR del gen del factor de elongación alfa de actina de las cepas identificadas molecularmente. M: Marcador de peso molecular, 1: *F. oxysporum* AB2

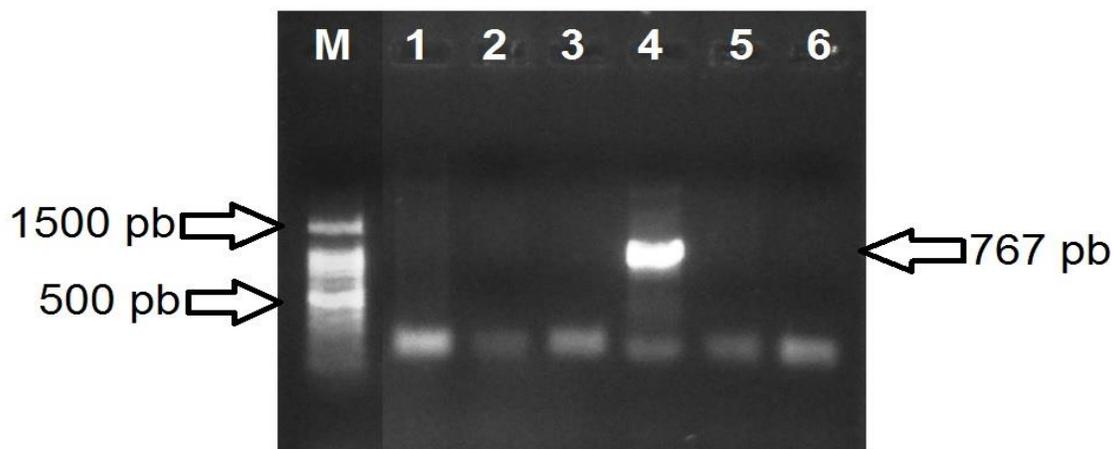
**Tabla 6.** Identidad del gen de actina de *F. oxysporum* AB2 con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Fusarium oxysporum</i> cepa H11	95	99.58	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1180422766 KU939002.1">gi 1180422766 KU939002.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado N211	95	99.58	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1001909414 KT374277.1">gi 1001909414 KT374277.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado AYBZ-65/5	99	98.39	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1556056943 MK001024.1">gi 1556056943 MK001024.1</a>
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado Foa72	95	99.17	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1841583968 MK968952.1">gi 1841583968 MK968952.1</a>
<i>Fusarium foetens</i> aislado Foa70	95	99.17	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1841583966 MK968951.1">gi 1841583966 MK968951.1</a>

La identificación molecular de *F. oxysporum* AB2 y *E. nigrum* TORT mediante la amplificación de diferentes genes y regiones mostró ser una herramienta útil para determinar la especie a la que pertenece, debido a que otros métodos de identificación, como el morfológico y bioquímico, no son capaces de diferenciar especies estrechamente relacionadas como las que pertenecen a un mismo género y clado evolutivo (Minarni *et al.*, 2021). La utilización de más de un gen o marcador molecular para la identificación molecular de estas cepas garantiza que se trata de la especie con mayor porcentaje de identidad en el GenBank ya que todos ellos indicaron pertenecer a una misma especie lo que descarta una errónea identificación de especies (Gallou *et al.*, 2016), lo cual ocurre cuando se utiliza solamente un gen o marcador molecular para su identificación, por la estrecha relación en regiones del genoma de especies que pertenecen al mismo género especialmente las regiones ITS (Cheng *et al.*, 2014).

### 6.3 Amplificación del gen de la beauvericina sintetasa

La amplificación del gen de la beauvericina sintetasa en las seis cepas utilizadas, usando los oligonucleótidos diseñados Beau\_synFW y Beau\_syn2, solamente se logró para la cepa 882.5 de *B. bassiana*, generando un fragmento de aproximadamente 700 pb (figura 11). La secuenciación de este fragmento indicó que posee una longitud de 767 pb, con una homología superior al 95% con el gen de la beauvericina sintetasa de diferentes aislados de *B. bassiana* (tabla 7).



**Figura 11.** Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de PCR del gen de la beauvericina sintetasa utilizando los oligonucleótidos Beau\_synFW y Beau\_syn2. M: Marcador de peso molecular,

1: *F. oxysporum* AB2, 2: *F. oxysporum* Schltl, 3: *B. bassiana* taq 1.1, 4: *B. bassiana* 882.5, 5: *C. javanica* CHE-CNRCB 303, 6: *C. fumosorosea* ARSEF 3302.

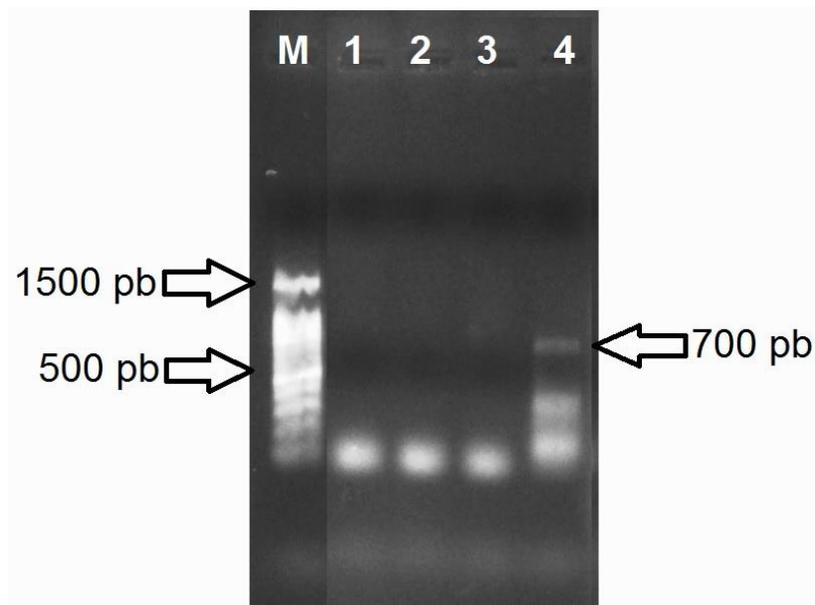
**Tabla 7.** Identidad del gen la beauvericina sintetasa de *B. bassiana* 882.5 con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
Gen de la beauvericina sintetasa del aislado Bb0062 de <i>Beauveria bassiana</i>	99	96.85	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 386873574 JQ617289.1">gi 386873574 JQ617289.1</a>
Gen de la beauvericina sintetasa del aislado BbBVRC de <i>Beauveria bassiana</i>	99	96.85	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 309252532 HQ141932.1">gi 309252532 HQ141932.1</a>
Region del cromosoma 3 de <i>Beauveria bassiana</i> cepa HN6	99	98.85	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1905001555 CP045884.1">gi 1905001555 CP045884.1</a>
Gen de la beauvericina sintetasa de la cepa ARSEF 2860 de <i>Beauveria bassiana</i>	99	96.07	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 667662428 XM_008604824.1">gi 667662428 XM_008604824.1</a>
Gen de la beauvericina sintetasa de la cepa ATCC 7159 de <i>Beauveria bassiana</i>	99	95.67	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 208658288 EU886196.1">gi 208658288 EU886196.1</a>

En el resto de las cepas no hubo amplificación con ninguno de los pares de oligonucleótidos, lo que sugiere que no tienen complementariedad con su genoma, específicamente con el gen de la beauvericina sintetasa el cual se ha reportado se encuentra en una parte del genoma denominada *hotspot*, que es muy propensa a mutaciones y recombinaciones genéticas, generando disminución o supresión total de la producción de BEA, ya que se modifican los nucleótidos del gen que codifican para sitios catalíticos de la beauvericina sintetasa (Liuzii *et al.*, 2017; Luangsa *et al.*, 2009; Valencia *et al.*, 2011). Esta modificación en la producción de este metabolito secundario también se ha observado en otros metabolitos, incluso que juegan un

rol importante en la patogenicidad del hongo lo que deriva en un proceso evolutivo que contribuye a generar cepas de una misma especie con diferente nivel de patogenicidad (Wang *et al.*, 2013). Estas mutaciones y recombinaciones genéticas pudieron evitar el alineamiento de los oligonucleótidos y con ello la amplificación del gen de la beauvericina sintetasa en el resto de las cepas.

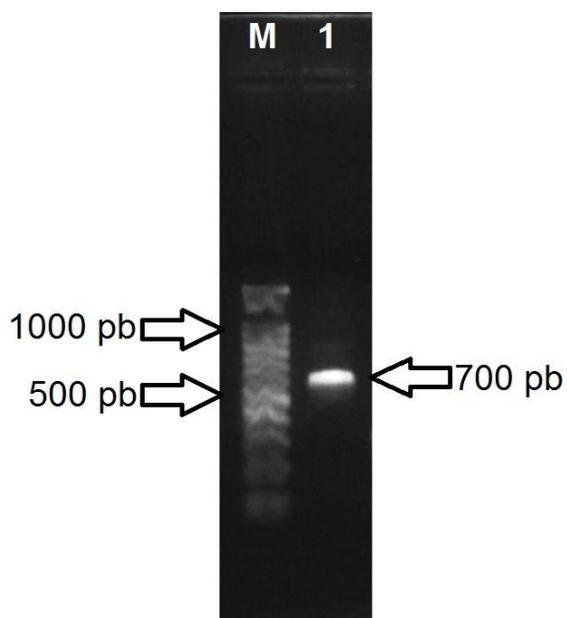
La amplificación del gen de la beauvericina sintetasa utilizando el segundo par de oligonucleótidos FoBEAif y ReBEAif, diseñados para las cepas de los géneros de *Cordyceps* y *Fusarium*, solamente produjo una banda para la cepa ARSEF 3302 de *C. fumosorosea* con un tamaño aproximado de 700 pb (figura 12); sin embargo, la baja concentración del producto de PCR impidió la purificación de este y con ello su secuenciación.



**Figura 12.** Gel de agarosa al 1%, mostrando los productos de PCR del gen de la beauvericina sintetasa utilizando los oligonucleótidos FoBEAif y ReBEAif. M: Marcador de peso molecular, 1: *F. oxysporum* AB2, 2: *F. oxysporum* Schltl, 3: *C. javanica* CHE-CNRCB 303, 4: *C. fumosorosea* ARSEF 3302.

La amplificación del gen de la beauvericina sintetasa en la cepa TORT de *E. nigrum*, usando los oligonucleótidos diseñados Beau\_synFW y Beau\_syn2, produjo una banda de aproximadamente 700 pb (figura 13). La secuenciación de este fragmento indicó que posee una longitud de 766 pb, con una homología superior al 75% con

el gen de la enniatina sintetasa y otras partes del genoma de diferentes aislados de *F. oxysporum* (tabla 8).



**Figura 13.** Gel de agarosa al 1%, mostrando los productos de PCR del gen de la beauvericina sintetasa utilizando los oligonucleótidos Beau\_synFW y Beau\_syn2. M: Marcador de peso molecular, 1: *E. nigrum* TORT.

**Tabla 8.** Identidad del gen la beauvericina sintetasa de *E. nigrum* TORT con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
Gen de la enniatina sintetasa del aislado lycopersici 4287 de <i>Fusarium oxysporum</i>	93	80.45	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1070354406 XM_018391579.1">gi 1070354406 XM_018391579.1</a>
Gen de la enniatina sintetasa del aislado NRRL32931 de <i>Fusarium oxysporum</i>	93	80.72	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1759232891 XM_031190727.1">gi 1759232891 XM_031190727.1</a>
Fragmento del cromosoma IX del aislado Fo47 de <i>Fusarium oxysporum</i>	93	80.22	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 1841337852 CP052046.1">gi 1841337852 CP052046.1</a>

Fragmento del cromosoma X del aislado 44 de <i>Fusarium oxysporum</i>	93	79.78	<a href="http://gil1914073183 CP052904.1">gil1914073183 CP052904.1</a>
Fragmento del cromosoma X del aislado 170 de <i>Fusarium oxysporum</i>	93	78.55	<a href="http://gil1914073171 CP052892.1">gil1914073171 CP052892.1</a>

---

La banda observada (figura 12), utilizando los oligonucleótidos FoBEAif y ReBEAif, en la cepa ARSEF 3302 de *C. fumosorosea* puede atribuirse a que los oligonucleótidos tuvieron una ligera afinidad con una parte del genoma de *C. fumosorosea*, posiblemente codifica para una enzima productora de un depsipéptido en esta cepa, ya que se ha observado que las enzimas depsipéptido sintetetasas comparten uno o varios sitios catalíticos como los sitios de adenilación, péptido acarreador y metiltransferasa que son homologas en la mayoría de especies productoras de depsipéptidos (Jirakkakul et al., 2008; Liuzii et al., 2017). Debido a la homología marcada en las enzimas productoras de estos metabolitos, se ha observado que su producción se regula por un mismo mecanismo en el que intervienen genes específicos (Yin et al., 2022).

La similitud entre las enzimas productoras de depsipéptidos, junto con la homología de sus dominios y sitios catalíticos, pueden explicar la amplificación de un fragmento de ADN de *E. nigrum* TORT utilizando los oligonucleótidos Beau\_synFW y Beau\_syn2, ya que en su diseño no se utilizaron secuencias pertenecientes al género *Epicoccum*, debido a que no hay reportes en el GenBank de secuencias de la beauvericina sintetasa en este género de hongos. Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados a *E. nigrum* se basan en la producción de policétidos y pigmentos de interés farmacéutico (Kaur & Mumbarkar, 2019; Lim et al., 2020), siendo pocos los estudios que mencionan la presencia de BEA en cultivos de esta especie (Braga et al., 2018).

La homología del fragmento amplificado en *E. nigrum* TORT con el gen de la enniatina sintetasa de *F. oxysporum* puede atribuirse a la amplificación del gen de

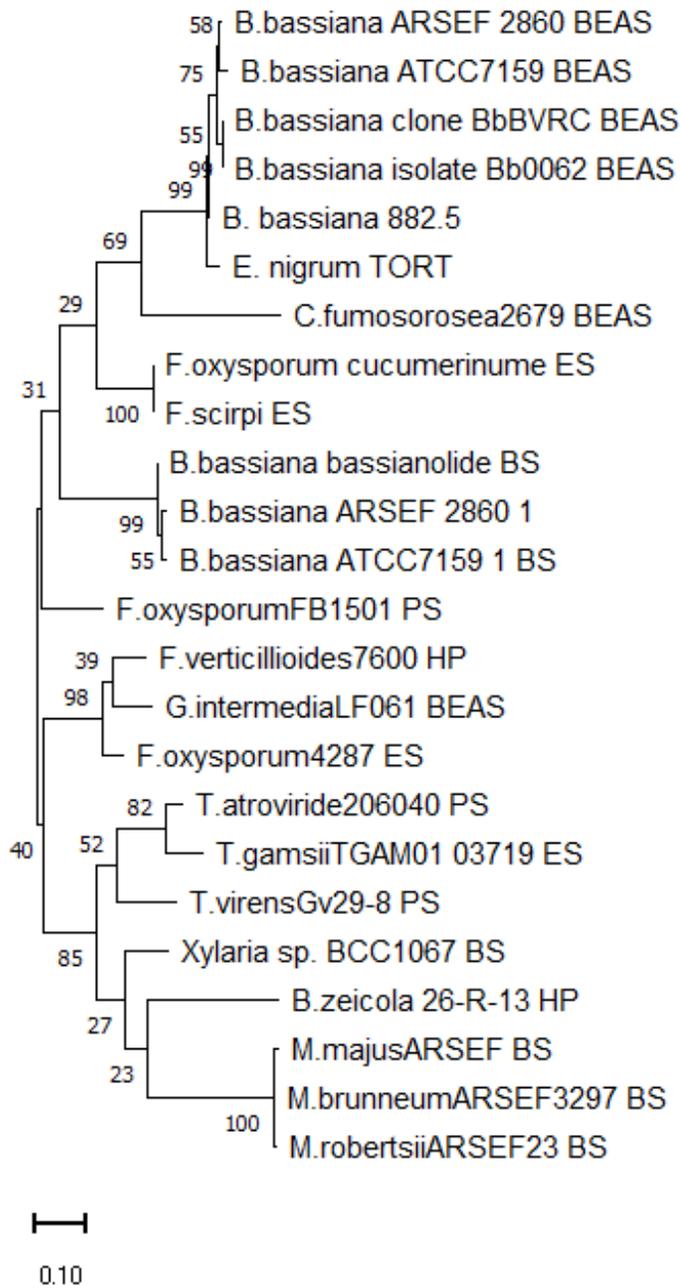
la beauvericina sintetasa de *E. nigrum* TORT, que produce BEA en pequeñas cantidades (Braga *et al.*, 2018). Sin embargo, no hay reportes donde se haya secuenciado el gen de la beauvericina sintetasa en esta especie. Por otra parte, el fragmento amplificado de *E. nigrum* TORT posee gran similitud a nivel filogenético con la beauvericina sintetasa de *B. bassiana* (figura 14), compartiendo un ancestro en común, como un suceso de convergencia evolutiva, mencionado por Gallo *et al.*, (2013), quienes mencionan que las policétido sintetetasas de *E. nigrum* poseen un ancestro en común con las depsipéptido sintetasa, familia a la que pertenece la beauvericina sintetasa, de hecho ambas enzimas comparten uno o más dominios. Esto genera en *E. nigrum* la producción de gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de ellos híbridos entre depsipéptidos y policétidos. Esta producción de compuestos híbridos de depsipéptidos también se ha observado con otros metabolitos, debido a que el gen que codifica para la depsipéptido sintetasa se encuentra en el mismo clúster que otras enzimas productoras de metabolitos secundarios (Uchiyama *et al.*, 2021).

La ausencia de amplificación en el resto de las cepas, y la homología de los sitios catalíticos en diferentes depsipéptido sintetetasas, sugiere el diseño de nuevos oligonucleótidos realizando alineamientos múltiples de una mayor cantidad de secuencias de la beauvericina sintetasa, de especies que pertenezcan a un solo género de hongos, es decir el diseño de un par de oligonucleótidos para cada género de hongos utilizado.

#### **8.4 Filogenia**

El árbol filogenético de varias depsipéptido sintetetasas, incluido el gen de la beauvericina sintetasa (figura 14), muestra que el gen de la beauvericina sintetasa en *B. bassiana* y el fragmento amplificado de *B. bassiana* cepa 882.5 y de *E. nigrum* TORT poseen el mismo ancestro en común más reciente. Dentro de ese mismo clado evolutivo se encuentra la beauvericina sintetasa de *C. fumosorosea*, mientras que en el resto de los clados se encuentran las demás depsipéptido sintetetasas como enniatina sintetasa (ES), bassianoloide sintetasa (BS), péptido sintetasa (PS) y

proteínas hipotéticas (HP) pertenecientes a diferentes especies de hongos.



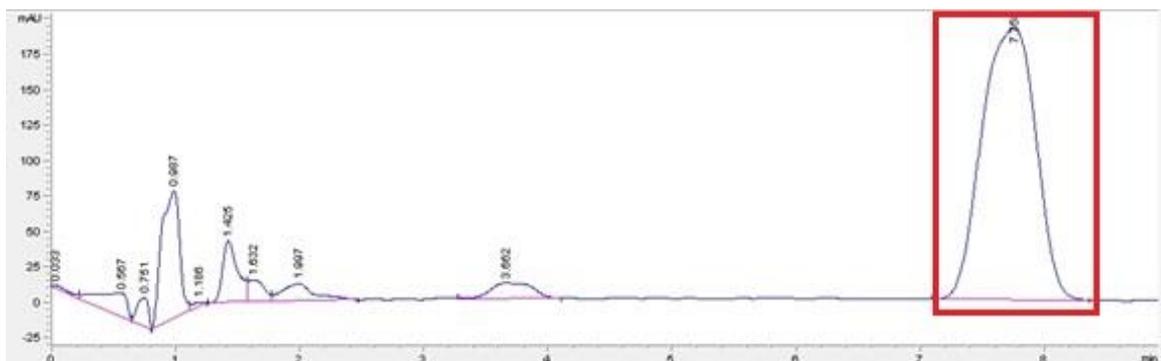
**Figura 14.** Análisis filogenético de los genes de la beauvericina sintetasa (BEAS), enniatina sintetasa (ES), bassianoloide sintetasa (BS), péptido sintetasa (PS) y otras proteínas hipotéticas (HP) de diferentes orígenes, utilizando el programa MEGA 11. El método estadístico de reconstrucción filogenética utilizado fue el de máxima verosimilitud. La robustez de los nodos se evaluó con 1000 repeticiones de *bootstrap*; el modelo de sustitución de nucleótidos fue Jukes-Cantor. Las secuencias de referencia fueron tomadas del GenBank y recortadas a la misma longitud de los amplificadores obtenidos. La barra representa 5 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

En la figura 14 podemos observar la homología limitada de las diferentes depsipectido sintetasa en los clados evolutivos. Es decir, que todas las depsipectido sintetasa de un solo tipo no se agrupan en un mismo clado evolutivo, lo que puede deberse a la homología anteriormente discutida entre esta familia de enzimas, incluso Zhang *et al.*, (2013) menciona que existe una parte en el genoma de los hongos productores de depsipectidos que es más homóloga que el resto del gen codificante de la enzima, y que se encuentra en todas las depsipectido sintetasa, ya que para que ésta sea funcional necesita mínimo tres dominios: un dominio de adenilación encargado del reconocimiento de los aminoácidos que conformaran el depsipectido, un dominio peptidil acarreador encargado de transportar las unidades intermediarias activadas y un dominio de condensación, que une las unidades intermediarias activadas. Dichos dominios son los que poseen la mayor homología en todos los tipos de depsipectido sintetasa y ya han sido reportados en otros estudios (Jirakkakul *et al.*, 2008; Luangsa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). Por lo anterior, la agrupación poco homóloga de las diferentes secuencias, utilizadas para generar el árbol filogenético, puede deberse a que pertenezcan a una de estas regiones, que se encuentran en un mismo clúster de genes, y que además si presentan mutaciones afecta o suprimen completamente la producción del depsipectido.

### **8.5 Análisis cromatográfico**

Con el análisis del estándar de BEA (Sigma®), utilizando las condiciones cromatográficas establecidas, se obtuvo en el cromatograma (figura 15) un pico sin coeleo de ninguno de sus lados, con un ancho de aproximadamente un minuto, sin apariencia visible de un doble pico o señal sobrepuesta y con un tiempo de retención de 7.7 min. Estas características se mantienen cuando se analizan las muestras conseguidas de los diferentes cultivos, ya que el pico perteneciente a la BEA, no se sobrepone con otro pico de algún otro compuesto proveniente del cultivo, lo que se relaciona con lo realizado por Jiang *et al.*, (2013), quienes utilizando condiciones cromatográficas similares miden la concentración de BEA en alimentos, y evitan la sobreposición del pico de la BEA con otros picos provenientes de las muestras que analizan. Por otra parte, las condiciones cromatográficas utilizadas no solo evitan la

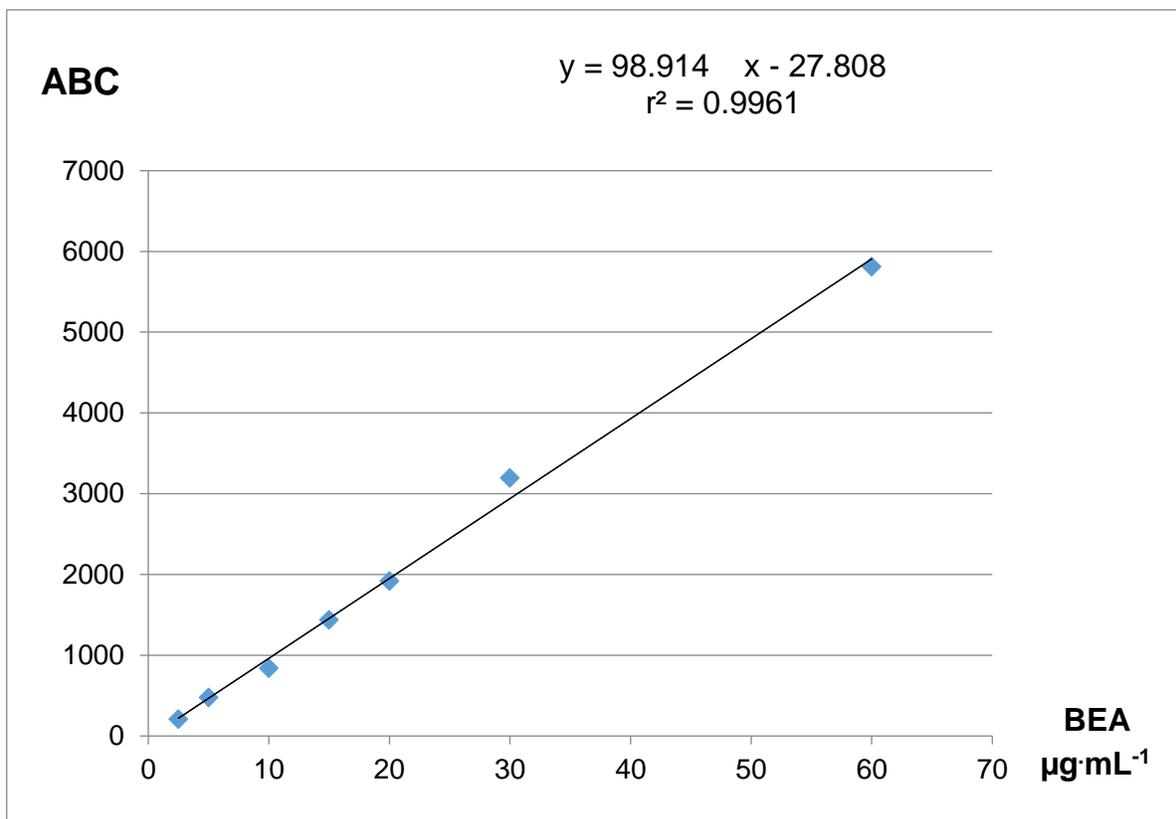
sobreposición del pico de la BEA con otros compuestos presentes en el cultivo, sino que también evita la sobreposición con metabolitos análogos de la BEA que comparten características fisicoquímicas entre sí, como lo conseguido por Xu *et al.*, (2007) quienes separan el espectro del pico de la BEA de los picos de los análogos de esta. Además, la curva de calibración (tabla 9) construida a partir del área bajo la curva de concentraciones de 2.5, 5, 10, 15, 20, 30 y 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BEA (figura 16), produjo una  $r=0.9976$  y una  $r^2=0.9961$ , confiable para calcular las concentraciones de BEA en los diferentes cultivos.



**Figura 15.** Cromatograma obtenido del estándar de BEA, señalado con rojo el pico perteneciente a la BEA.

**Tabla 9.** Curva de calibración realizada con el estándar de BEA

Concentración	Tiempo de retención	Área
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.66 min	479.29
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.71 min	840.71
15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.73 min	1440.07
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.72 min	1919.75
30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.79 min	3196.36
60 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.75 min	5812.24

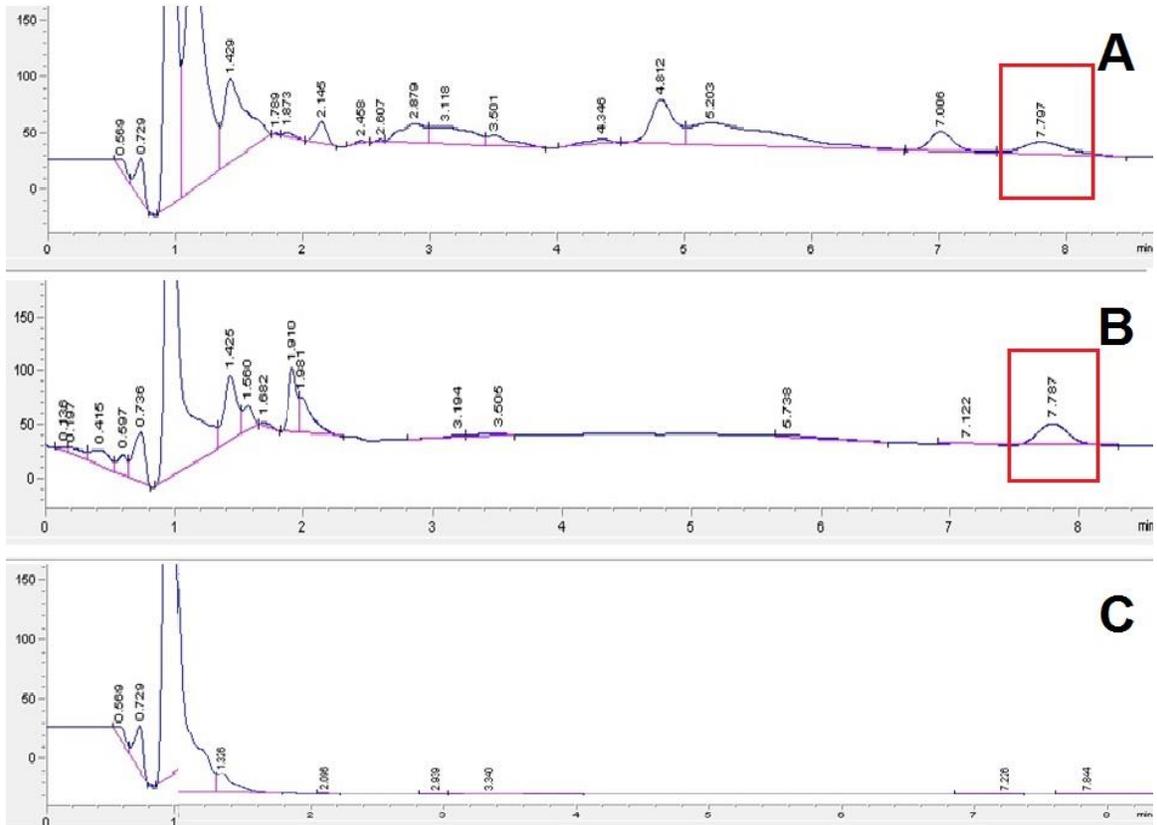


**Figura 16.** Representación figura de la curva de calibración utilizando el estándar de BEA. ABC: área bajo la curva.

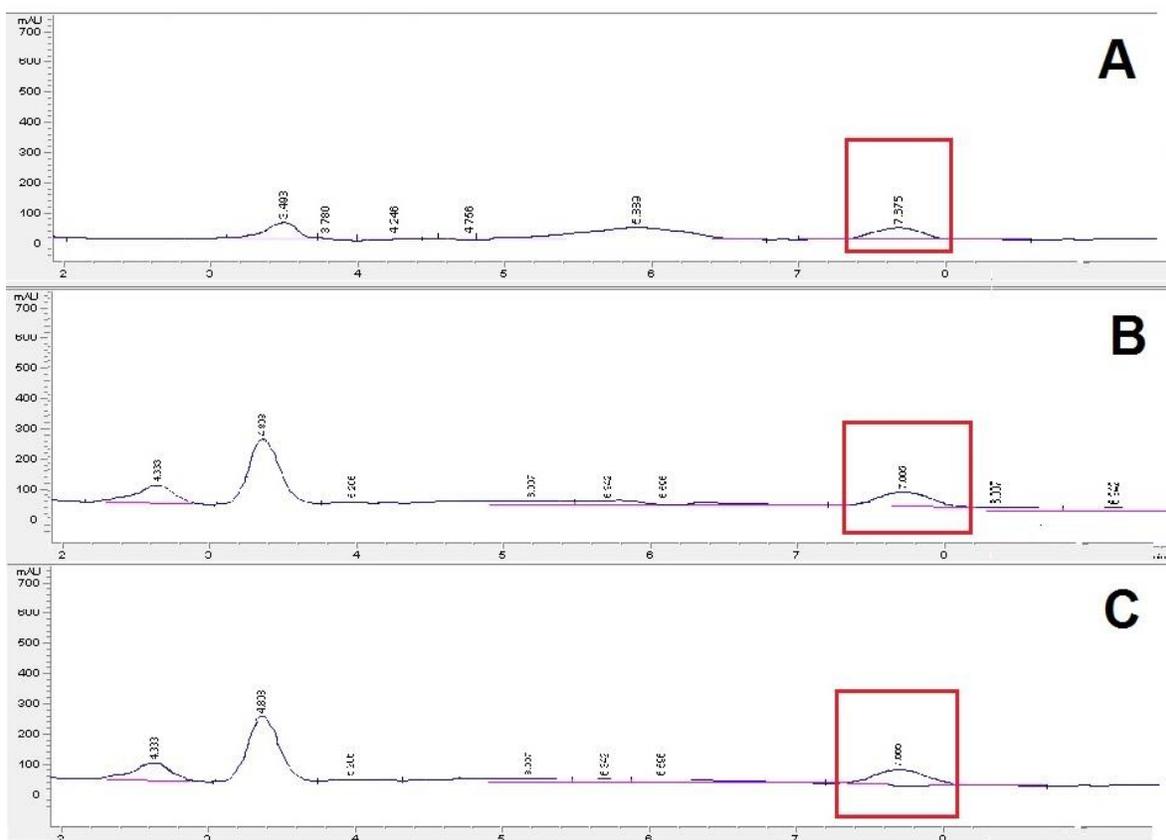
## 8.6 Producción de beauvericina

### 8.6.1 Producción de beauvericina en SSF y SmF

De las seis cepas inicialmente utilizadas, solamente los cromatogramas de la cepa AB2 de *F. oxysporum*, usando tanto el medio enriquecido con camarazón de camarón (figura 17), como el medio optimizado (figura 18) en SmF y en SSF, presentaron un pico con un tiempo de retención igual al del estándar de BEA, teniendo notables diferencias en el tamaño del pico según el tipo de cultivo. Es decir que de las seis cepas probadas inicialmente, solo AB2 de *F. oxysporum* mostró producción de BEA, por lo que el estudio se continuo con esta cepa.



**Figura 17.** Cromatogramas obtenidos de los cultivos del medio de cultivo enriquecido con caparazón de camarón de *F. oxysporum* AB2. A: SmF. B: SSF usando PUF como soporte sólido. C: SSF usando como soporte sólido bagazo de caña. Se señala con rojo el pico perteneciente a la BEA.



**Figura 18.** Cromatogramas obtenidos de los cultivos del medio de cultivo optimizado de *F. oxysporum* AB2. A: SmF. B: SSF usando PUF como soporte sólido. C: SSF usando como soporte sólido bagazo de caña. Se señala con rojo el pico perteneciente a la BEA.

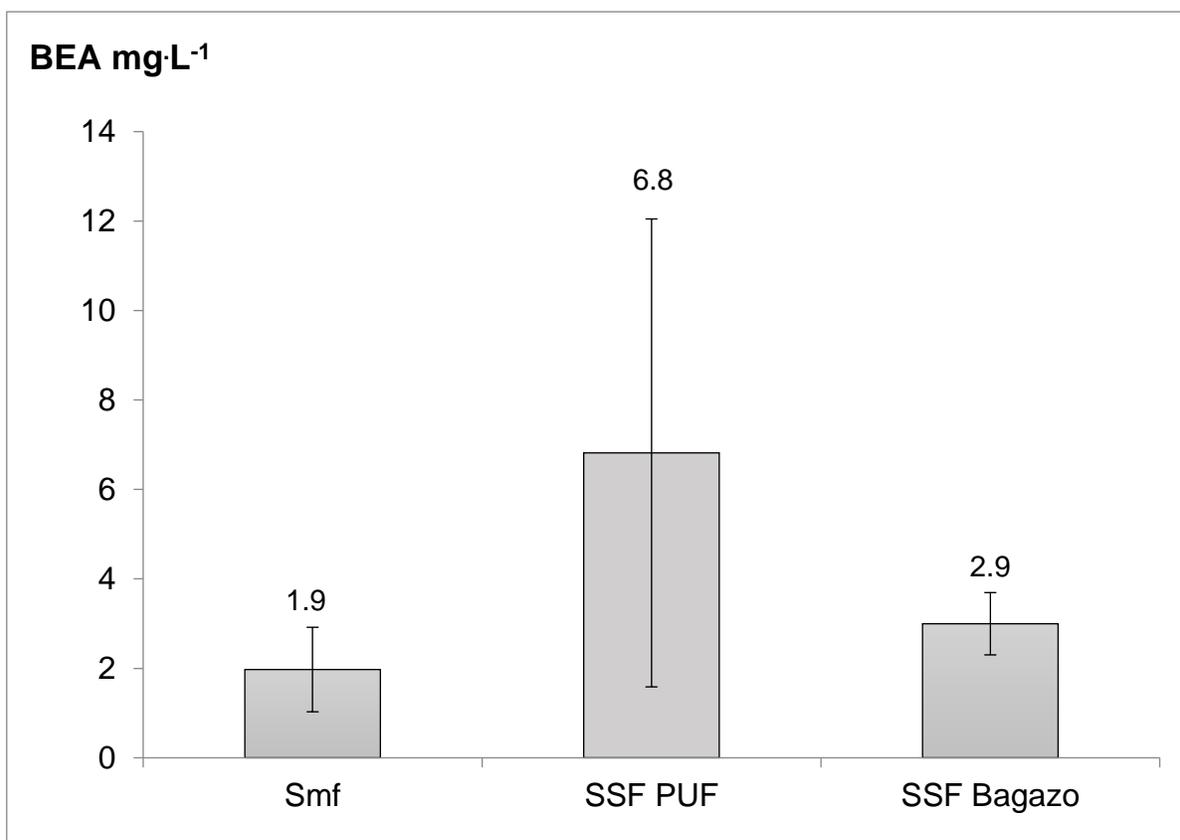
La cuantificación de la BEA producida por la cepa AB2 de *F. oxysporum*, a partir del área bajo la curva de los picos obtenidos en los cromatogramas tanto en SmF como en SSF, mostró figuras comparativas de la producción de BEA usando el medio enriquecido con caparazón de camarón (figura 19) y el medio optimizado (figura 20). Se observa que la mayor producción de BEA es de 22.8 mg por litro de medio de cultivo, usando SSF con el medio de cultivo optimizado y PUF como soporte sólido, lo cual puede atribuirse a que en este sistema existe una mayor oxigenación en el medio facilitando el crecimiento del hongo, lo cual se ha observado que junto con la acumulación de micelio en el soporte sólido contribuye a un aumento considerable de los metabolitos secundarios (Balakrishnan *et al.*, 2021; Chen & He, 2012; Lima-Pérez *et al.*, 2017). Esto es porque al facilitar el crecimiento del hongo se promueve la síntesis de metabolitos secundarios, en respuesta a distintas condiciones como

el aumento de especies reactivas de oxígeno, la rapidez con la que el hongo puede oxidar la fuente de carbono y alcanzar el máximo de su producción de biomasa, que toma más tiempo en SmF (Campos *et al.*, 2021).

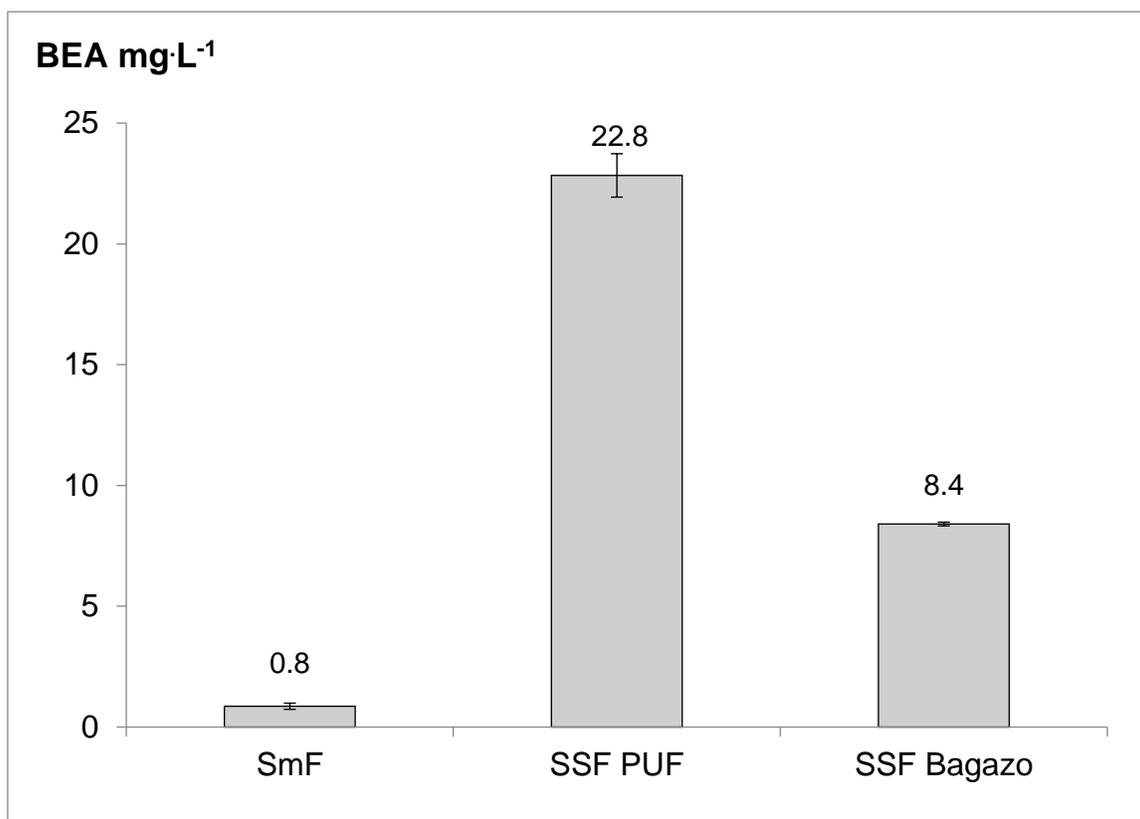
De hecho, el cambio fisiológico va mucho más allá ya que el aumento en la producción de metabolitos secundarios es atribuido a la fisiología que muestran los hongos en SSF, ya que en este tipo de cultivo tienen que anclarse e invadir un soporte sólido, además que se generan hifas aeróbicas y anaeróbicas, a este tipo de crecimiento por parte del hongo se le llama fisiología del medio sólido. Se han reportado que mas de 4,628 genes se expresan de forma diferente en SSF, incluso hay proteínas que se expresan exclusivamente en este tipo de cultivo, lo que da una idea de la sorprendente dimensión de los cambios fisiológicos en SSF (Barrios-González, 2012).

También se observa que las barras de error son mucho menores en este medio de cultivo, en comparación con el medio de cultivo enriquecido con caparazón de camarón, esto se atribuye a que en este último la principal fuente de carbono es el caparazón de camarón el cual tiende a precipitar al momento de realizar los cultivos lo que genera cultivos heterogéneos; esto no se observa en el medio optimizado donde la principal fuente de carbono es la glucosa, disuelta completamente en el

medio.

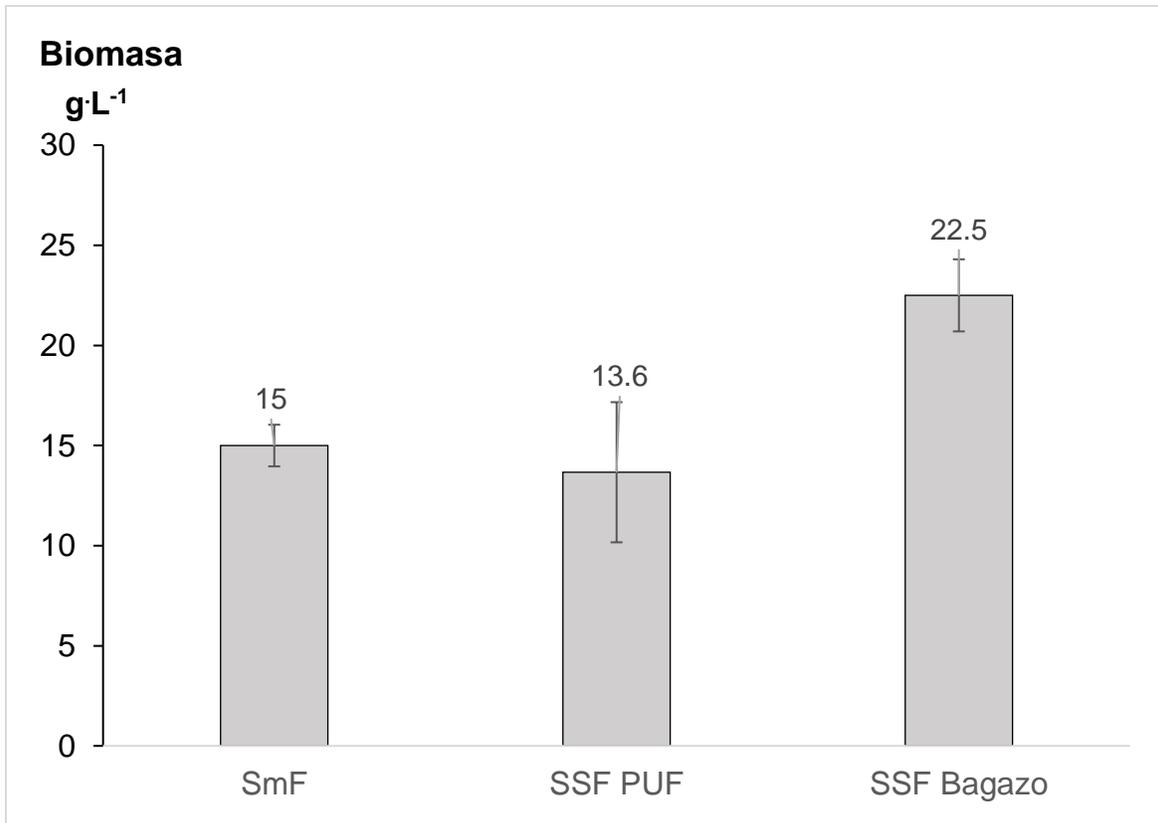


**Figura 19.** Producción de BEA (mg·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo enriquecido con caparazón de camarón.

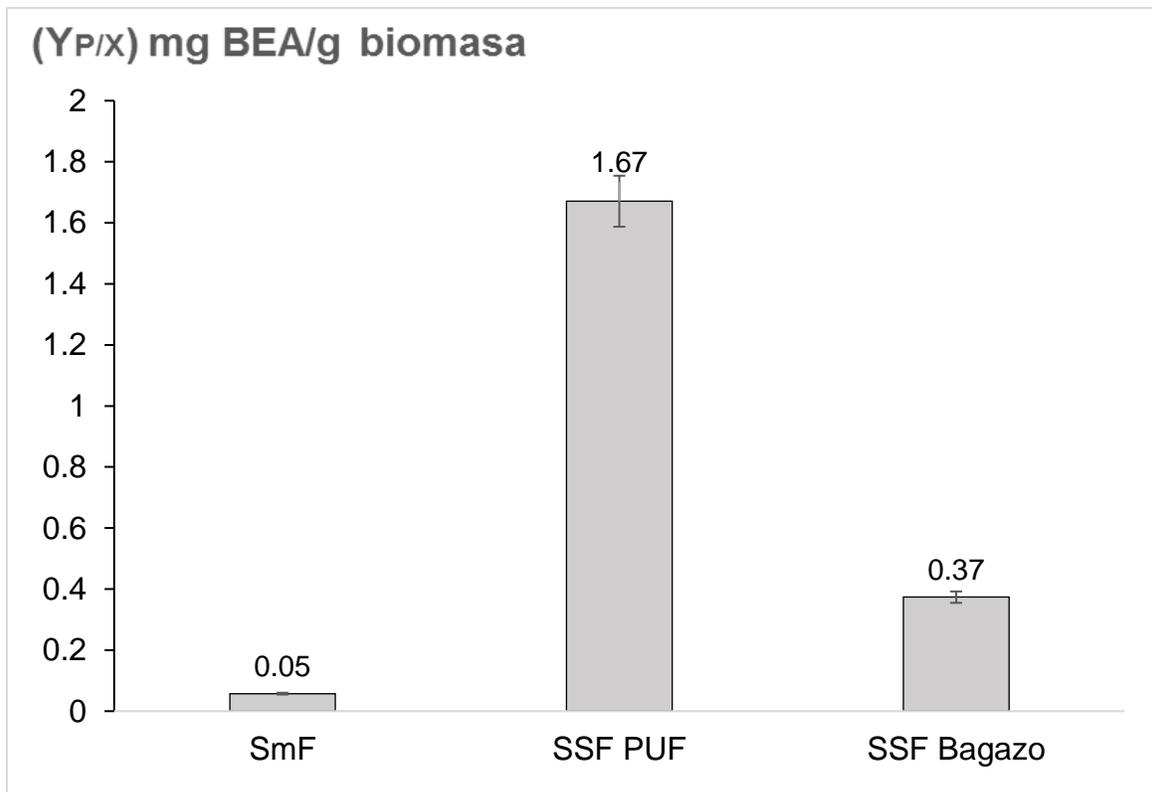


**Figura 20.** Producción de BEA (mg·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo optimizado

La producción de biomasa de *F. oxysporum* AB2 (figura 21) con el medio optimizado fue mayor en SSF utilizando bagazo como soporte sólido, mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la producción de SmF y SSF utilizando PUF como soporte sólido. Sin embargo, al ser mayor la producción de BEA en SSF usando PUF como soporte sólido, en relación con el bagazo de caña, existe una mayor producción específica de BEA en SSF usando PUF como soporte sólido (figura 22). Es decir, la biomasa producida en este cultivo está más especializada en producir BEA. Esto contrasta con Lima-Pérez *et al.*, (2019) quienes observan un aumento considerable en la producción de biomasa de *Bacillus thuringiensis* usando SSF y PUF como soporte sólido, en comparación con SmF utilizando el mismo medio de cultivo.



**Figura 21.** Producción de biomasa (g·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo optimizado.

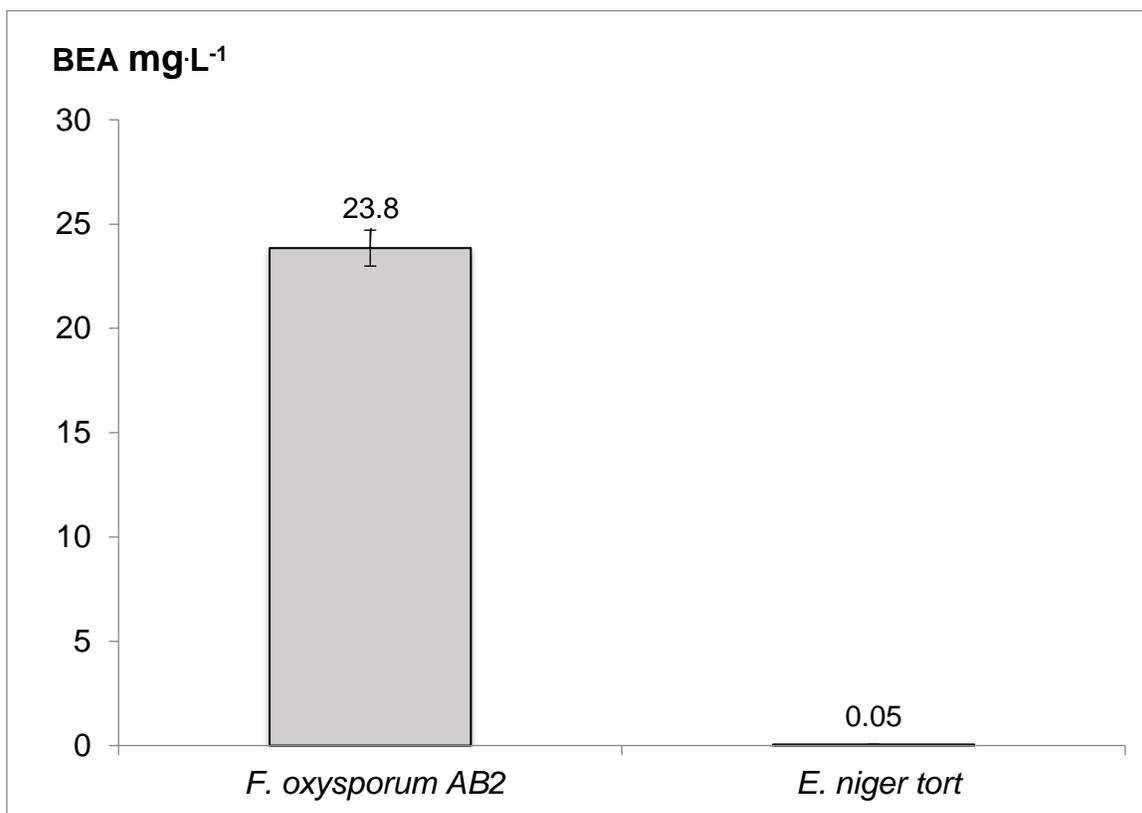


**Figura 22.** Producción específica de BEA ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo optimizado.

Por otro lado, hubo dificultad de medir la biomasa (y por lo tanto la producción específica de BEA) en los cultivos realizados con el cultivo enriquecido con caparazón de camarón, debido a que la biomasa quedaba adherida al caparazón de camarón, o a que ésta no podía separarse del soporte sólido para medir la biomasa por peso seco. Debido a esta dificultad, y a que la mayor producción de BEA en *F. oxysporum* AB2 se observó utilizando el medio de cultivo optimizado en SSF y PUF como soporte sólido, para la cepa TORT de *E. nigrum* posteriormente integrada a la investigación solamente se realizaron cultivos utilizando estas condiciones para determinar su producción de BEA.

En la producción de BEA en *E. nigrum* usando SSF y PUF como soporte sólido se comparó con la de la *F. oxysporum* AB2 (figura 23). La producción de BEA de *E. nigrum* TORT fue muy baja ( $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en comparación con la de *F. oxysporum*

AB2, lo que se relaciona con Braga *et al.*, (2018) que mencionan la baja producción de BEA en *E. nigrum* en comparación a otras especies como las del género *Fusarium*, por lo que el interés de *E. nigrum* está basado en la producción de otros compuestos como colorantes y antibióticos, pero no en la producción de BEA (Chi *et al.*, 2020; Dzoyem *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2019).

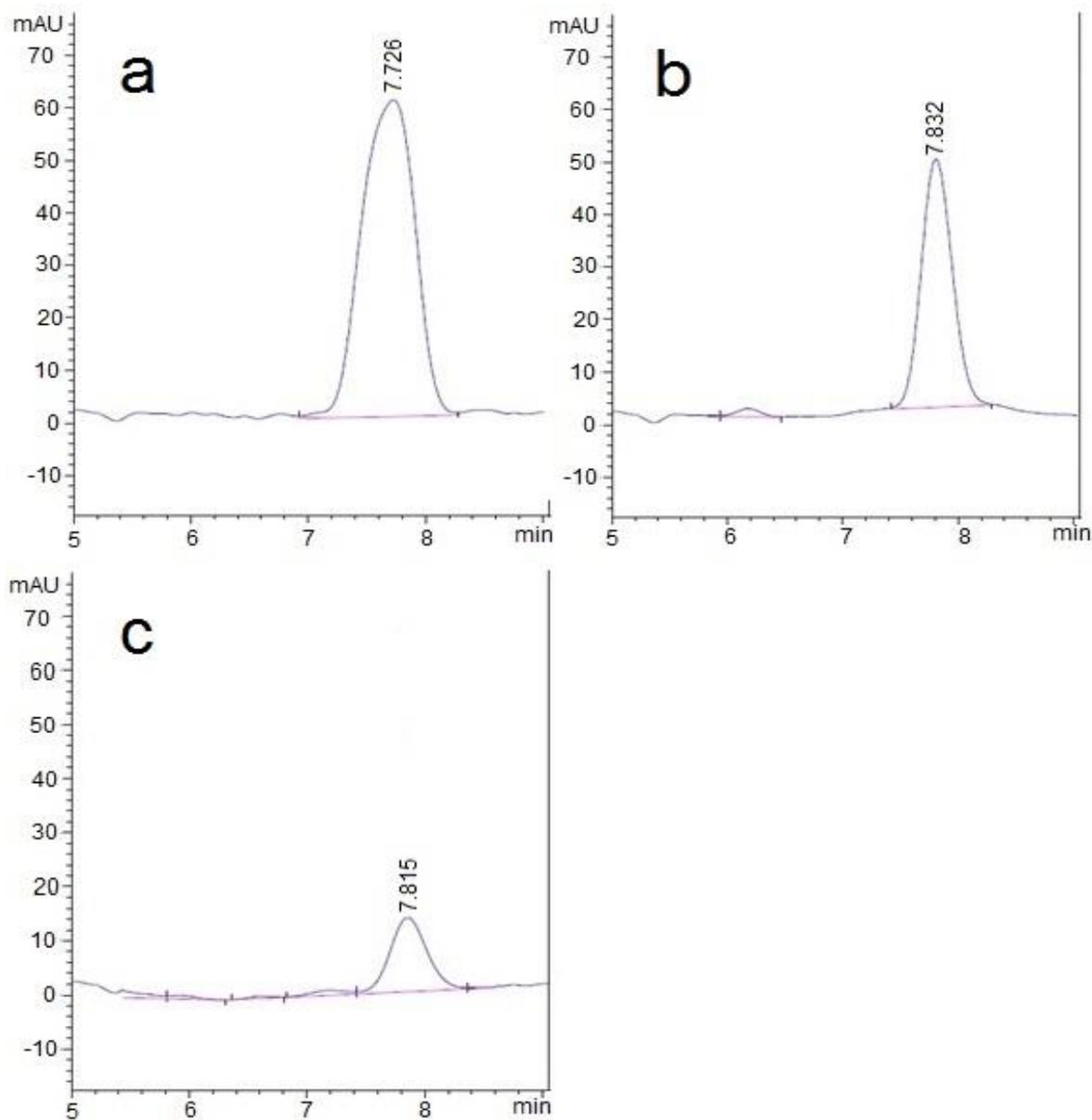


**Figura 23.** Producción de BEA (mg·L<sup>-1</sup>) de *E. nigrum* TORT y *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo optimizado, SSF y PUF como soporte sólido.

### 8.7 Espectroscopia de masas ESI-TOF y MALDI-TOF

Antes de realizar el análisis por espectroscopia de masas se analizaron de forma individual, por HPLC, las fracciones obtenidas del mismo, siendo la fracción del minuto 8.4 a 9.4 la que posee únicamente el pico al que se le atribuye la presencia de BEA en los cultivos, tanto de *F. oxysporum* AB2 como para *E. nigrum* TORT. Al comparar el cromatograma de estas fracciones con el estándar de BEA se observa que todos los picos poseen una forma del pico prácticamente idéntica, correspondiente a un tiempo de retención que varía entre ellos tan solo por pocas centésimas de minuto (figura 24). Esta pequeña diferencia en el tiempo de

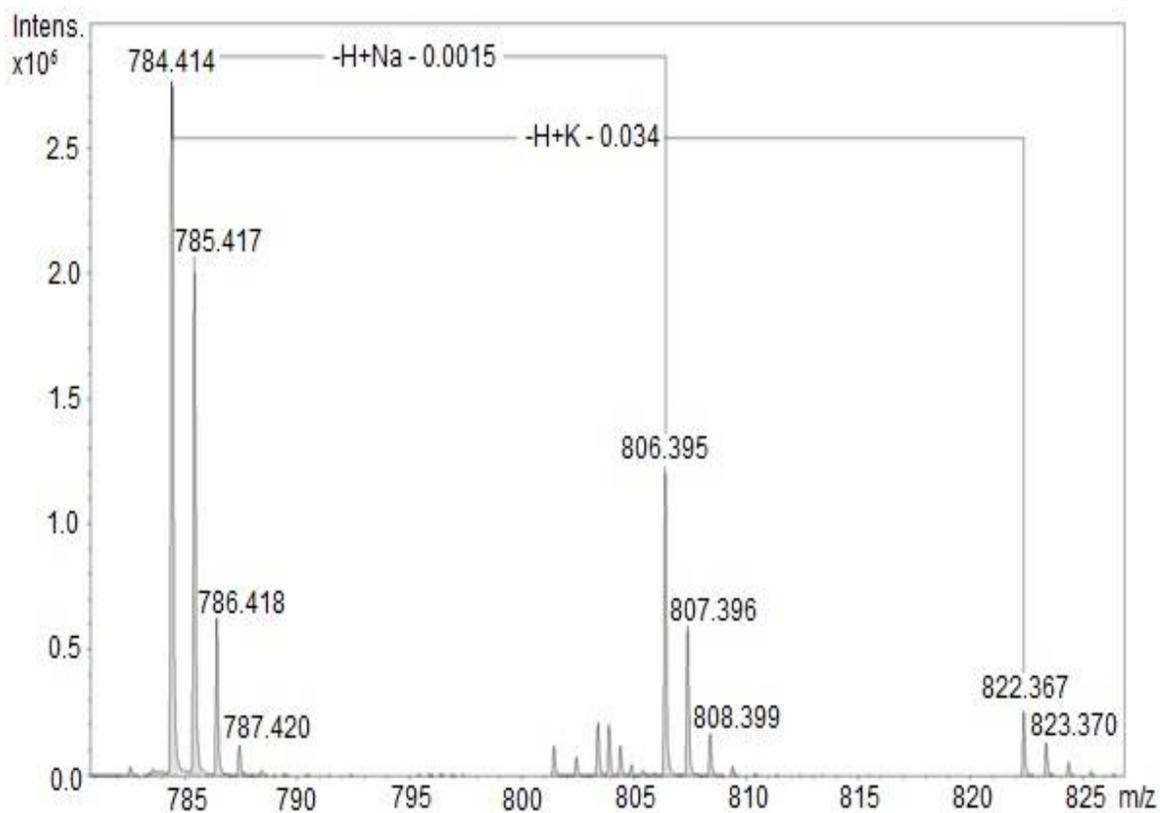
retención, entre las muestras y el estándar de BEA, ya ha sido observada en otros estudios (Jiang *et al.*, 2013; Meca *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2009) por lo que esta fracción fue analizada por espectroscopia de masas.



**Figura 24.** Cromatograma obtenido del estándar de BEA (a); cromatograma obtenido del extracto de SSF de *F. oxysporum* AB2 (b); cromatograma obtenido del extracto de SSF de *E. nigrum* TORT (c).

El análisis de la fracción de HPLC que contenía el pico al que se le atribuye la presencia de BEA, tanto de *F. oxysporum* AB2 como para *E. nigrum* TORT, presentó tres señales tanto en ESI-TOF (figura 25) como en MALDI-TOF (figura 26) La

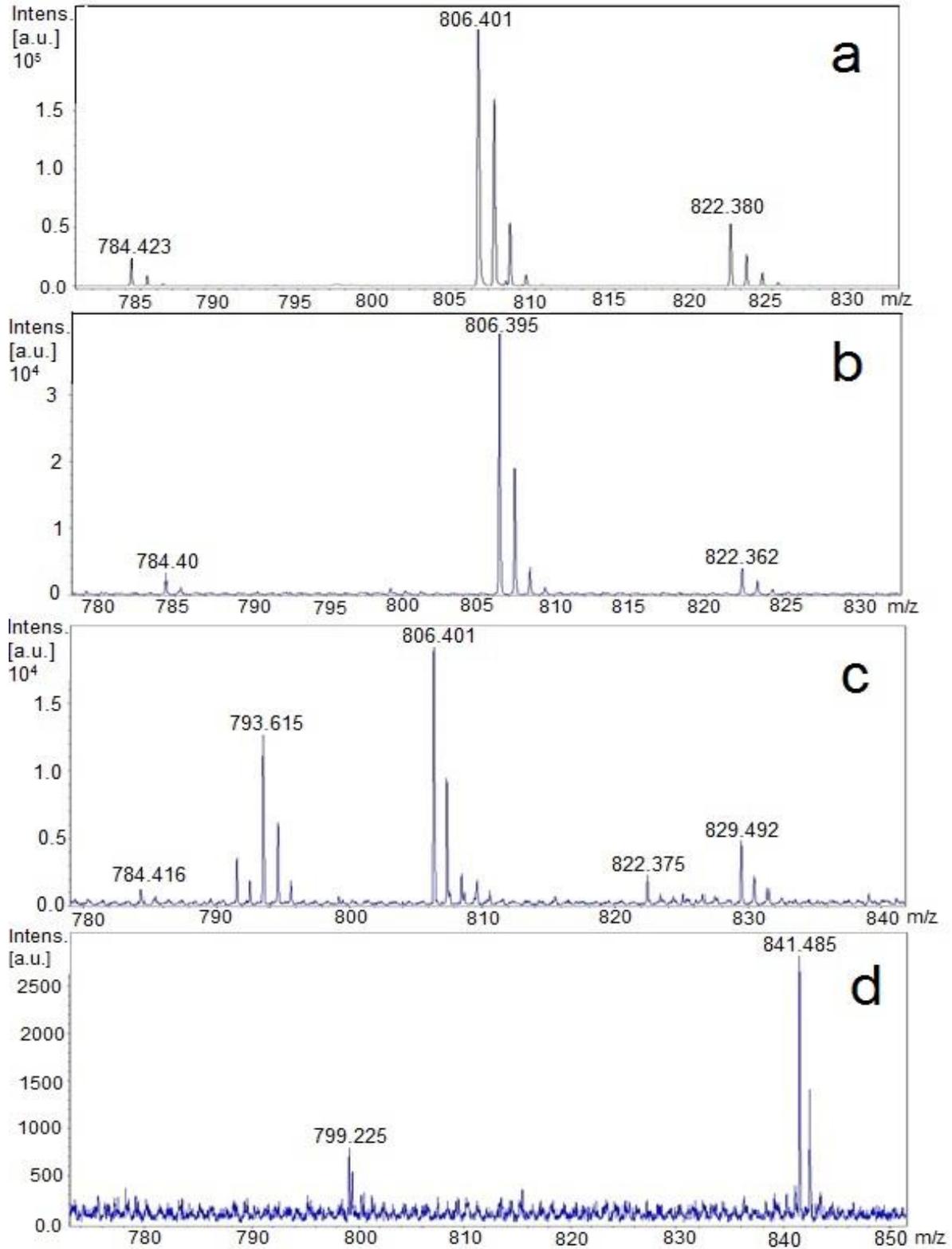
primera de ellas a 784 m/z correspondiente a la masa del ion molecular de la BEA, la segunda a 806 m/z correspondiente a la masa del aducto formado entre la BEA con el ion sodio, y la tercera a 822 m/z correspondiente al aducto entre la BEA con el ion potasio; estas mismas señales también fueron obtenidas al analizar el estándar de BEA. Las señales obtenidas han sido consideradas por varios autores (Palyzova *et al.*, 2019; Rachmawati *et al.*, 2018) como claves para la identificación y confirmación de la BEA, además en ESI-TOF las señales obtenidas cuentan con un error menor a 10 ppm (tabla 10), que el programa obtiene al analizar la masa teórica esperada con la obtenida. Este resultado indica una alta confiabilidad en los resultados (Rachmawati *et al.*, 2018). Tanto en los resultados obtenidos como en los reportes de identificación de BEA, las señales predominantes son las correspondientes al aducto de sodio y potasio, esto se atribuye a la capacidad ionófora de la BEA que deriva en la formación de aductos con cationes monovalentes y divalentes, a su vez que provienen de la fase móvil utilizada en el HPLC o del método de purificación de la BEA, en este caso del buffer PBS (Serrano *et al.*, 2015). Por lo que los resultados obtenidos mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF y ESI-TOF, junto con el amplio respaldo bibliográfico, indican que efectivamente el pico observado en el análisis cromatográfico se trata de BEA.



**Figura 25.** Espectro de masas ESI-TOF de la fracción 8.4 - 9.4 de HPLC de *F. oxysporum* AB2 en SSF.

**Tabla 10.** Formulas condensadas, masas teóricas, masas obtenidas y error asignado del espectro de masas ESI-TOF de la fracción 8.4 - 9.4 de *F. oxysporum* AB2 en SSF usando el software Compass DataAnalysis.

Formula condensada	m/z obtenida	m/z teórica	Error (ppm)
$C_{45}H_{57}N_3O_9 + H^+$	784.4147	784.4168	2.6
$C_{45}H_{57}N_3O_9 + Na^+$	806.3951	806.3987	-4.4
$C_{45}H_{57}N_3O_9 + K^+$	822.3672	822.3726	6.6



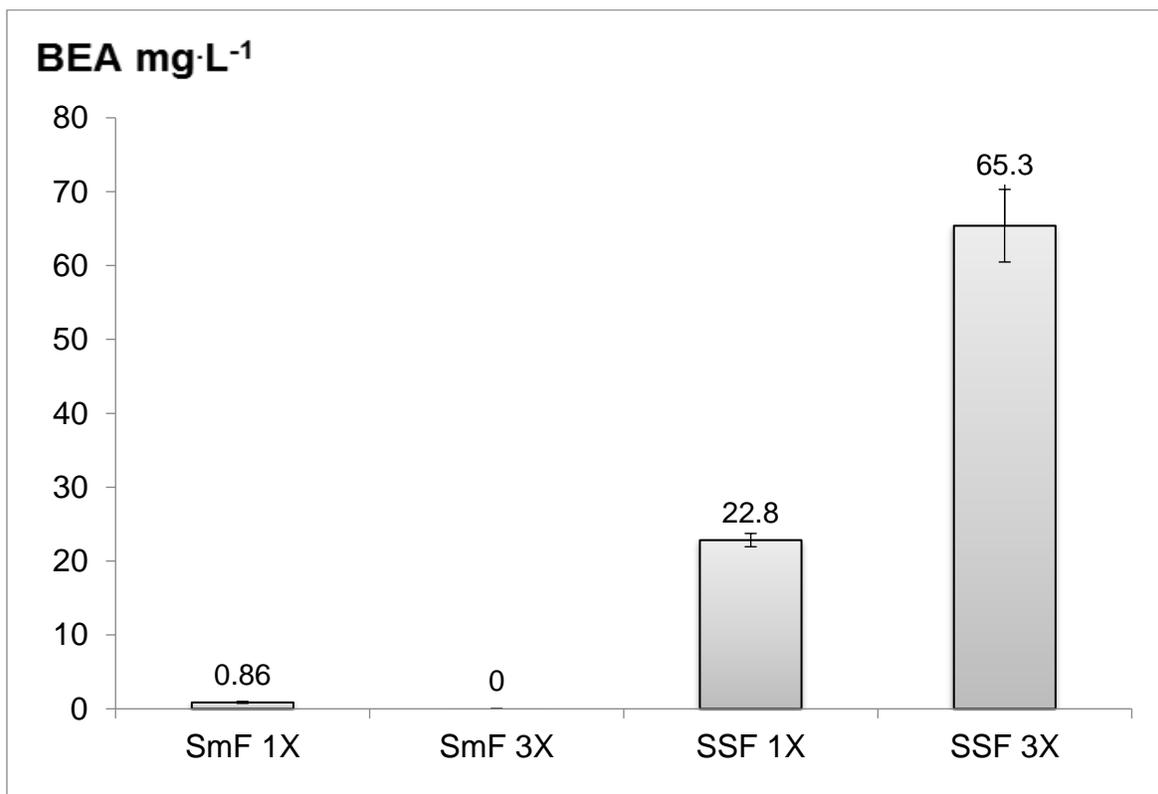
**Figura 26.** Espectro de masas MALDI-TOF. Estándar de BEA (60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (a), fracción 8.4 - 9.4 de HPLC de *F. oxysporum* AB2 (b), fracción 8.4 - 9.4 de HPLC de *E. nigrum* TORT (c), control negativo (d). Rango m/z 780 - 830.

## 8.8 Concentración del medio de cultivo

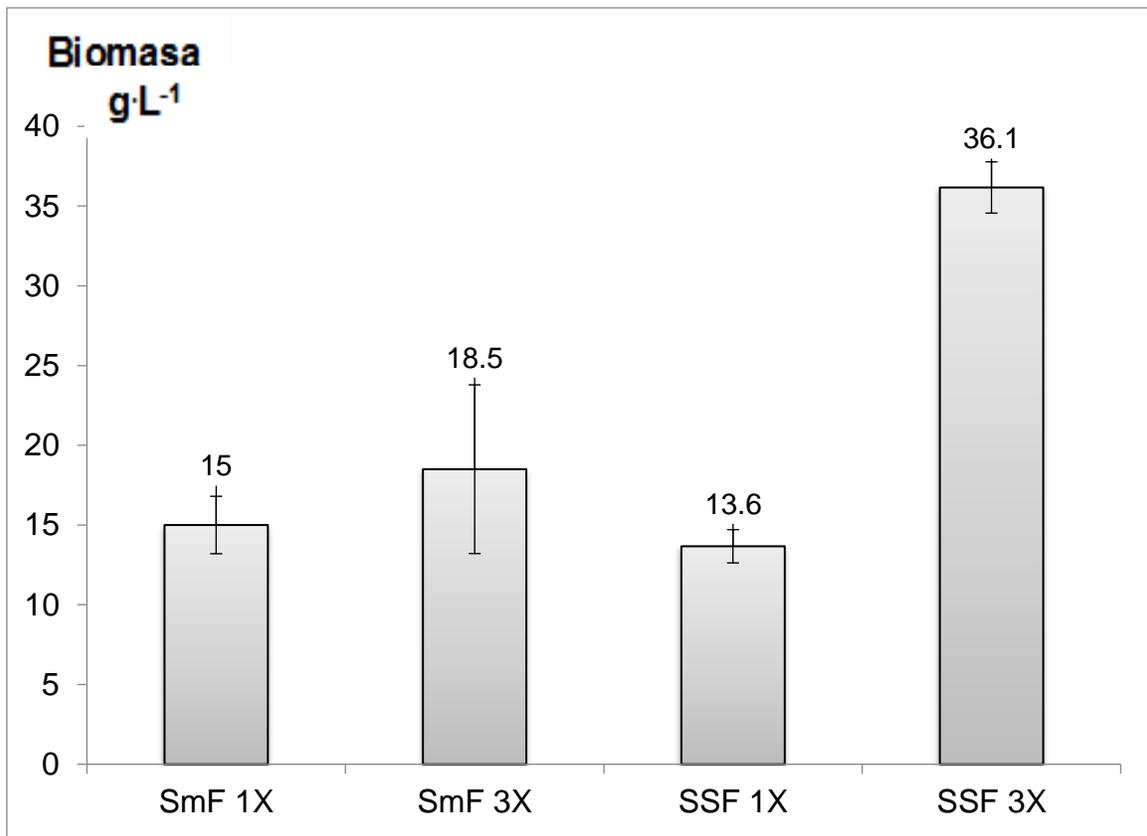
El sistema de cultivo sólido (SSF) otorga a los microorganismos un equilibrio entre estado líquido, sólido y gaseoso, con una mayor aireación en comparación a otros tipos de cultivo (Singhania *et al.*, 2009). Así es posible incrementar la concentración del medio de cultivo que se embebe en el soporte sólido, sin que las concentraciones elevadas tengan un efecto tóxico para el microorganismo. Los medios de cultivo concentrados en SSF ya se han utilizado para aumentar la producción de biomasa y metabolitos secundarios (Baños *et al.*, 2009; Barrios-González *et al.*, 1988; Cuadra *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2001) En particular, Baños *et al.* (2009). Debido a las características mencionadas se realizaron SSF utilizando el medio de cultivo líquido optimizado, que mostró una mayor producción de BEA, pero con una concentración 3X, comparándolo con el SmF y utilizando solamente la cepa AB2 de *F. oxysporum* por ser la única productora de BEA de las seis cepas iniciales, incluso de mayor producción en comparación con la cepa TORT posteriormente incluida de *E. nigrum*.

La producción de BEA en *F. oxysporum* AB2 utilizando el medio de cultivo concentrado (3X), respecto a los cultivos utilizando el medio no concentrado (1X), aumentó prácticamente tres veces en el SSF utilizando PUF como soporte sólido, pasando de 23.8 a 65.38 mg·L<sup>-1</sup>. Sin embargo, en el SmF hubo una inhibición total de la producción de BEA (figura 27). El aumento en la producción de BEA en el SSF puede deberse, como se mencionó antes, al equilibrio entre fase líquida, sólida y gaseosa que se logra. A su vez, el aumento que se observa en el SSF usando el medio 3X puede atribuirse a la oxigenación elevada que posee, dichos niveles de oxigenación no se presentan en el SmF lo que genera una baja oxidación de las concentraciones altas de glucosa en el medio. Las concentraciones elevadas en el medio no generan un efecto tóxico para *F. oxysporum* AB2, de hecho, también aumenta la producción de biomasa, pero sin un efecto inhibitorio de la producción de BEA. Por lo que la represión catabólica de la glucosa, en el cultivo sólido tiene poco o nulo efecto, contrastando con (Miao *et al.*, 2019) donde las concentraciones elevadas de glucosa son un inhibidor de la producción de ciertos metabolitos, por otro lado, la composición y concentración del medio de cultivo influye de forma

importante en la cantidad y variedad de metabolitos secundarios producidos por especies del género *Fusarium* (Kristensen *et al.*, 2021). Más allá de estas consideraciones, se puede decir que se debe a la “fisiología del medio sólido” (Barrios-González, 2012).



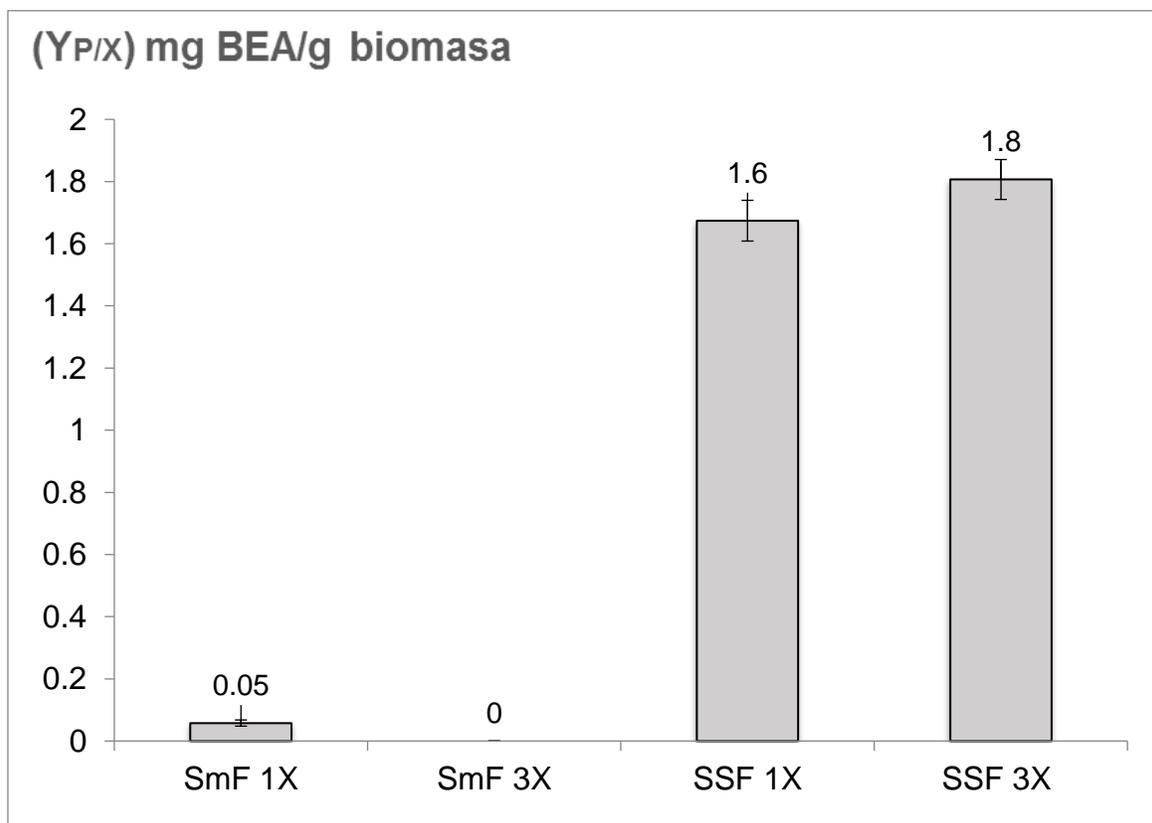
**Figura 27.** Comparación en la producción de BEA (mg·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo simple (1X) y conncentrado (3X), en SSF y SmF.



**Figura 28.** Comparación en la producción de biomasa (g·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo simple (1X) y concentrado (3X), en SSF y SmF.

Debido a que se triplicó la producción de BEA en SSF usando el medio 3X, pero la biomasa aumentó en menor grado (figura 28), se logró una mejora en la producción específica de BEA estadísticamente significativa ( $F = 451.0$ ;  $p < 0.05$ ), por lo que la biomasa generada en SSF usando el medio 3X. Es decir, la biomasa es más eficiente en la producción de BEA que la generada con el medio 1X, y a su vez la biomasa generada en SSF es mucho más eficiente en producir BEA que la generada en SmF (figura 29). El aumento en la producción de metabolitos en SSF ya se ha observado por diversos autores (Gonçalves *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2013), quienes encuentran que SSF es muy superior a SmF en cuanto a la producción de diferentes compuestos de alto valor agregado. Por otro lado, Baños *et al.* (2009), además de incrementar 30 veces la producción de lovastatina en SSF, también reportan 15 veces más la producción específica de BEA en la biomasa producida por SSF. Este fenómeno ha sido atribuido a la

disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, ya que activa las vías de señalización responsables de la producción de diferentes metabolitos, dichas vías de señalización son activadas por la presencia de ROS, que incrementan a en el SSF (Song *et al.*, 2018). Además, se ha observado que concentraciones altas de ROS en el cultivo modifican el perfil de producción de los metabolitos de un microorganismo (Barrios-González *et al.*, 2022; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017).

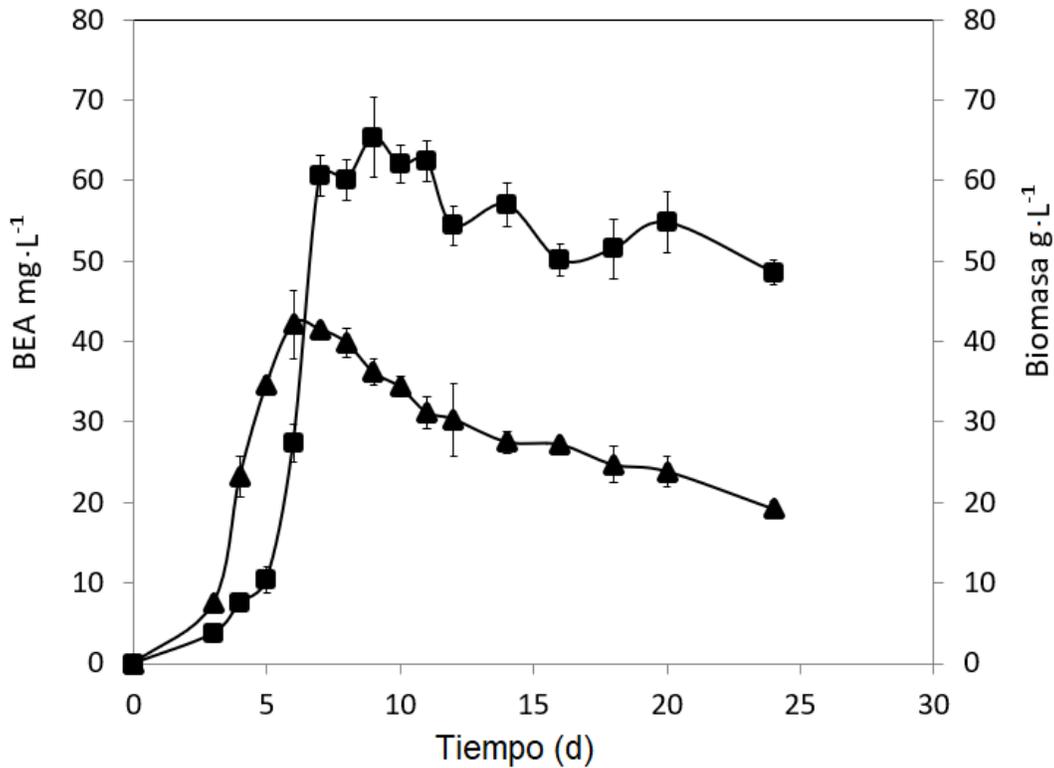


**Figura 29.** Comparación en la producción de BEA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de *F. oxysporum* AB2 a los 9 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo simple (1X) y concentrado (3X), en SSF y SmF.

### 8.9 Cinética de producción de BEA

Para conocer el tiempo de cultivo donde se alcanza el máximo de producción de BEA se realizó una cinética de producción, utilizando SSF y el medio concentrado 3X. En la cinética (figura 30) se observa que el máximo de producción de BEA se alcanza en el día 7 de cultivo, permanece estable durante 5 días hasta el día 11 de cultivo, sin que exista una disminución significativa en la concentración de la BEA como ocurre en la mayoría de los metabolitos secundarios y enzimas producidas en SSF (Abdeljalil *et al.*, 2014; Baños *et al.*, 2009; Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2018).

En esos casos, una vez alcanzado el máximo de producción a los pocos días u horas la concentración del metabolito o la actividad enzimática de interés disminuyen significativamente. Esta producción sostenida de BEA o su estabilidad observada no se ha reportado en ningún otro sistema de cultivo, ni en infecciones *in vivo* de hongos productores de BEA, como reporta Jiang *et al.*, (2013), donde en un modelo de infección *in vivo* *B. bassiana* infecta a *Bombryx batrycatus*, la concentración más alta de BEA ( $43.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se alcanza en el día diez de la infección y en el día doce ha disminuido alrededor del 50% ( $21.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Por otro lado, uno de los principales resultados de nuestro trabajo fue la reducción en los tiempos de producción de BEA, ya que en este sistema se alcanza al día 7 de cultivo por debajo de otros trabajos que han requerido hasta 30 días de cultivo (Liuzzi *et al.*, 2017; Meca *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2008). Aunque la producción de BEA alcanzada en nuestro trabajo es fácilmente superada por otros autores (Logrieco *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2008), esto se debe principalmente a la cepa que utilizan, debido a lo anterior una comparación en la producción de BEA entre nuestro estudio y otros trabajos no sería válida, sin embargo, nuestro sistema de cultivo puede ser aplicado utilizando cepas sobre productoras de BEA, aumentando aun más su producción.



**Figura 30.** Cinética de producción de beauvericina (BEA, mg·L<sup>-1</sup>) (■) y biomasa (g·L<sup>-1</sup>) (▲) de *F. oxysporum* AB2 en SSF usando el medio concentrado (3X).

### 8.10 Actividad de agua ( $a_w$ )

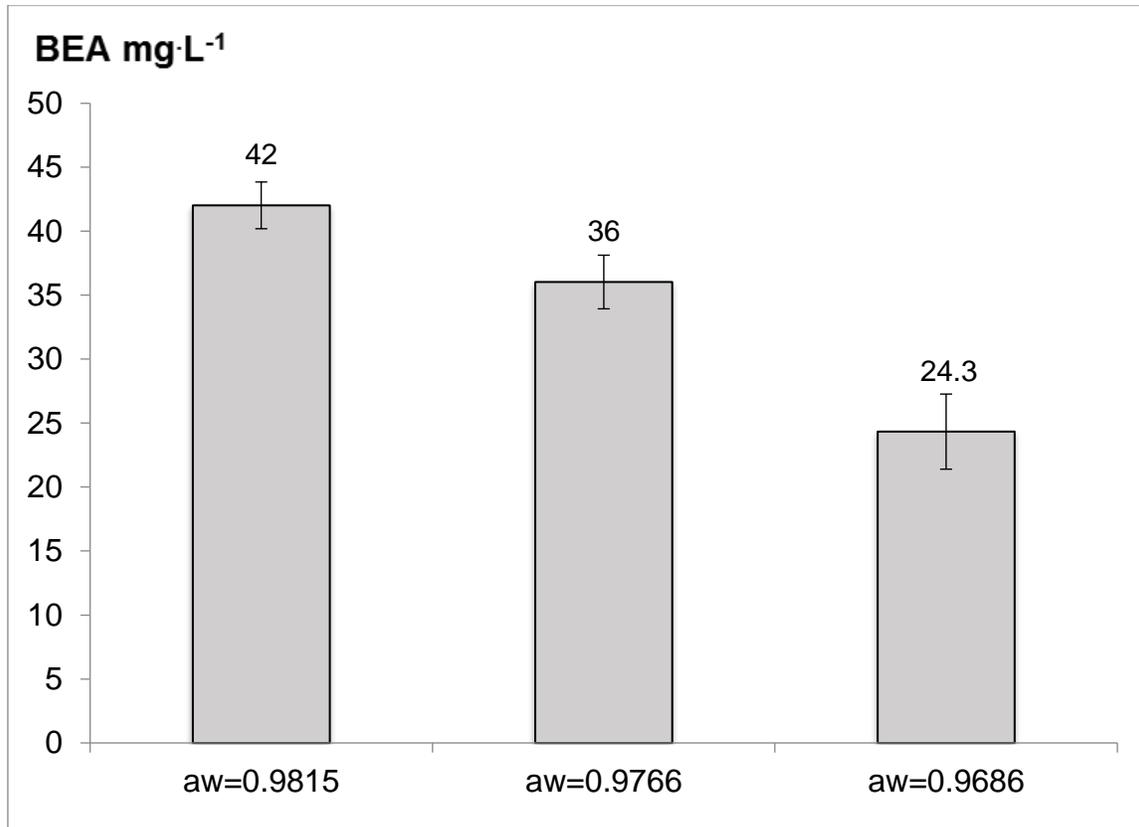
Otra de las estrategias utilizada para incrementar la producción de metabolitos secundarios, como la BEA, es la modificación de la  $a_w$  en un cultivo especialmente cuando ésta se disminuye (Carboue *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2017; Ruijter *et al.*, 2004). Por esto se realizaron los cultivos SSF bajando la  $a_w$  para determinar si incrementa la producción de BEA, para ello se le agregaron diferentes concentraciones de etilenglicol al medio líquido; sin embargo, al agregar concentraciones por arriba del 3% de etilenglicol la  $a_w$  dejó de disminuir (tabla 11), por lo que esta concentración fue la más alta utilizada en los cultivos.

**Tabla 11.** Valores de actividad de agua ( $a_w$ ) para el medio optimizado, el medio concentrado 3X y el medio concentrado 3X más diferentes concentraciones de etilenglicol (EG).

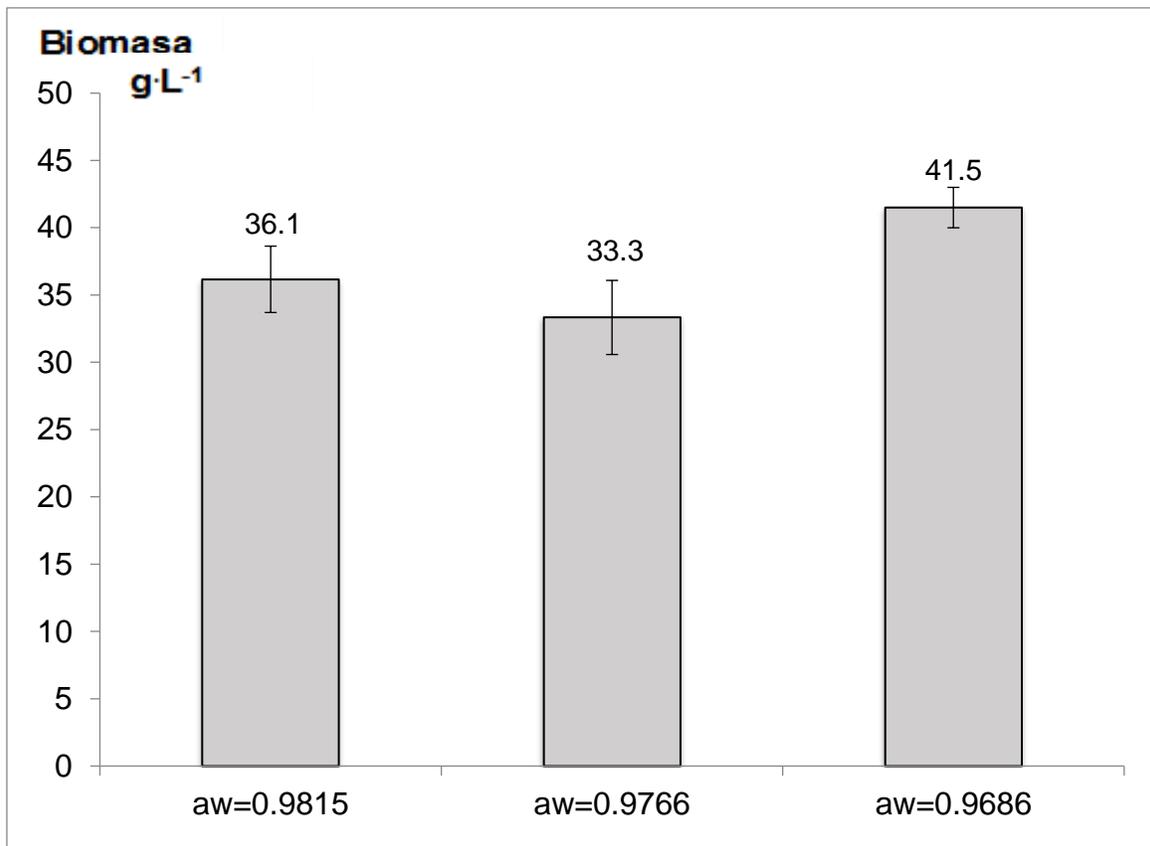
Medio	Promedio
H <sub>2</sub> O	1.0055±0.0089
Medio 1X	0.9991±0.0026
Medio 3X	0.9815±0.0013
Medio 3X+1% EG	0.9766±0.0008
Medio 3X+3% EG	0.9653±0.0061
Medio 3X+5% EG	0.9644±0.0016

Al realizarse el análisis de producción de BEA en los SSF con menores valores de  $a_w$  se observa que la producción disminuyó significativamente (figura 31) . Esto puede deberse a la activación o regularización de alguna vía de señalización que modifica la producción de BEA, contrario a lo propuesto por diferentes autores (Carboue *et al.*, 2020; Montiel-González *et al.*, 2004; Ruijter *et al.*, 2004); quienes consideran a las ROS producidas por la baja  $a_w$  como importantes para activar diferentes vías de señalización que derivan en un aumento en la producción de metabolitos y enzimas. Por un lado, se ha considerado que para algunos microorganismos una  $a_w$  baja asemeja las condiciones que el hongo puede encontrar en la naturaleza (Medina *et al.*, 2017), relacionado con un aumento en la producción de metabolitos. Por otro lado, no hay estudios reportados que discutan la modificación en la producción de metabolitos en *F. oxysporum* al disminuir la  $a_w$ , es decir, no es posible comparar el comportamiento en la producción de BEA con otros estudios; sin embargo, es claro que no está ligado a un efecto tóxico, ya que no hubo un cambio significativo en la producción de biomasa con el control (figura

32). Por lo tanto la disminución de  $a_w$  o estrés osmóticos tuvo un efecto negativo en la producción de BEA.



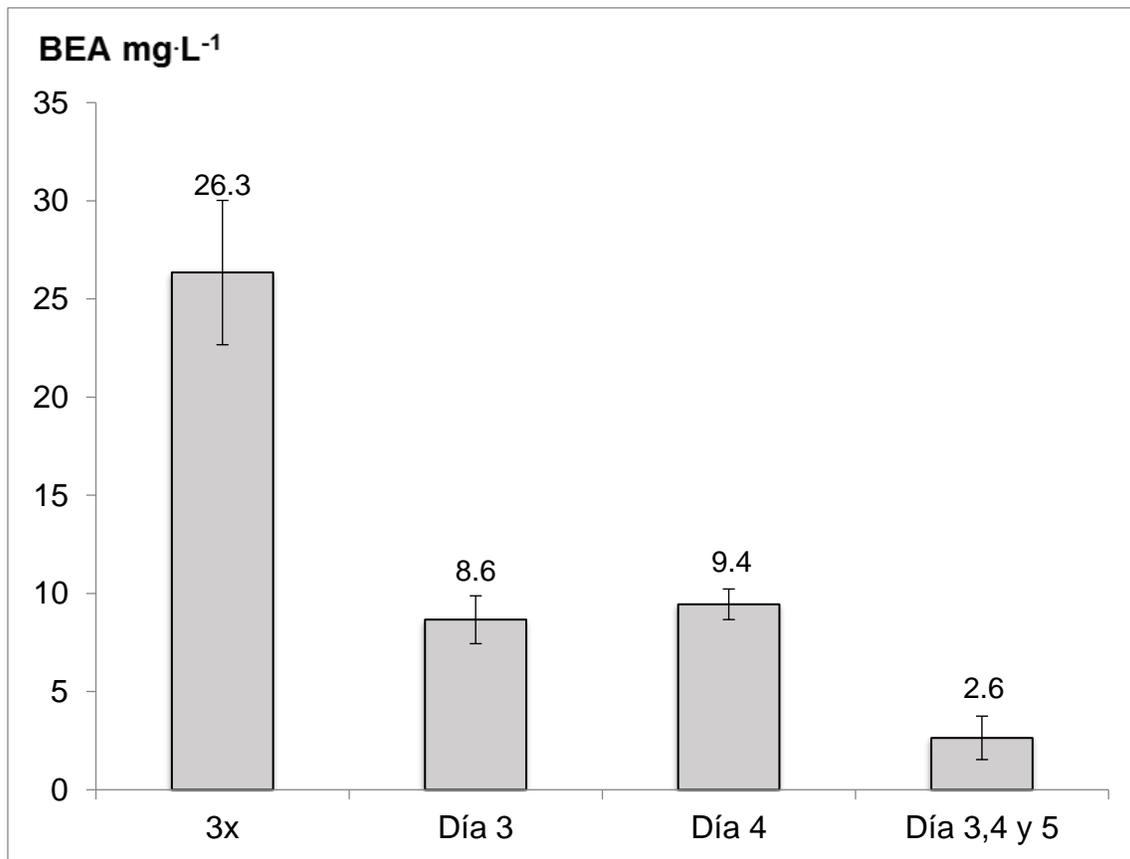
**Figura 31.** Comparación en la producción de BEA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, en SSF utilizando el medio de cultivo 3X ( $a_w=0.9815$ ), 3X+1% de EG ( $a_w=0.976$ ) y 3X+3% de EG ( $a_w=0.9686$ ) en SSF.



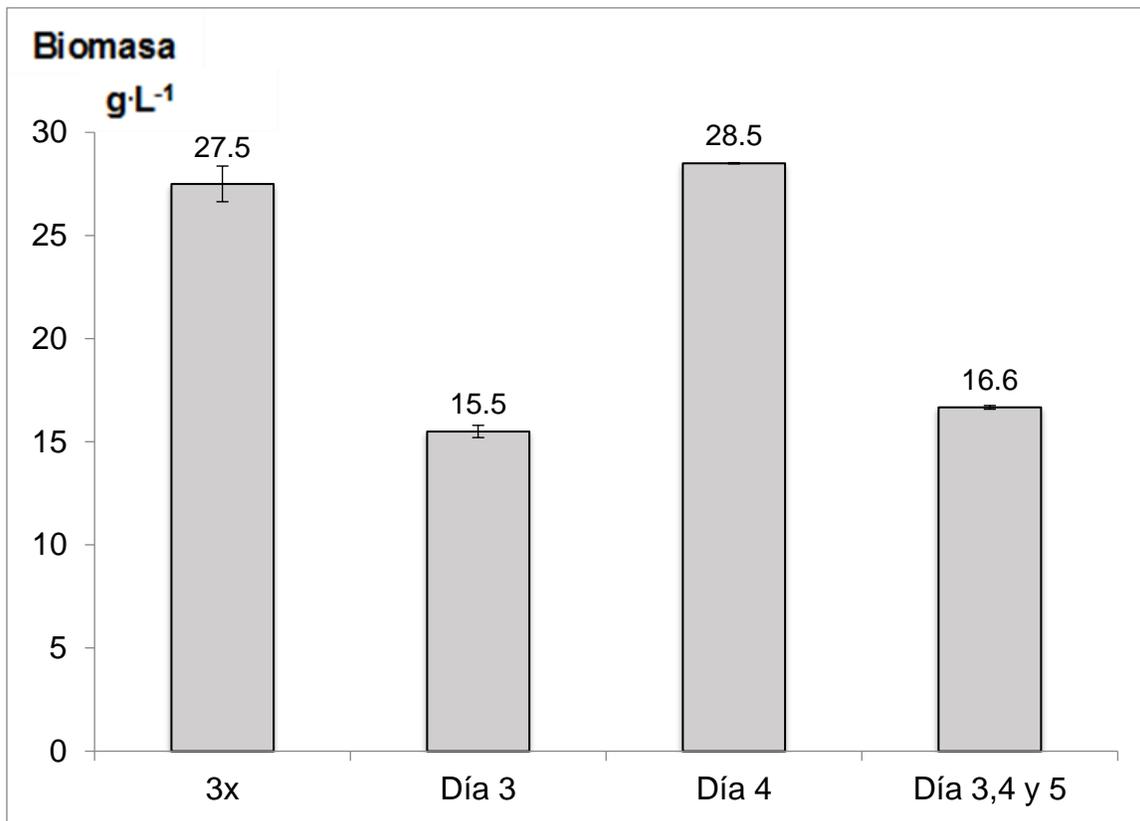
**Figura 32.** Comparación en la producción de biomasa (g·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, utilizando el medio de cultivo 3X ( $a_w=0.9815$ ), 3X+1% de EG ( $a_w=0.976$ ) y 3X+3% de EG ( $a_w=0.9686$ ) en SSF.

### 8.11 Pulsos oxidantes

Aunque se ha observado un aumento en la producción de biomasa y metabolitos secundarios al aumentar la concentración de oxígeno en la atmósfera del cultivo (García-Ortiz *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018), la producción de BEA disminuyó significativamente (figura 33) respecto al control (3X) conforme incrementa la concentración de oxígeno al 26% en todos los cultivos, independientemente del día de cultivo donde se aplicó el pulso oxidante, mientras que la producción de biomasa disminuyó en todos los cultivos donde se modificó la concentración de oxígeno, excepto en los cultivos donde el pulso oxidante fue aplicado en el día 4 de cultivo (figura 34).



**Figura 33.** Comparación en la producción de BEA (mg·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, en SSF modificando la atmósfera del cultivo a 26% de oxígeno a diferentes tiempos de cultivo.

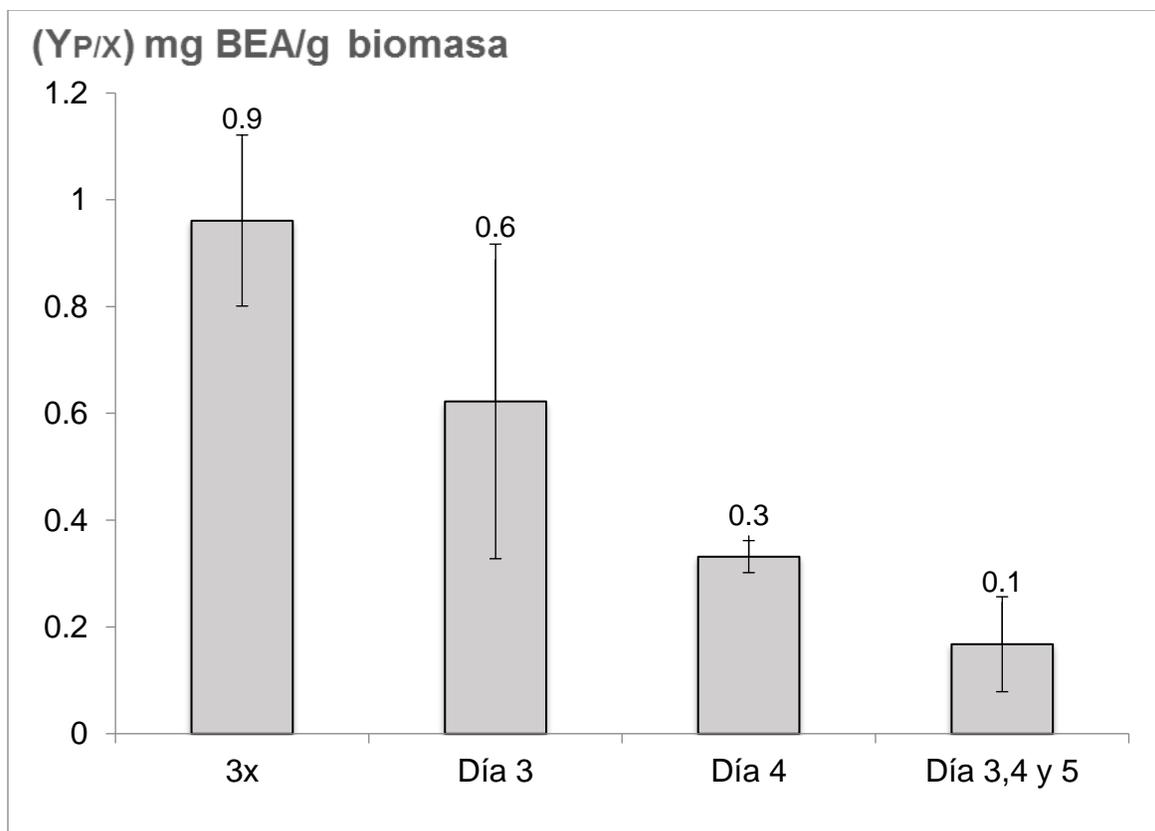


**Figura 34.** Comparación en la producción de biomasa (g·L<sup>-1</sup>) de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, en SSF modificando la atmosfera del cultivo a 26% de oxígeno a diferentes tiempos de cultivo.

Los resultados muestran que disminuye significativamente tanto de biomasa como de BEA, en los cultivos donde se aplicó el pulso oxidante en el día 3 y en los cultivos donde este se aplicó en los días 3, 4 y 5.

Esto podría relacionarse con que en el día 3 de cultivo *F. oxysporum* AB2 se encuentra en una fase de crecimiento exponencial, con una demanda de oxígeno alta, al aplicar el pulso oxidante y cambiar el tapón de algodón por el de hule, el oxígeno ingresado se agota rápidamente y *F. oxysporum* AB2 no oxida la fuente de carbono, bajando la velocidad del metabolismo. Esto se sugiere porque, en el cultivo de donde el pulso oxidante se aplicó durante los días 3, 4 y 5, la cantidad de biomasa y BEA no aumentan lo que puede indicar que *F. oxysporum* AB2 muere en el día 3 por falta de oxígeno y por el aumento en la concentración de CO<sub>2</sub>, ya que el tapón de hule evita el intercambio gaseoso. Por otro lado, se observa que la producción de biomasa de los cultivos donde el pulso oxidante se aplicó en el día 4 no hay

diferencia estadística con la producción de biomasa del control (3X), lo que indica que la máxima producción de biomasa se alcanza en el día 4 de cultivo, sin embargo, el tiempo de máxima producción de BEA se alcanza hasta el día 7 (figura 30), es decir, *F. oxysporum* AB2 muere al colocar el tapón de hule en el día 5 y la producción de BEA se detiene en ese momento, que se relaciona con diferentes estudios (Baños *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2019) que mencionan que la producción de metabolitos secundarios inicia o aumenta drásticamente cuando el microorganismo se desarrolla completamente, o alcanza el máximo de biomasa, es decir en la idiofase. Finalmente debido a que los cultivos donde el pulso oxidante se aplicó en el día 4 de cultivo no tienen diferencia significativa en la producción de biomasa, pero sí en la producción de BEA indica que hay una fuerte disminución en la producción específica de BEA en la biomasa producida en este cultivo (figura 35).



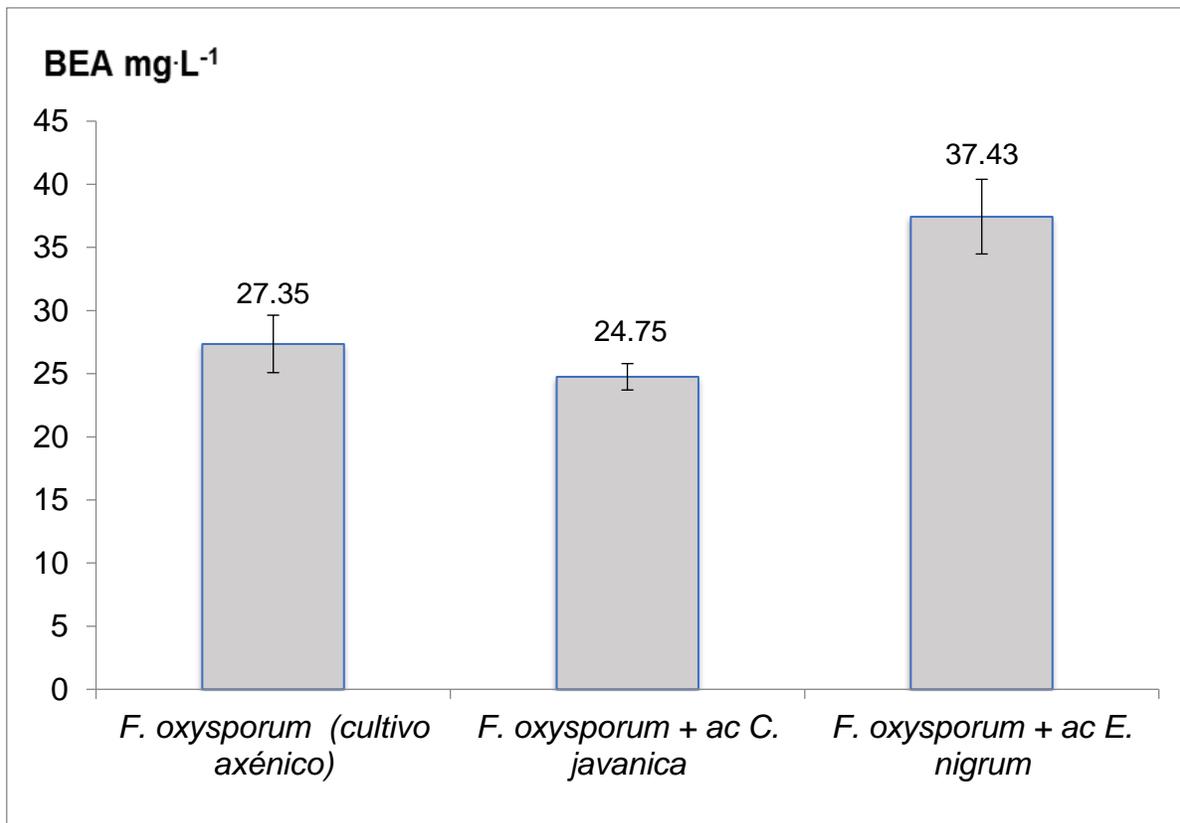
**Figura 35.** Comparación en la producción específica de BEA de biomasa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, en SSF modificando la atmósfera del cultivo a 26% de oxígeno a diferentes tiempos de cultivo.

### 8.12 Cultivos mixtos

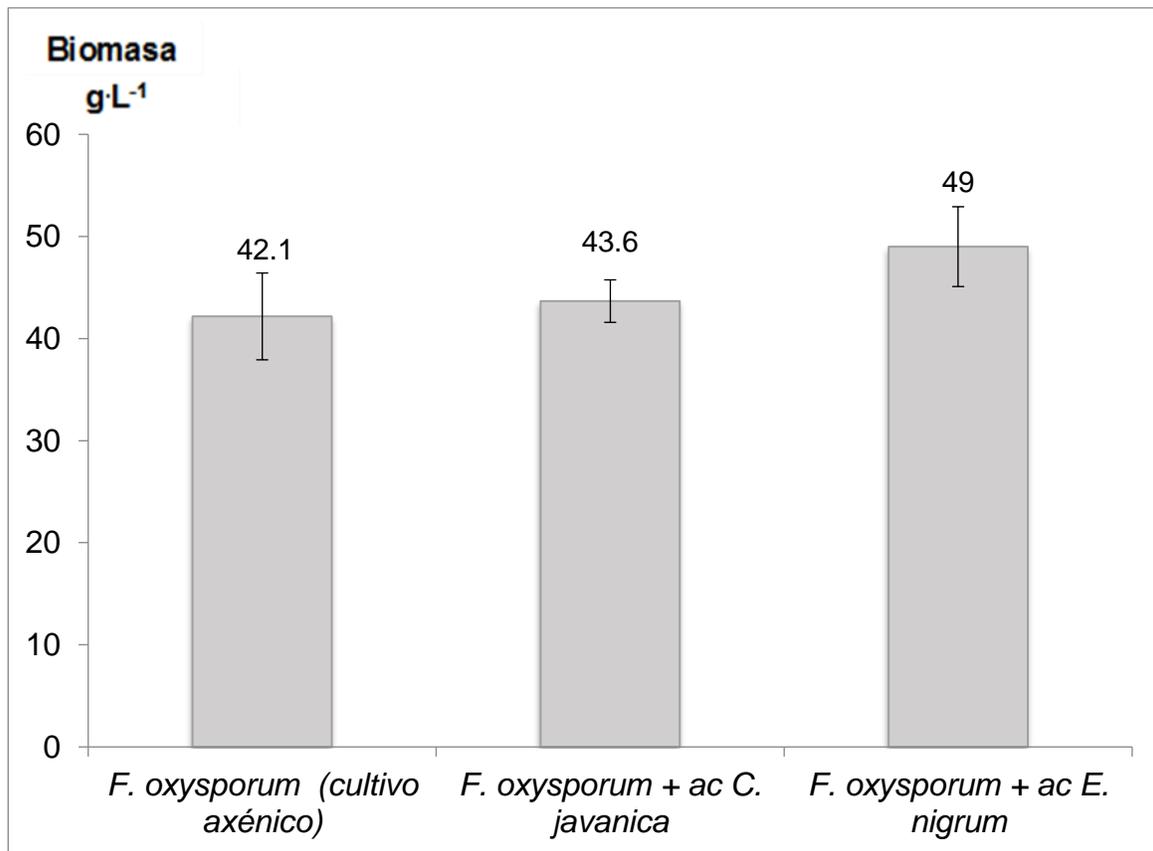
Se ha observado un aumento en la producción de metabolitos secundarios al realizar cultivos mixtos ya sea usando dos microorganismos viables (Chagas *et al.*, 2013), o uno viable y otro no (autoclaveado (ac) (Ancheeva *et al.*, 2017). Estos estudios fueron la base para realizar cultivos mixtos para determinar el efecto en la producción de BEA. Primero se determinó qué microorganismo se agregaría a los cultivos de *F. oxysporum* AB2 para formar el cultivo mixto, probando con cultivos mixtos con restos celulares de *E. nigrum* TORT, y por el otro lado, restos celulares de *C. javanica* CHE-CNRCB 303.

Fue importante encontrar que la mayor producción de BEA se obtuvo en los cultivos con restos celulares de *E. nigrum* TORT (figura 36) ( $p < 0.05$ ),  $37.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  que en comparación al control que produjo  $27.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  representa un incremento del 36.9%, además no hubo un cambio significativo en la producción de biomasa entre los cultivos mixtos y el control (figura 37), lo que indica que en el cultivo con restos celulares de *E. nigrum* TORT se está activando una vía de señalización en *F. oxysporum* AB2 que promueve la producción de BEA.

La activación de vías de señalización en cultivos mixtos ya ha sido reportada (Bertrand *et al.*, 2014; Brakhage & Schroeckh, 2011; Chen *et al.*, 2015), también se ha reportado a *F. oxysporum* junto a *E. nigrum* infectando un mismo hospedero, derivando en un aumento en la producción de metabolitos secundarios en ambos hongos (Lorenzini & Zapparoli, 2015), debido a lo anterior *E. nigrum* TORT fue seleccionado para realizar los cultivos mixtos.

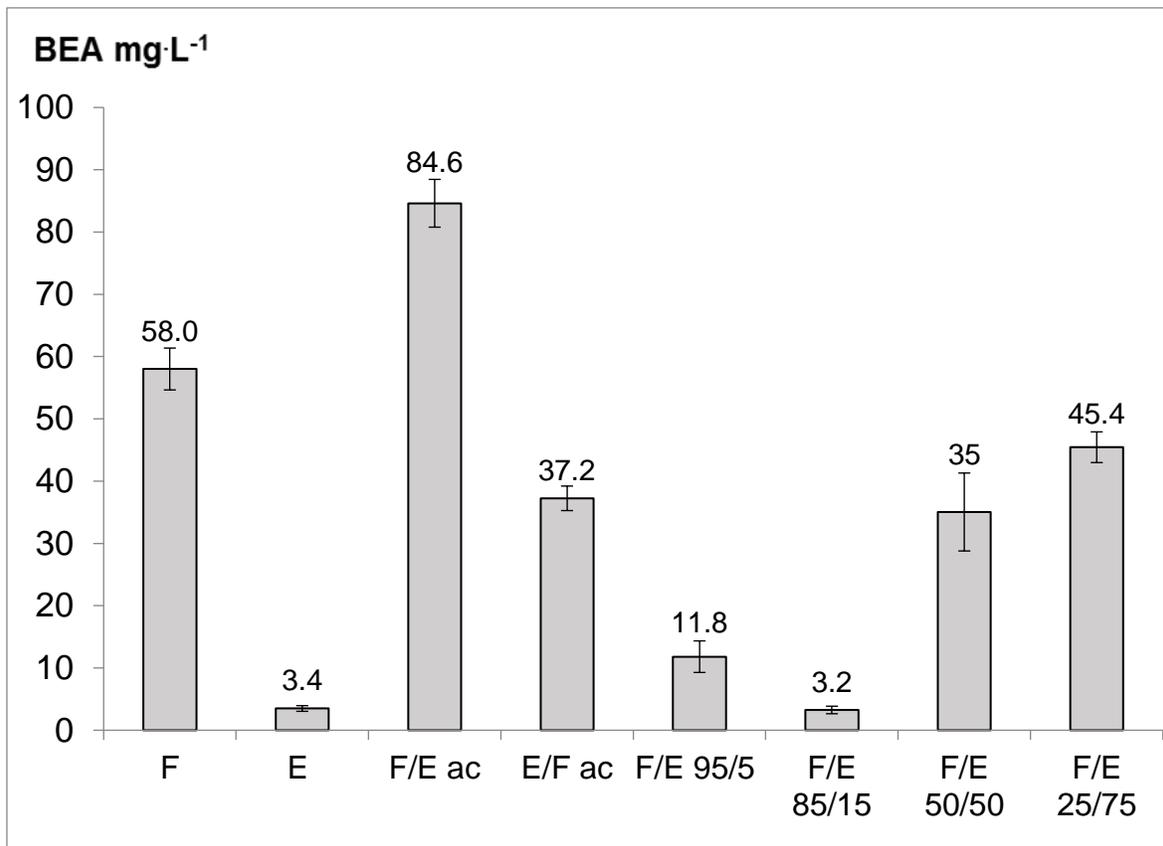


**Figura 36.** Comparación en la producción de BEA (mg·L<sup>-1</sup>) a los 7 días de cultivo de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, en SSF usando el medio 3X en cultivo axénico (control) y cultivos mixtos usando *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y *E. nigrum* autoclaveados.



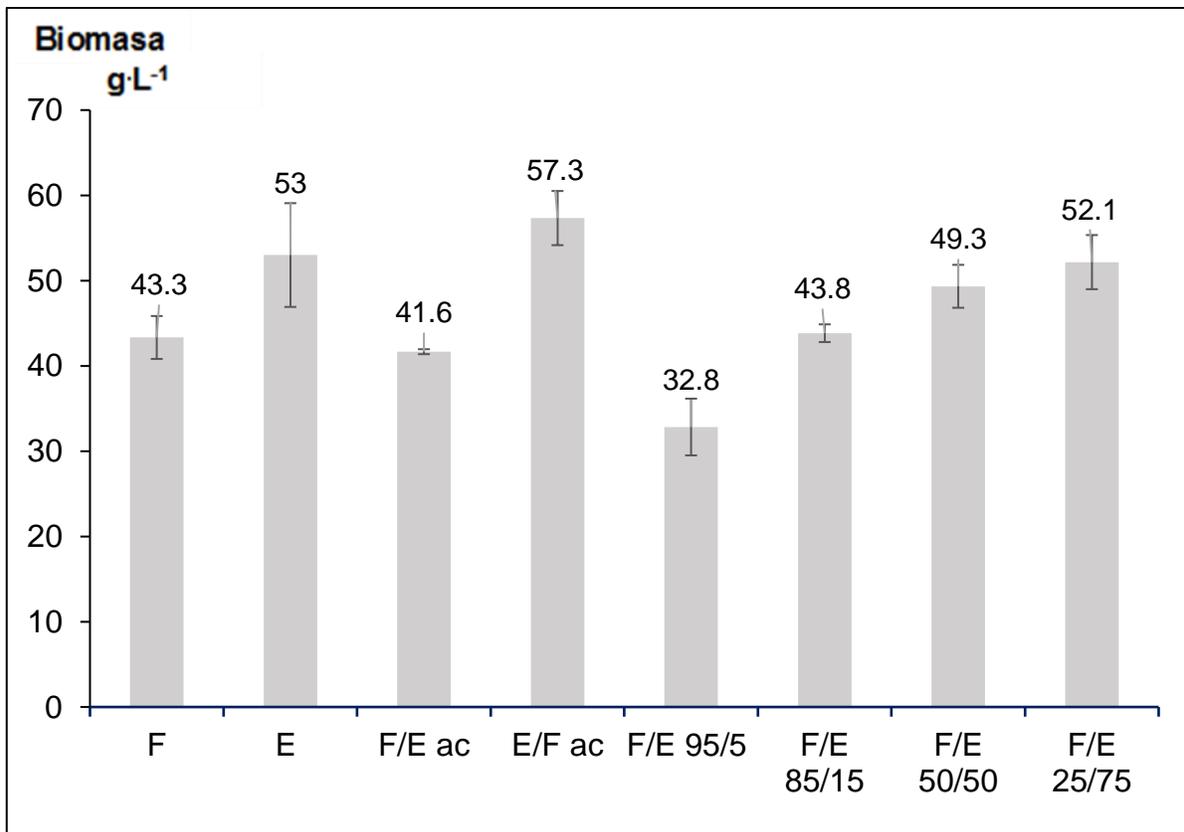
**Figura 37.** Comparación en la producción de biomasa (g·L<sup>-1</sup>) a los 7 días de cultivo de *F. oxysporum* AB2 a los 7 días de cultivo, en SSF usando el medio 3X en cultivo axénico (control) y cultivos mixtos usando *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y *E. nigrum* TORT autoclaveados.

Fue interesante que los cultivos mixtos donde *F. oxysporum* AB2 y *E. nigrum* TORT se encontraban viables mostraron una producción de BEA menor a la del control (cultivo axénico de *F. oxysporum* AB2). Por otro lado, el cultivo de *F. oxysporum* AB2 con 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares de *E. nigrum* TORT fue el único cultivo que superó la producción de BEA del control, llegando a 84.6 mg de BEA por litro de medio de cultivo, es decir, 45.8% más que el cultivo control (p>0.05) (figura 38). La mejora obtenida del 45.8% en la producción de BEA, supera el aumento que han alcanzado otros estudios respecto a su cultivo control, por ejemplo, Xu *et al.*, (2011) que optimizando un medio de cultivo consiguen un aumento en la producción de BEA del 23.7% respecto a su cultivo control, del mismo modo, Xu *et al.*, (2010) consiguen solo un aumento en la producción de BEA de tan solo el 18.04% respecto a su grupo control.

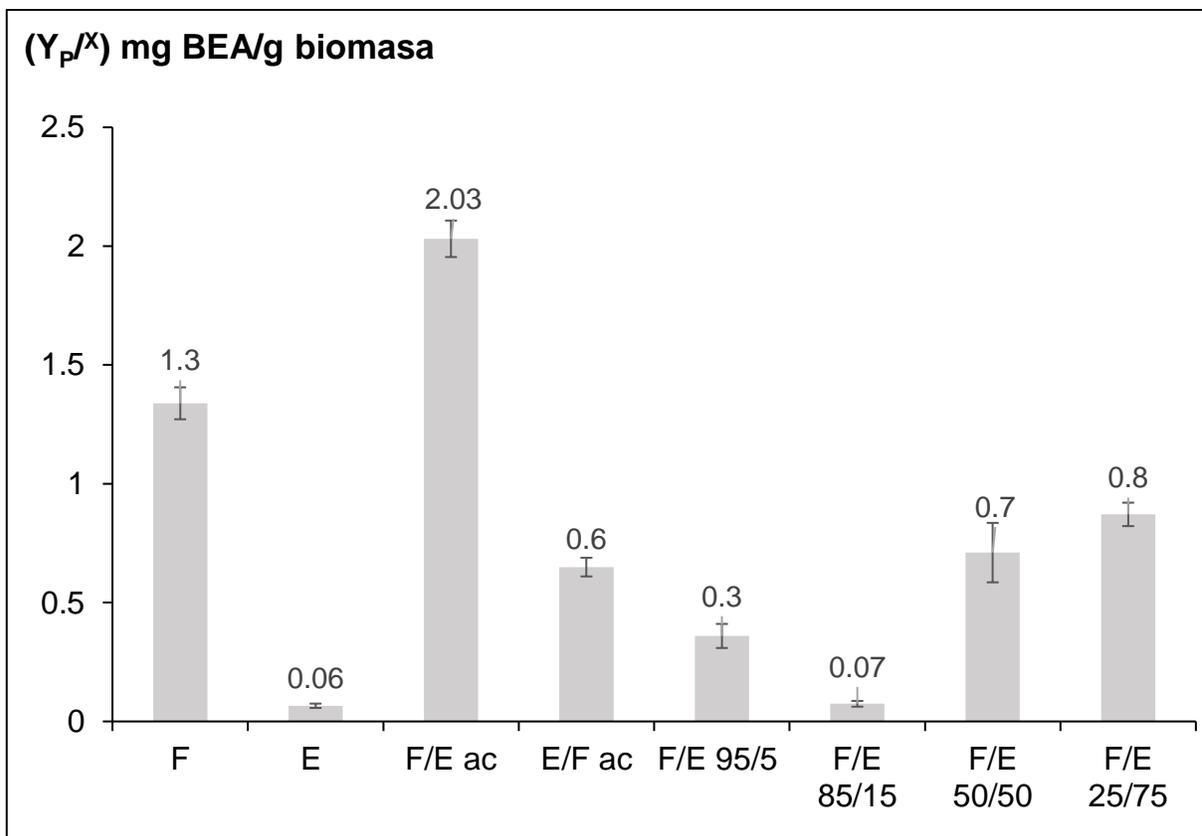


**Figura 37.** Producción de BEA en mg·L<sup>-1</sup> a los 7 días de cultivo en co-cultivos bajo SSF usando el medio de cultivo concentrado 3X; F: *Fusarium oxysporum* AB2; E: *Epicoccum nigrum* TORT; F/E ac: *Fusarium oxysporum* AB2 más restos celulares autoclaveados de *Epicoccum nigrum* TORT; E/F ac: *Epicoccum nigrum* TORT más restos celulares autoclaveados de *Fusarium oxysporum* AB2; F/E 95/5: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 95/5; F/E 85/15: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 85/15; F/E 50/50: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 50/50; F/E 25/75: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 25/75.

Por otra parte, en la producción de biomasa (figura 39) solamente el cultivo de *E. nigrum* TORT con 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares de *F. oxysporum* AB2 superó la biomasa producida por el control (cultivo axénico de *F. oxysporum* AB2), en el resto de los cultivos mixtos la biomasa era igual o menor. Debido a que en el cultivo de *F. oxysporum* AB2 con 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares de *E. nigrum* TORT no aumentó la producción de biomasa, respecto al control, pero sí de BEA, existe un aumento en la producción específica de BEA en este cultivo, como se observa en la figura 40.



**Figura 39.** Producción de biomasa en g·L<sup>-1</sup> a los 7 días de cultivo en co-cultivos bajo SSF usando el medio de cultivo concentrado 3X; F: *Fusarium oxysporum* AB2; E: *Epicoccum nigrum* TORT; F/E ac: *Fusarium oxysporum* AB2 más restos celulares autoclaveados de *Epicoccum nigrum* TORT; E/F ac: *Epicoccum nigrum* TORT más restos celulares autoclaveados de *Fusarium oxysporum* AB2; F/E 95/5: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 95/5; F/E 85/15: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 85/15; F/E 50/50: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 50/50; F/E 25/75: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 25/75.

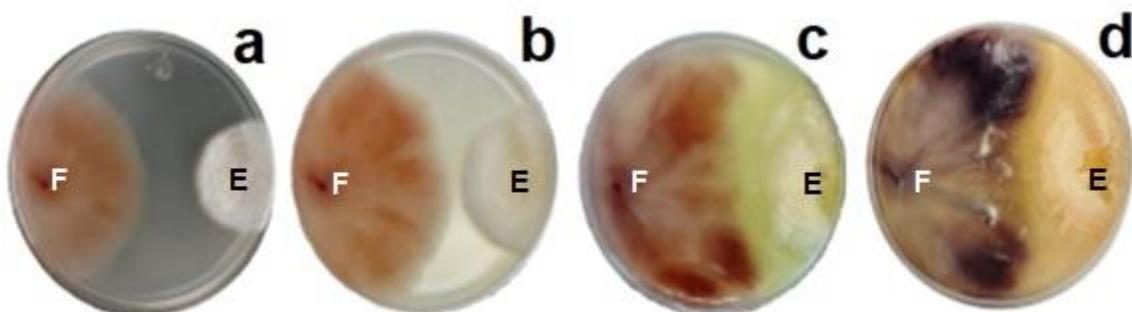


**Figura 40.** Producción específica (Y<sub>p</sub>/X) mg BEA/g biomasa a los 7 días de cultivo en co-cultivos bajo SSF usando el medio de cultivo concentrado 3X; F: *Fusarium oxysporum* AB2; E: *Epicoccum nigrum* TORT; F/E ac: *Fusarium oxysporum* AB2 más restos celulares autoclaveados de *Epicoccum nigrum* TORT; E/F ac: *Epicoccum nigrum* TORT más restos celulares autoclaveados de *Fusarium oxysporum* AB2; F/E 95/5: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 95/5; F/E 85/15: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 85/15; F/E 50/50: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 50/50; F/E 25/75: *Fusarium oxysporum* AB2 y *Epicoccum nigrum* TORT fueron inoculados en una proporción de 25/75.

El aumento considerable en la producción de BEA, en los cultivos de *F. oxysporum* con 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares autoclaveados de *E. nigrum* TORT, se atribuye a que los restos celulares activan la vía de señalización responsable de la producción de BEA; de hecho, se lleva a cabo el contacto de *F. oxysporum* AB2 con algún componente de *E. nigrum* TORT. Lo mismo ocurre con los cultivos de *E. nigrum* con 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares autoclaveados de *F. oxysporum* AB2, ya que la presencia de restos celulares aumenta la producción de BEA respecto a los cultivos axénicos de *E. nigrum* TORT, aunque es menor que la producida por *F. oxysporum* AB2 debido a la diferencia en la habilidad de estas especies para producir BEA. El mejoramiento en la producción de metabolitos secundarios, así como la producción

de nuevos compuestos usando cultivos con más de un microorganismo viable o usando restos celulares ya han sido reportados (Ancheeva *et al.*, 2017; Bertrand *et al.*, 2014; Chagas *et al.*, 2013), se considera un mecanismo para la activación de genes que permanecen silenciados en los cultivos axénicos.

Por otra parte, todos los cultivos mixtos que contenían ambos hongos viables presentaron una menor producción de BEA, e igual o menor producción de biomasa, lo que sugiere una competición por nutrientes y espacio dentro del cultivo, como se ha descrito entre especies de este género, tanto *in vitro* como *in vivo* (Jensen *et al.*, 2016; Lorenzini & Zapparoli 2015). Esto también se identificó en el ensayo de confortación directa (figura 41), donde *E. nigrum* TORT después de 21 días de cultivo termina por colonizar a *F. oxysporum* AB2, mostrando una clara competencia por espacio. La presencia de restos celulares autoclaveados no representa competición por nutrientes y espacio para el hongo viable, aunque sí contiene moléculas que activan la vía de señalización responsable para la producción de diferentes metabolitos secundarios, como los producidos por una vía no ribosomal que incluyen a la catálisis de la beauvericina sintetasa (Ancheeva *et al.*, 2017; Bertrand *et al.*, 2014; Zobel *et al.*, 2016). El mecanismo de como la presencia de ciertas moléculas de otro microorganismo aumentan la producción de metabolitos secundarios se ha atribuido a la acetilación de histonas que relajan el empaquetamiento del ADN, facilitando así la expresión de genes responsables de la síntesis de metabolitos secundarios (Barrios-González, 2018).



**Figura 41.** Ensayo de competición de F: *F. oxysporum* AB2 (colonia roja a morado) y E: *E. nigrum* TORT (colonia blanca a amarillo) a: 9 días después de la inoculación; b: 12 días después de la inoculación; c: 21 días después de la inoculación; d: 21 días después de la inoculación.

La activación de las vías de señalización puede ser a una respuesta antagónica entre los hongos que conforman el cultivo mixto, común cuando dos microorganismos crecen en espacios confinados, aunque los mecanismos moleculares permanecen sin ser claros (Chagas *et al.*, 2013). Esta respuesta ocurre cuando el micelio de uno de los hongos entra en contacto directo con el micelio del otro, o de forma indirecta cuando un hongo detecta componentes solubles o volátiles de otro (Bertrand *et al.*, 2014). La respuesta persiste aun cuando uno de los hongos se encuentra autoclaveado en el cultivo mixto, puesto que los cultivos con restos celulares incrementan la producción de BEA respecto a los cultivos axénicos.

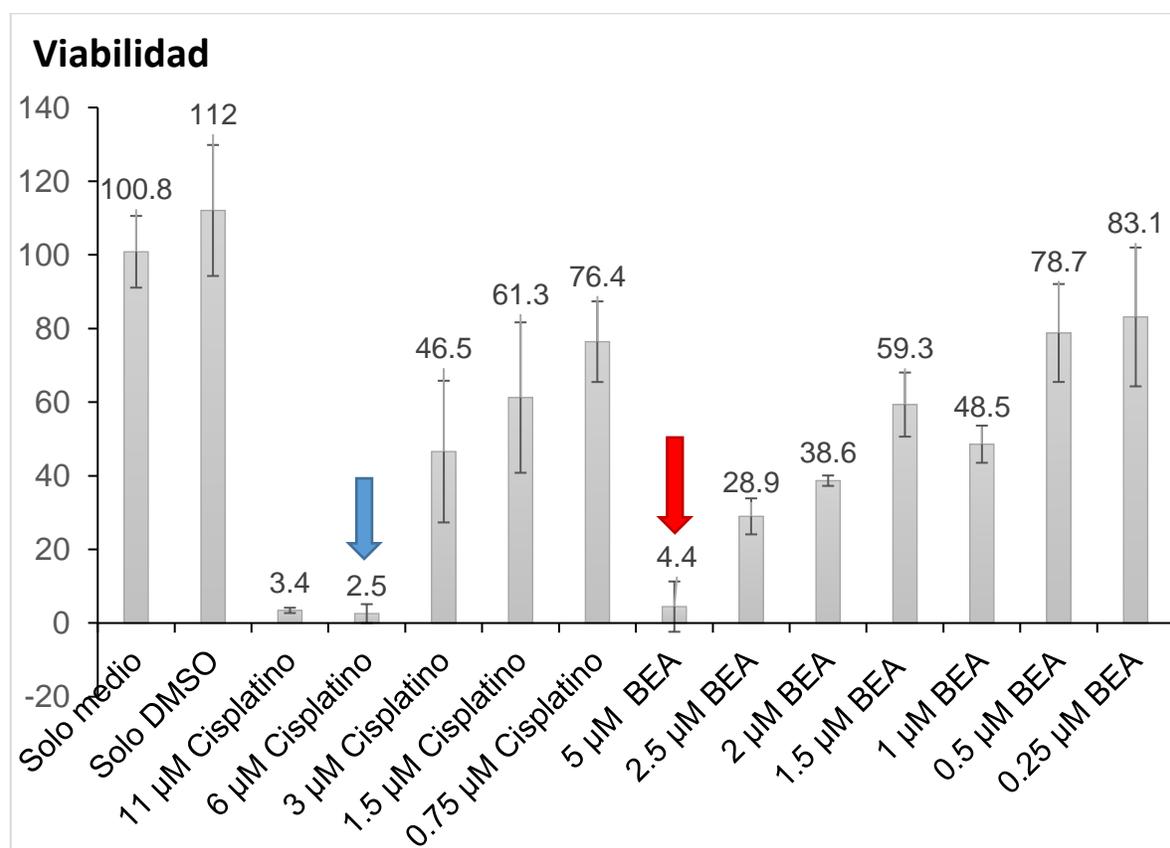
La biomasa generada en los cultivos mixtos es similar a la generada en el control, sin embargo, cuando ambos hongos entran en contacto se observa colonización de *E. nigrum* TORT por encima de *F. oxysporum* AB2 (figura 41). Esto sugiere que los cultivos donde el inóculo de *E. nigrum* TORT es igual o mayor que al de *F. oxysporum* AB2 (50:50 y 25:75 de *F. oxysporum* AB2 y *E. nigrum* TORT respectivamente) la biomasa que predomina es de *E. nigrum* TORT.

En esta sección, se concluye que la producción de BEA en SSF de *F. oxysporum* con 5 g·L<sup>-1</sup> de restos celulares autoclaveados de *E. nigrum* se incrementa de forma importante llegando a 84.6 mg de BEA por litro de medio de cultivo, es decir, 45.8% más que el cultivo control.

### **8.13 Ensayos *in-vitro* con células cancerígenas**

En los últimos años se ha mostrado que la BEA posee un efecto antitumoral, tanto en líneas celulares de cáncer como en modelos *in-vivo* de carcinomas (Heilos *et al.*, 2017; Whang & Xu, 2012). Sin embargo, no se ha determinado si la BEA posee un efecto sinérgico en combinación con antitumorales, como ocurre cuando se le combina con antifúngicos (Zhang *et al.*, 2017). Por lo que resulta importante determinar el efecto de la BEA en combinación con uno de los antitumorales más prescritos como es el cisplatino, específicamente frente a líneas celulares de cáncer de pulmón, donde la BEA ha mostrado su mayor efecto citotóxico.

La CI50 para la línea celular H-1975 de BEA fue de 5  $\mu\text{M}$ , mientras que para el cisplatino fue de 6  $\mu\text{M}$  como se muestra en la figura 42, ya que concentraciones por debajo de está no poseen diferencia significativa entre ellas y la viabilidad celular es superior al 50%. La CI50 de cisplatino determinada en estos ensayos es similar a la reportada por Wang *et al.*, (2015) con cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón utilizando, la H-1975 como la más resistente a cisplatino; no obstante, al combinar el cisplatino con otros antitumorales se muestra un mayor efecto citotóxico no solo en la línea celular H-1975, sino también en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón.

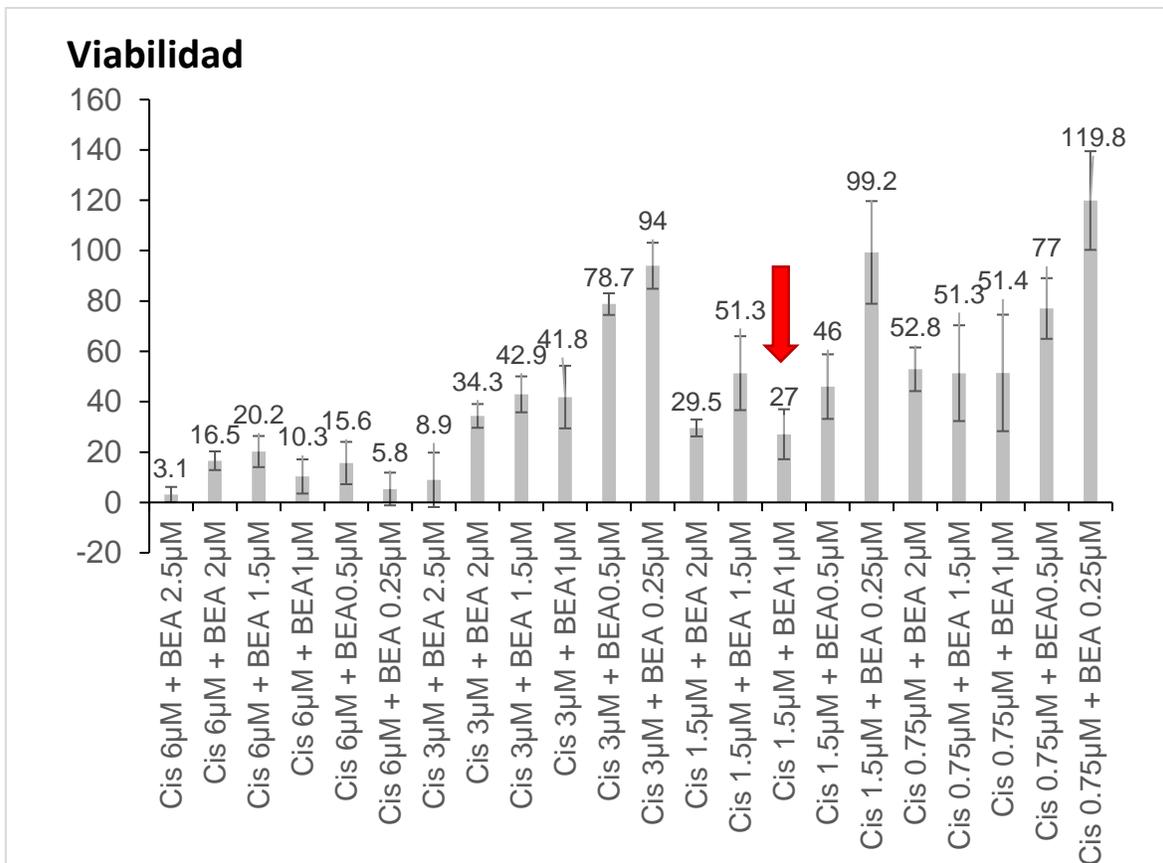


**Figura 42.** Viabilidad celular obtenida por MTT de la línea celular H-1975 para diferentes concentraciones de BEA y cisplatino, señalando en azul la CI50 de cisplatino y en rojo la CI50 de la BEA.

La viabilidad de la línea celular H-1975, frente a las diferentes combinaciones de BEA y cisplatino (figura 43), indica que existe un efecto sinérgico al combinar diferentes concentraciones de estos, pero el mayor efecto sinérgico se observa al

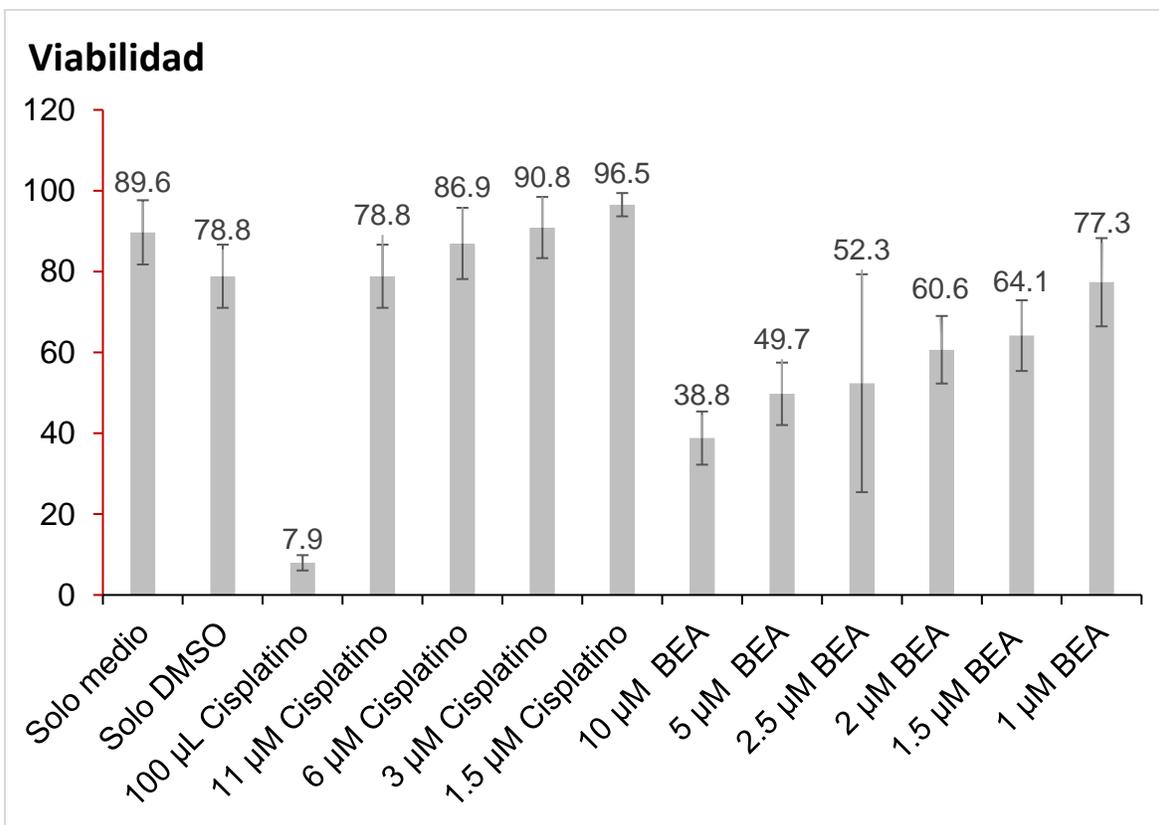
combinar 1.5  $\mu\text{M}$  de cisplatino con 1  $\mu\text{M}$  de BEA, indicando que al combinar una cuarta parte de la CI50 de cisplatino con una quinta parte de la CI50 de BEA se logra una viabilidad celular por debajo del 50%. Estos resultados indican que la BEA disminuyó cuatro veces la concentración de cisplatino necesaria para inhibir el crecimiento de esta línea celular, lo que podría representar una disminución importante en las concentraciones de este fármaco utilizadas en el tratamiento de cáncer de pulmón, derivando en una disminución en los efectos secundarios que ocasiona el cisplatino y en tratamientos menos costosos.

El sinergismo observado en la línea celular H-1975, al combinar cisplatino con BEA, se relaciona con diferentes autores que han mostrado que el cisplatino es el fármaco antitumoral con mayor efecto sinérgico en combinación con productos naturales y metabolitos secundarios cuando se aplica especialmente a líneas celulares de cáncer de pulmón, potencializando diferentes vías que conllevan a la apoptosis de células cancerosas; lo anterior incluye la modificación en la expresión de genes que codifican para proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, liberación del citocromo C, aumento intracelular de calcio y ruptura del ADN (Ku *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2018; Wroblewska *et al.*, 2021).



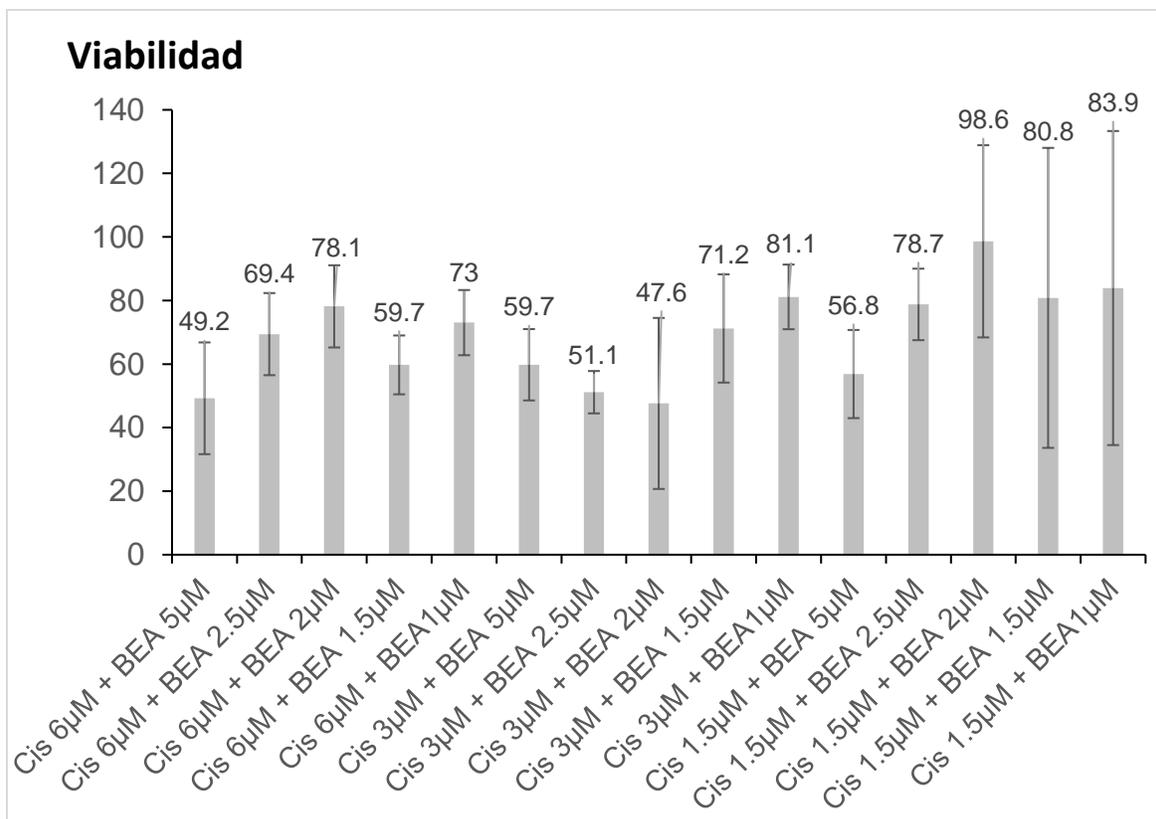
**Figura 43.** Viabilidad celular obtenida por MTT de la línea celular H-1975 para diferentes combinaciones de cisplatino y BEA, señalando en rojo la combinación que tuvo el mayor efecto sinérgico.

Por otro lado, la CI50 para la línea celular H-1299 de BEA también fue de 5 µM, aunque este valor no es preciso, ya que no tiene diferencias estadísticamente significativas con valores de viabilidad obtenidos usando concentraciones de BEA inferiores o superiores a esta concentración, mientras que la CI50 de cisplatino no pudo ser determinada ya que es superior a las concentraciones utilizadas, por lo que se encuentra por encima de 11 µM (figura 44).



**Figura 44.** Viabilidad celular obtenida por MTT de la línea celular H-1299 para diferentes concentraciones de BEA y cisplatino.

Debido a que no se tiene una CI50 para cisplatino ni una CI50 confiable de BEA, no es posible determinar si en esta cepa existe un efecto sinérgico al combinarlos, aun con esta limitación, se realizaron ensayos combinando diferentes concentraciones de cisplatino y BEA (figura 45), donde se observa que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de ninguna de las combinaciones probadas.



**Figura 45.** Viabilidad celular obtenida por MTT de la línea celular H-1299 para diferentes combinaciones de BEA y cisplatino.

La concentración de cisplatino usada en la línea celular H-1299 fue asignada debido a que se encuentra por encima de la CI50 reportada que va entre los 6 y 10 µM (Ku *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Sin embargo, esta no fue alcanzada en los ensayos realizados, probablemente al número de pase de las células, es decir el número de veces que se han dividido a partir del aislado original, lo cual puede causar mutaciones o cambios en la permeabilidad celular (Ku *et al.*, 2020). Esto último es común en diferentes estudios y es la principal causa de resistencia al cisplatino (Ku *et al.*, 2020) Por otro lado, el efecto sinérgico que se ha observado específicamente en esta línea celular es debido a que los metabolitos, o compuestos probados en conjunto con el cisplatino aumentando la sensibilidad y permeabilidad celular, lo que mejora el ingreso de cisplatino a la célula, mas no potencializando una vía de señalización que derive en la apoptosis (Wang *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2011).

Aunque los resultados mostrados con la línea celular H-1975 indican que la BEA posee un efecto sinérgico en combinación con el cisplatino, este efecto debe de ser

colaborado utilizando otra línea celular de cáncer de pulmón, y determinar la citotoxicidad de esta combinación en líneas celular no cancerígenas que ayudan a probar la seguridad de esta combinación, además de otros ensayos que determinen el tipo de muerte celular que se lleva a cabo.

#### **8.14 Efecto antimicrobiano de la beauvericina**

La BEA tiene un amplio espectro antibacteriano, en diferentes especies de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Whang & Xu, 2012), aunque no se ha explorado un posible efecto sinérgico al combinarse con antibióticos, como ocurre cuando se combina con antifúngicos (Zhang *et al.*, 2017); de ser así, la BEA tendría un potencial para el desarrollo de nuevas terapias contra infecciones bacterianas, capaz de atender uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, que es la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (OMS, 2022).

La determinación de la CMI para las tres cepas bacterianas se muestra en la tabla 12. Hubo una marcada diferencia entre las CMI de las cepas de *S. aureus* ya que la cepa resistente (ATCC 43300), además de ser resistencia a oxacilina, también mostró duplicar la CMI de BEA, y ser alrededor de 8400 veces más resistente a la lincomicina en comparación con la cepa no resistente (ATCC 25923). La cepa ATCC 14028 de *S. typhimurium* resultó ser muy sensible a ciprofloxacino, siendo la CMI más baja de todas, de tan solo 2.5 nM; sin embargo, la BEA no tuvo ningún efecto frente a esta cepa capaz de crecer en la concentración más alta probada ( 60  $\mu$ M).

Debido a que la BEA es prácticamente insoluble en agua, los ensayos donde se usaron concentraciones por arriba de 20  $\mu$ M de BEA, ésta precipitaba al ser agregada al medio de cultivo, lo que interfería en la lectura de la placa a 600 nm. Por eso la viabilidad de *S. typhimurium* en concentraciones por arriba de 20  $\mu$ M se

determinó por cultivo en placa, transfiriendo los 100  $\mu$ L del pozo en una caja Petri con agar Mueller Hinton, sembrando en césped e incubando durante 24 horas.

**Tabla 12.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) para las cepas bacterianas utilizadas. N/A: no aplica. -: sin efecto.

Cepa	Beauvericina	Oxacilina	Lincomicina	Ciprofloxacino
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.31 $\mu$ M	0.015 $\mu$ M	0.038 $\mu$ M	N/A
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	0.62 $\mu$ M	0.125 $\mu$ M	320 $\mu$ M	N/A
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	-	N/A	N/A	2.5 nM

Las CMI de BEA para ambas cepas de *S. aureus* son más bajas que las reportadas en diferentes estudios, que van de los 3 a los 32  $\mu$ M, tanto para cepas resistentes como para las no resistentes. Las diferencias en la CMI parecen relacionarse con la cepa de *S. aureus* utilizada, ya que en todos los casos se usan cepas diferentes (Perazzi *et al.*, 2010; Sondergaard *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011). Cabe mencionar que la CMI de BEA para la cepa resistente de *S. aureus* es tan solo el doble que, de la cepa no resistente, a diferencia de la lincomicina cuya CMI para la cepa resistente es mayor de 8000 veces en relación a la cepa no resistente, sugiriendo que los mecanismos de resistencia de la cepa ATCC 43300 no son tan efectivos contra la BEA, como lo son con lincomicina.

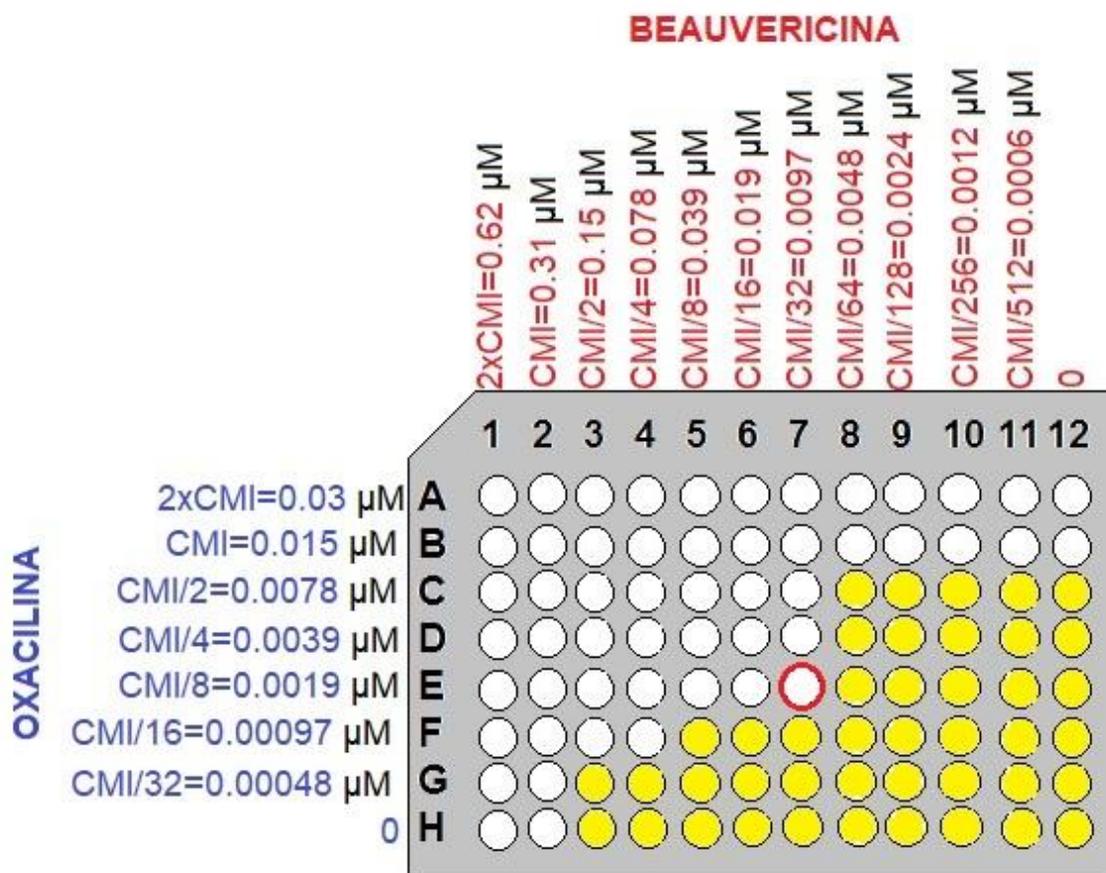
La gran diferencia en la CMI de lincomicina, entre la cepa resistente y la no resistente de *S. aureus*, podría relacionarse a los genes *mec*, especialmente por los genes *mecA* y *mecC*, ya que mínimo un gen de esta familia se encuentra en todas las cepas de *S. aureus* que presentan resistencia a antibióticos. Estos genes codifican para proteínas que se unen a los antibióticos impidiendo su acción, la afinidad de estas proteínas es menor en los betalactámicos. En el caso de la cepa

ATCC 43300, esta posee la secuencia genética *SCCmec* que incluye el gen *mecA* (Giudice *et al.*, 2018; Kriegeskorte *et al.*, 2018; Sanchez *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha descrito como la proteína PBP2A (codificada por el gen *mecA*), otorga resistencia a la lincomicina como se observa en la cepa ATCC 43300 de *S. aureus*.

En el caso de la cepa ATCC 14028 de *S. typhimurium*, la mayoría de los estudios que muestran el efecto antibacteriano de la BEA, no utilizan cepas de *S. typhimurium* (Castlebury *et al.*, 1999; Meca *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Whang & Xu, 2012). Aunque Sondergaard *et al.*, en el 2016 intentaron determinar en cultivo líquido la CMI de BEA para una cepa de *S. typhimurium* sin éxito, ya que fue resistente a la concentración más alta utilizada (256  $\mu\text{M}$ ). Tampoco concentraciones hasta de 200  $\mu\text{M}$  de análogos de BEA tienen efecto en la viabilidad de dos cepas de *S. typhimurium* (Yilmaz, 2014). La resistencia de *S. typhimurium* a la BEA parece relacionarse únicamente a esta especie, ya que Meca *et al.*, (2010) determinaron que la CMI de BEA es de 11 nM para la cepa CECT 554 de *S. enterica*. Los mecanismos de acción de como la BEA posee un efecto antibacteriano son escasos, solo se ha reportado que no interviene con la síntesis de peptidoglucano (Whang & Xu, 2012) por lo que no es posible inferir la interacción entre *S. typhimurium* y BEA, aunque las altas concentraciones de BEA pueden indicar que no existe ningún tipo de interacción.

En cuanto el efecto sinérgico de la BEA, la técnica de tablero mostró que existe un efecto sinérgico marcado al combinar la BEA con la oxacilina en *S. aureus*, tanto en la cepa no resistente (figura 46) como en la cepa resistente (figura 47), en ambos casos el ICIF está por debajo del 0.5. Sin embargo, el valor del ICIF para la cepa de *S. aureus* no resistente es prácticamente la mitad que el de la cepa resistente, es decir, el efecto sinérgico de la BEA en combinación con la oxacilina es mayor en la cepa no resistente. De manera notable, para la cepa resistente de *S. aureus* la mitad de la CMI de BEA fue suficiente para eliminar su resistencia a oxacilina, de hecho, al agregar 0.31  $\mu\text{M}$  de BEA, 0.015  $\mu\text{M}$  de oxacilina fue suficiente para inhibir su crecimiento. Esta última concentración es la CMI de oxacilina para la cepa no resistente de *S. aureus*, aunque en esta cepa el mayor efecto sinérgico se obtiene

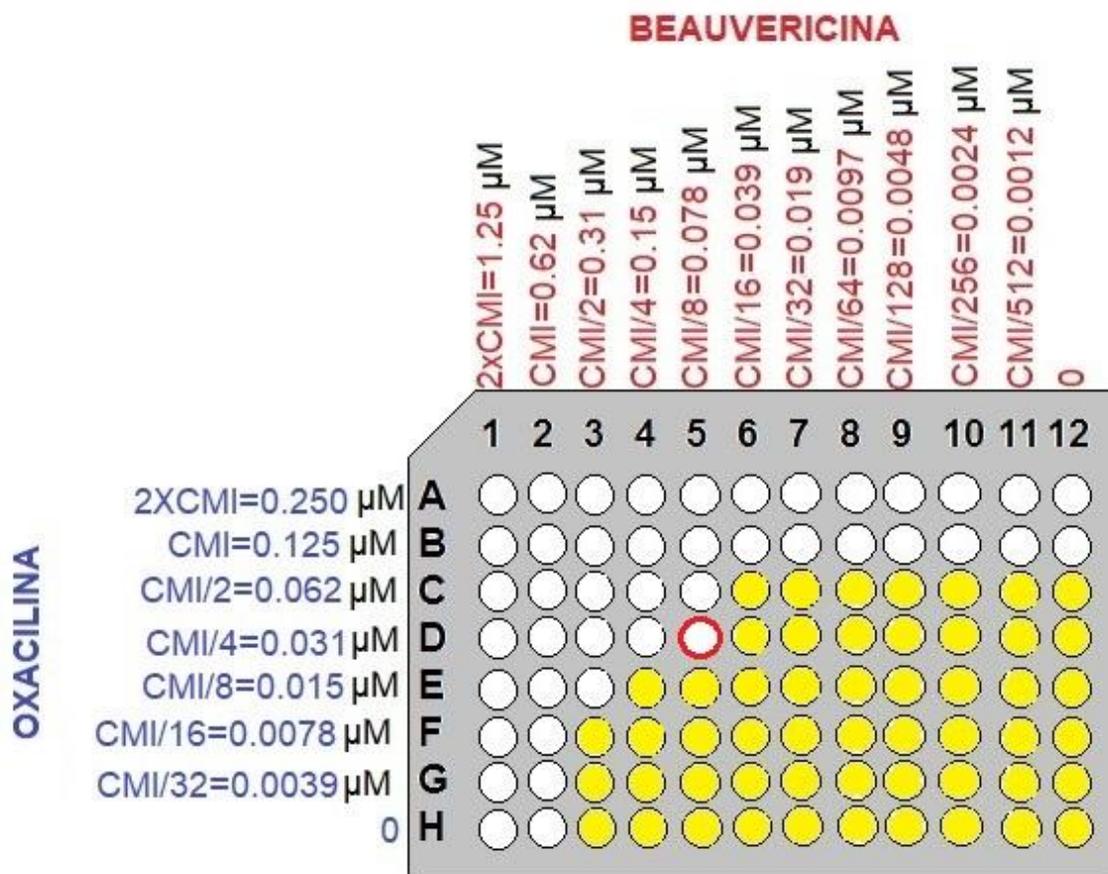
al combinar una cuarta parte de la CMI de oxacilina con una octava parte de la CMI de BEA, esta combinación inhibe el crecimiento de *S. aureus*. Estos resultados indican que la BEA puede ser un excelente agente antibacteriano con un efecto sinérgico, incluso en cepas resistentes, logrando que estas vuelvan a ser sensibles. Este resultado representa un área de oportunidades para la BEA, se proyecta que tratamientos actuales que han perdido efectividad en contra de infecciones bacterianas vuelvan a ser eficaces.



**Figura 46.** Técnica de tablero mostrando el efecto sinérgico de beauvericina y oxacilina sobre *S. aureus* ATCC 25923 (cepa no resistente). Se muestra con amarillo los pozos donde hubo crecimiento bacteriano, en blanco los pozos sin crecimiento bacteriano y se señala con rojo la combinación con el mayor efecto sinérgico.

$$ICIF = CIF \text{ de oxacilina} + CIF \text{ de BEA}$$

$$ICIF = 0.1266 + 0.0312 = 0.1578$$



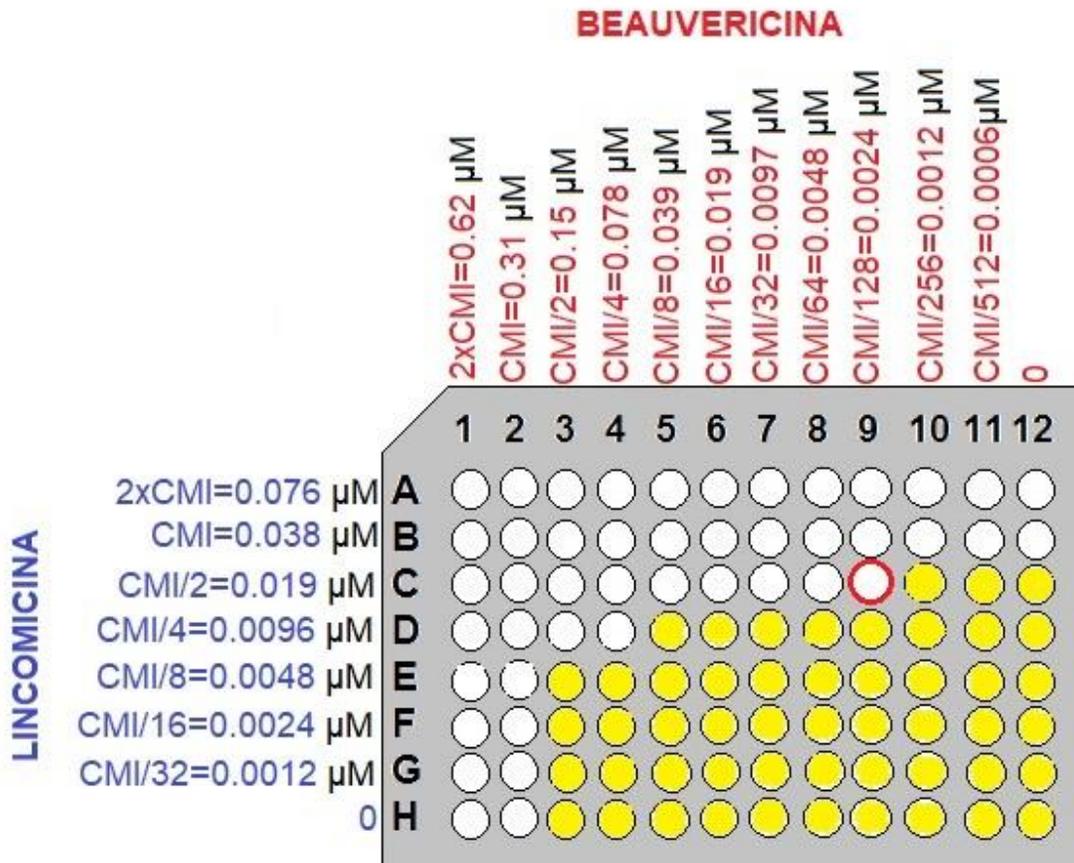
**Figura 47.** Técnica de tablero mostrando el efecto sinérgico de beauvericina y oxacilina sobre *S. aureus* ATCC 43300 (cepa resistente). Se muestra con amarillo los pozos donde hubo crecimiento bacteriano, en blanco los pozos sin crecimiento bacteriano y se señala con rojo la combinación con el mayor efecto sinérgico.

$$ICIF = CIF \text{ de oxacilina} + CIF \text{ de BEA}$$

$$ICIF = 0.248 + 0.125 = 0.373$$

En el caso de la lincomicina y el efecto que posee en combinación con la BEA, la prueba de tablero determinó que el valor de ICIF es el mismo tanto para la cepa no resistente (figura 48) como para la cepa resistente (figura 49) de *S. aureus*. Al estar por arriba de 0.5 se trata de un efecto de adición muy cercano al sinergismo, e indica que este efecto no se afecta por los mecanismos que otorgan resistencia a la cepa ATCC 43300 de *S. aureus*. La única diferencia entre la interacción de la BEA con lincomicina, observado entre ambas cepas de *S. aureus*, es que en la cepa no resistente se requiere una cuarta parte de la CMI tanto de BEA como de lincomicina para inhibir su crecimiento, mientras que para la cepa resistente se requiere una

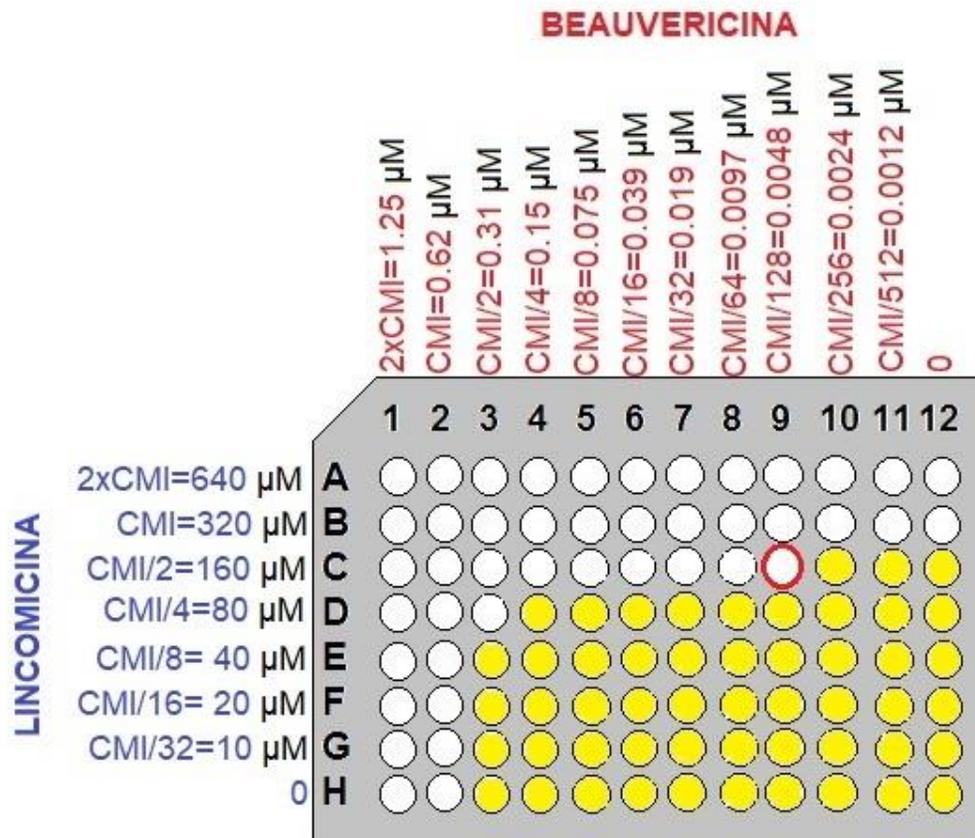
cuarta parte de la CMI de lincomicina en combinación con la mitad de la CMI de BEA para inhibir su crecimiento, no obstante, en ambos casos el pozo C9 es el que representa el ICIF más bajo.



**Figura 48.** Técnica de tablero mostrando el efecto sinérgico de beauvericina y lincomicina sobre *S. aureus* ATCC 25923 (cepa no resistente). Se muestra con amarillo los pozos donde hubo crecimiento bacteriano, en blanco los pozos sin crecimiento bacteriano y se señala con rojo la combinación con el mayor efecto sinérgico.

$$ICIF = CIF \text{ de lincomicina} + CIF \text{ de BEA}$$

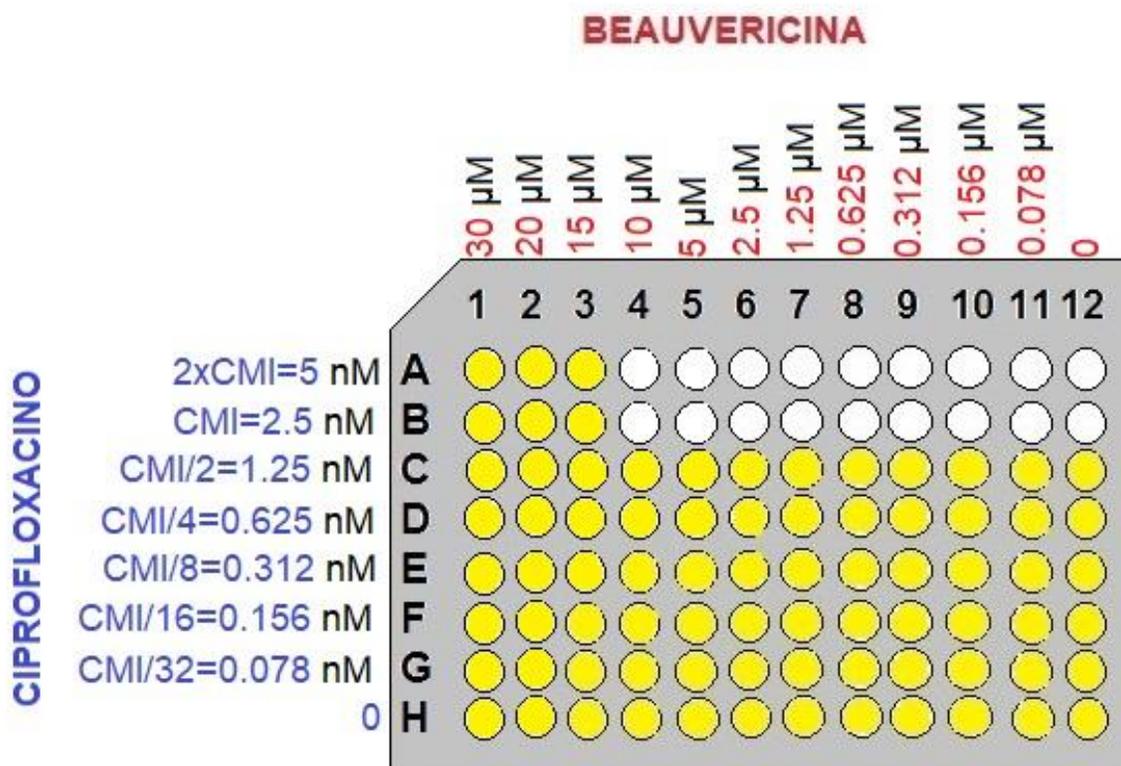
$$ICIF = 0.5 + 0.007 = 0.507$$



**Figura 49.** Técnica de tablero mostrando el efecto sinérgico de beauvericina y lincomicina sobre *S. aureus* ATCC 43300 (cepa resistente). Se muestra con amarillo los pozos donde hubo crecimiento bacteriano, en blanco los pozos sin crecimiento bacteriano y se señala con rojo la combinación con el mayor efecto sinérgico.

$$ICIF = CIF \text{ de lincomicina} + CIF \text{ de BEA}$$

$$ICIF = 0.5 + 0.007 = 0.507$$



**Figura 50.** Técnica de tablero mostrando el efecto antagónico de beauvericina y ciprofloxacino sobre *S. typhimurium* ATCC 14028. Se muestra con amarillo los pozos donde hubo crecimiento bacteriano, en blanco los pozos sin crecimiento bacteriano.

Al igual que Sondergaard *et al.*, (2016) no fue posible determinar la CMI de BEA para *S. typhimurium* por lo que tampoco fue posible calcular su CIF: Independiente a esta limitación, se probaron diferentes combinaciones entre ciprofloxacino y BEA, utilizando la CMI de ciprofloxacino y 30  $\mu$ M como la concentración más alta de BEA (figura 50). Se encontró un efecto antagónico marcado por parte de la BEA, ya que *S. typhimurium* en presencia de BEA era capaz de crecer hasta en el doble de la CMI de ciprofloxacino, además que la determinación de la viabilidad de *S. typhimurium*, utilizando concentraciones altas de BEA se llevó a cabo por cultivo en caja, se cuantificó que el número de unidades formadoras de colonia de *S. typhimurium* aumentaba conforme aumentaba la concentración de BEA, incluso utilizando el doble de la CMI de ciprofloxacino (figura 51).



**Figura 51.** Cultivos en placa mostrando el efecto antagónico de la BEA. a: 30  $\mu$ M de BEA + 2xCMI (5 nM) de ciprofloxacino; b: 20  $\mu$ M de BEA + 2xCMI (5nM) de ciprofloxacino; c: 15  $\mu$ M de BEA + 2xCMI (5 nM) de ciprofloxacino. Utilizando agar Mueller Hilton.

Como ya se mencionó poco se conoce acerca del efecto antibacteriano de la BEA (Whang & Xu, 2012), por lo que no es posible determinar o proponer mecanismos de cómo la BEA potencializa el efecto de la oxacilina y lincomicina en *S. aureus* o por qué actúa como antagonista en combinación de ciprofloxacino en *S. typhimurium*. El efecto sinérgico de la BEA solo ha sido descrito en combinación con antimicóticos (Zhang *et al.*, 2007), por lo que el presente trabajo es el primero que describe un efecto sinérgico en combinación con antibióticos, junto con la limitante del principio de los mecanismos de acción de la BEA, hace difícil proponer o relacionar mecanismos de acción de cómo la BEA posee efecto sinérgico o antagonista en *S. aureus* o *S. typhimurium*, respectivamente.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y las secuencias ITS, el gen de actina,  $\beta$ -tubulina y el gen de elongación alfa, resultó ser un método adecuado que permite diferenciar entre especies estrechamente relacionadas.
2. La amplificación parcial del gen de la beauvericina sintetasa no se relaciona con la producción de BEA y se sugiere un par de oligonucleótidos específicos para cada especie debido a la variabilidad de este gen.

3. De las cepas utilizadas solamente la cepa AB2 de *F. oxysporum* y la TORT identificada como *E. nigrum* mostraron una producción de BEA.
4. La extracción en fase sólida con cartuchos C18 es un método adecuado para la prepurificación de la BEA.
5. El análisis por HPLC y la espectroscopia de masas MALDI-TOF y ESI-TOF resulto ser un método adecuado para la purificación y caracterización de la BEA.
6. El SSF aumenta la producción de BEA en comparación al SmF incluso utilizando el mismo medio de cultivo, pasando de 0.8 a 22.8 mg·L<sup>-1</sup>, lo que representa una producción 28.5 veces mayor.
7. El cultivo en estado sólido utilizando el medio de cultivo optimizado y PUF como soporte sólido mostro ser el sistema de cultivo con la mayor producción de BEA, superando la producción del medio de cultivo enriquecido con caparazón de camarón y SSF usando bagazo de caña como soporte sólido.
8. La disminución de la actividad de agua y la aplicación de pulsos oxidantes en los cultivos resulto se perjudicial para la producción de BEA
9. Utilizando una versión más concentrada del medio aumentó considerablemente la producción y la producción específica de BEA. Pasando de un 22.8 mg·L<sup>-1</sup> a un 65.3 mg·L<sup>-1</sup> (286.4% más) al triplicar la concentración del medio de cultivo.
10. Utilizando el medio de cultivo optimizado y cultivo en estado sólido el máximo de producción de BEA se alcanza en el día 7 de cultivo y permanece hasta el día 11 de cultivo.
11. La producción de BEA en SSF con medio 3X aumentó 29.5% utilizando cultivos mixtos de *F. oxysporum* AB2 con restos celulares de *E. nigrum* TORT en comparación con los cultivos axénicos de *F. oxysporum* AB2, alcanzando una producción de 84.6 mg·L<sup>-1</sup>.
12. La BEA posee un efecto sinérgico en combinación con el cisplatino en la línea celular H-1975 de cáncer de pulmón, sin embargo, se sugiere el uso de otras líneas celulares de cáncer y células no cancerígenas que colaboren estos resultados y determinen la toxicidad en células normales.

13. La BEA mostró poseer un efecto sinérgico sobre las cepas ATCC 25923 y ATCC 43300 de *S. aureus* al combinarse con oxacilina, un efecto de adición sobre las cepas ATCC 25923 y ATCC 43300 de *S. aureus* al combinarse con lincomicina y un efecto antagónico sobre *S. typhimurium* ATCC 14028 al combinarse con ciprofloxacino.

## 10. CONCLUSIONES

El cultivo en estado sólido (SSF) tiene un efecto importante en la producción de BEA, ya que aumenta su producción en comparación al cultivo líquido (SmF) aun usando el mismo medio de cultivo. Sin embargo, el aumento en la producción de biomasa entre los cultivos SSF y SmF no es proporcional al aumento de la producción de BEA, indicando un efecto regulatorio positivo que deriva en un considerable aumento en la producción de BEA. Este efecto regulatorio también se manifiesta al modificar las condiciones de cultivo, debido a que la aplicación de pulsos oxidantes y la disminución de actividad de agua, disminuyen la producción de BEA, pero con la realización de cultivos mixtos aumenta.

El cultivo en estado sólido implementado en nuestro trabajo, utilizando un medio de cultivo líquido optimizado, acorta los tiempos de producción de BEA, a tan solo siete días de cultivo, superando el tiempo de producción de cualquier sistema de cultivo, reportado hasta ahora. Por estas razones es importante considerar el potencial que posee el cultivo en estado sólido para la producción de metabolitos secundarios de interés industrial y farmacéutico.

Por otro lado, la BEA posee un marcado efecto antibacteriano, en cepas de *S. aureus* tanto resistentes como no resistentes y aumenta cuando se combina con antibióticos como la oxacilina y la lincomicina llegando a presentar un efecto sinérgico, sin embargo, al combinar BEA con ciprofloxacino se presenta un fuerte efecto antagónico. Debido a lo anterior, se sugiere evaluar el efecto que posee la BEA combinada con diferentes antibióticos, frente a diferentes especies bacterianas. Por otro lado, la BEA mostro un potencial para ser usado como coadyuvante de antitumorales, por mostrar un efecto sinérgico en combinación con cisplatino frente a la línea celular de cáncer H-1975, por lo que se propone el uso

de otras líneas celulares, tanto cancerígenas como no cancerígenas, para determinar la seguridad y efectividad de la BEA. Lo anterior proyecta a la BEA como una alternativa para el desarrollo de nuevas terapias menos costosas.

## **11. PERSPECTIVAS**

- Desarrollar un par de oligonucleótidos, que permitan la amplificación parcial del gen de la beauvericina sintetasa, en cepas de diferentes especies, que puedan ser utilizados como un criterio de selección para la producción de BEA.
- Evaluar el efecto del cultivo en estado sólido en la producción de BEA, utilizando otros medios de cultivo, donde se haya observado una alta producción de BEA.
- Evaluar la producción de BEA en cepas superproductoras de BEA, utilizando cultivo en estado sólido y las condiciones expuestas en nuestro trabajo.
- Determinar el efecto que tienen los restos celulares bacterianos, en la producción de BEA, mediante cultivos mixtos.
- Evaluar el efecto antitumoral que posee la BEA, en combinación con cisplatino en otras líneas celulares de cáncer, y en líneas celulares no cancerígenas.
- Evaluar el efecto que posee la BEA, en combinación con otros antibióticos y especies bacterianas diferentes a las utilizadas.
- Determinar los mecanismos de acción, por los cuales la BEA posee un efecto antibiótico.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdeljalil S, Saibi W, Ben Hmad I, Baklouti A, Ben Mahmoud F, Belghith H, Gargouri A (2014) Improvement of cellulase and xylanase production by solid-state fermentation of *Stachybotrys microspora*. *Biotechnol Appl Bioc* 61(4):432-440.
- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
- Agahi F, Juan-García A, Font G, Juan C (2021) Study of enzymatic activity in human neuroblastoma cells SH-SY5Y exposed to zearalenone's derivatives and beauvericin. *FCT* 152.
- Alcock A, Elmer P, Marsden R, Parry F (2015) Inhibition of *Botrytis cinerea* by Epirocin: A Secondary Metabolite from New Zealand Isolates of *Epicoccum nigrum*. *J Phytopathol* 163(10):841-852.
- Al-Hemaid FMA., Ali MA, Joongku L, Gyulai G, Pandey AK (2014) Application of Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA for Identification of *Echinops mandavillei* Kit Tan. *Bangladesh J Plant Taxon* 21(1):33-42.
- Al-Khoury C, Bashir Z, Tokajian S, Nemer N, Merhi G, Nemer G (2022) In silico evidence of beauvericin antiviral activity against SARS-CoV-2. *Comput Biol Med* 141.
- Al Khoury C, Nemer N, Nemer G (2021) Beauvericin potentiates the activity of pesticides by neutralizing the ATP-binding cassette transporters in arthropods. *Sci Rep* 11(1).
- Ancheeva E, Kupperts L, Akone SH, Ebrahim W, Liu Z, Mandi A, Kurtan T, Lin W, Orfali R, Rehberg N, Kalscheuer R, Daletos G, Proksch P (2017) Expanding the metabolic profile of the fungus *Chaetomium* sp. Through co-culture with autoclaved *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Org Chem* 22:3256-3264.
- An Q, Ze-Yang Liu, Chun-Rui Wang, Jing Yang, Si-Yu Chen, Xi Chen, Yi-Jie Zhang, Lu-Sen Bian, Mei-Ling H (2021) Laccase Activity from *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* Strains Grown on Agro - and Forestry Residues by Solid-state Fermentation. *BioResources* 16(4):7337–7354.
- Arellano-Plaza M, Noriega-Cisneros R, Clemente-Guerrero M, Gonzalez-Hernandez JC, Robles-Herrera PD, Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A, Gschaedler-Mathis A (2017) Fermentative capacity of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* after oxidative stress. *J Inst Brew* 123(4):519-526.
- World Health Organization (2022) Cancer. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- ATCC (2022) CRL-5908. Recuperado de <https://www.atcc.org/products/crl-5908>
- Balakrishnan M, Jeevarathinam G, Kumar SKS, Muniraj I, Uthandi S (2021) Optimization and scale-up of  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnol* 21(1).

- Baños JG, Tomasini A, Szakacs G, Barrios-Gonzalez J (2009) High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *J Biosci Bioeng* 108(2):105-110.
- Baraja PC (2009) La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia
- Barbosa-Cánovas GV., Anthony JF, J., Shelly JS, & Theodore PL (2007). *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Wiley-Blackwell.
- Barrios-González J, Fernández FJ, Tomasini A, Mejía A (2005) Secondary metabolite production in two phases solid-state fermentation. *Malays J Microbiol* 1:1-6.
- Barrios-González J (2012) Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem* 47(2):175–185.
- Barrios-González J (2018) Production of secondary metabolites: Advantages of solid-state fermentation. Chapter 13: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation pages 257-283. Edited by: Ashok Pandey, Christian Larroche and Carlos Ricardo Soccol Springer.
- Barrios-González J, Pérez-Sánchez A, Bibián ME (2020) New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 104:8979-8998.
- Barranco-Flrido E, García-Hernandez LA, Rodríguez-Navarro S, Flores-Macías A, Ramos-López MA (2013) Regulation of gene expression in entomopathogenic fungi in three different environmental conditions: A review. *Afr J Biotechnol* 12:989-995.
- Bärenstrauch M, Mann S, Jacquemin C, Bibi S, Sylla OK, Baudouin E, Buisson D, Prado S, Kunz C (2020) Molecular crosstalk between the endophyte *Paraconiothyrium variable* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum* - Modulation of lipoxygenase activity and beauvericin production during the interaction. *Fungal Genet Biol* 139.
- Behera SS & Ray RC (2016) Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int J Biol Macromol* 86:656-669.
- Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender J (2014) Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol Adv* 32(6):1180-1204.
- Benz R (1978) Alkali ion transport through lipid bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. *J Membr Biol* 43:367-94.
- Bibián ME, Pérez-Sánchez A, Barrios-González J (2022) The Biosynthesis of Penicillin and Cephalosporin C are Regulated by ROS at Transcriptional Level. *Curr Microbiol* 79:243

- Bibián ME, Pérez-Sánchez A, Mejía A, Barrios-González J (2020) Penicillin and cephalosporin biosyntheses are also regulated by reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(4):1773–1783.
- Braga RM, Padilla G, Araújo WL (2018) The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secondary metabolites. *Crit Rev Microbiol* 44(6):759-778.
- Brakhage AA, Schroeckh V (2011) Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Bio* 48:5–22.
- Buenrostro-Figueroa J, Ascacio-Valdes A, Sepulveda L, Prado-Barragan A, Aguilar-Gonzalez MA, Aguilar CN (2018) Ellagic acid production by solid-state fermentation influenced by the inert solid supports. *Emir J Food Agr* 30(9):750-757.
- Campos C, Fernández FJ, Sierra EC, Fierro, F, Garay, A, Barrios-González J (2008) Improvement of penicillin yields in solid-state and submerged fermentation of *Penicillium chrysogenum* by amplification of the penicillin biosynthetic gene cluster. *World J Microbiol Biotechnol* 24:3017-3022.
- Campos V, Kaspary RM, Rossi MJ, Medeiros TAM (2021) Biosynthesis of  $\gamma$ -Polyglutamic Acid by *Bacillus licheniformis* Through Submerged Fermentation (SmF) and Solid-state Fermentation (SSF). *Chem Biochem Eng Q* 35(3):333-334.
- Canut-Blasco A, Cllazos-Blanco A, Diez-Aguilar M, Morosini-Reilly MI, Rodríguez-Gascon A, Seral-García C (2020) Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. *EIMC* 70:6-9.
- Carbone I, Kohn LM 1999 A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Carboué Q, Rébufa C, Hamrouni R, Roussos S, Bombarda I (2020) Statistical approach to evaluate effect of temperature and moisture content on the production of antioxidant naphtho-gamma-pyrone and hydroxycinnamic acids by *Aspergillus tubingensis* in solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* 43(12):2283-2294.
- Castlebury LA, Sutherland JB, Tanner LA, Henderson AL, Cerniglia CE (1999) Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 15(1):119-121.
- Chagas FO, Dias LG, Pupo MT (2013) A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. *J Chem Ecol* 39(10):1335-1342.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40
- Cheng C, Sun J, Zheng F, Wu K, Rui Y (2014) Molecular identification of clinical “difficult-to-identify” microbes from sequencing 16S ribosomal ADN and internal transcribed spacer 2. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 13:1-7.
- Chen B, Sun Y, Luo F, Wang C (2020) Bioactive Metabolites and Potential Mycotoxins Produced by *Cordyceps* Fungi: A Review of Safety. *Toxins* 12(6).
- Cheng C, Chang K, Lee Y (2009) Antiproliferative effect of beauvericin on retoniblastoma. *Fu-Jen J Med* 7:167-169.

- Chen H, Daletos G, Abdel-Aziz MS, Thomy D, Dai H, Brotz-Oesterhelt H, Lin W, Proksch P (2015) Inducing secondary metabolite production by the soil-dwelling fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co-culture. *Phytochem Lett* 12:35-41.
- Chen H, He Q (2012) Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *J Chem Technol Biotechnol* 87:1619-1625.
- Chi LP, Li XM, Li X, Wang BG (2020) New Antibacterial Thiodiketopiperazines from the Deep Sea Sediment-Derived Fungus *Epicoccum nigrum* SD-388. *Chem & Biodivers* 17(8):e2000320.
- Cuadra T, Fernández FJ, Tomasini A, Barrios-González J (2008) Influence of pH regulation and nutrient content on cephalosporin C production in solid-state fermentation by *Acremonium chrysogenum* C10. *Lett Appl Microbiol* 46:216-220
- Cui Y, Li J, Deng D, Lu H, Tian Z, Liu Z, Ma X (2021) Solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Trichoderma koningii* improves the quality of tea dregs for use as feed additives. *PLoS ONE* 16(11):1-20.
- Dashtipour S, Tadayon K, Yazdansetad S, Mosavari N, Keshavarz R (2021) Genomic pattern analysis of *Burkholderia mallei* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) discriminatory typing. *IJM* 13(5):574-582.
- De la Peña C, & Loyola VM (2017) De la genética a la epigenética (Fondo de cultura económica Eds), pp. 144-154. Ciudad de México, México.
- Demain, A. L. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: "Regulation of secondary metabolism in actinomycetes" (Shapiro S, Ed.), pp. 127–34. CRC Press, Boca Raton.
- Do Nascimento AM, Conti R, Turatti ICC, Cavalcanti BC, Costa-Lotufo L, Pessoa C, Moraes MO, Manfrim V, Toledo JS, Cruz AK, Pupo MT (2012) Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Rev Bras Farmacogn* 22:1276-1281.
- Drew SW and Wallis DA (1983) Biological aspects of secondary metabolism In: "Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi", (J. W. Bennett, A. Ciegler, Ed.). pp. 35-54. CRC Press, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dubovskiy IM, Whitten MMA, Yaroslavtseva ON, Greig C, Kryukov VY, Grizanova EV, Mukherjee K, Vilcinskis A, Glupov VV, Butt TM (2013) Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? *PLoS ONE* 8(4):1-9.
- Dzoyem JP, Melong R, Tsamo AT, Maffo T, Kapche DGWF, Ngadjui BT, McGaw LJ, Eloff, JN (2017) Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. *Rev Bras Farmacogn* 27(2):251-253.
- El-Sayed ESR, Zaki AG, Ahmed AS, Ismaiel AA (2020) Production of the anticancer drug taxol by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* TXB502: enhanced production by gamma irradiation mutagenesis and immobilization technique. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(16):6991-7003.

- Esteban P, Redrado S, Comas L, Domingo MP, Millán-Lou MI, Seral C, Algarate S, Lopez C, Rezusta A, Pardo J, Arias M, Galvez EM (2021) In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of Gliotoxin Alone and in Combination with Antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 13(2).
- Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J (2016) Differential impact of ramRA mutations on both ramA transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother* 71(3):617-624.
- Farinas CS (2015) Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew Sust Energ Rev* 52:179-188.
- Faria MR & Wraight (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biocontrol* 43:237-256.
- Fernandes EKK & Bittencourt VRE (2008) Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 46:71-93.
- Ferri Rios T & Reyes Ortega E (2012) *Fusarium*: Epidemiology, Environmental Sources and Prevention. Nova Science Publishers, Inc.
- Gallo A, Ferrara M, Perrone G (2013) Phylogenetic study of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins. *Toxins* 5(4):717-742.
- García-Ortiz N, Tlecuítl-Beristain S, Favela-Torres E, Loera O (2015) Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. lepidiotum: critical oxygen level and period of mycelium competence. *App Microbiol Biotechnol* 99(6):2783-2791.
- Galdevara S, Reineke A, Koduru UD (2016) *In vivo* expression of genes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection of lepidopteran larvae. *J Invertebr Pathol* 136:32-34.
- Gallou A, Serna-domínguez MG, Berlanga-Padilla AM, Ayala-Zermeño MA, Mellín-Rosas MA, Montesinos-Matías R, Arredondo-Bernal HC (2016) Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biol* 120:414-423.
- Gasmi L, Baek S, Kim JC, Kim S, Lee MR, Park SE, Shin TY, Lee SJ, Parker BL, Kim JS (2021) Gene diversity explains variation in biological features of insect killing fungus, *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 11(1).
- Ganassi S, Moretti A, Pagliai AMB, Logrieco A, Sabatini MA (2002) Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). *J Invertebr Pathol* 80:90-96.
- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 22(23).
- Giudice B, María GPC, Mota LC, Gutiérrez CMI, Algorta RC, Varela PG (2018). *Staphylococcus aureus* portador del gen mecA sensible a oxacilina (OS-MRSA): otro desafío para los laboratorios de microbiología. *Rev Med Uru* 34(4):142-153.
- Gonçalves HB, Jorge JA, Guimaraes LHS (2016) Production and characterization of an extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase from *Fusarium graminearum* during solid-state fermentation using wheat bran as a carbon source. *J Food Biochem* 40:655-663.

- González AM, Presa M, Latorre MG, Lura MC (2007) Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. Rev Iberoam Micol 24:59-61.
- Grove JF & Pople M (1980) The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. Mycopathol 70:103-105.
- Guirado BO, Solanas GM, Costa TI, Escrich EE (2002) El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. Rev Cuba Investig Bio 21(2):115-122.
- Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC (2015) The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. J Cell Sci 128(11):2009-2019.
- Hafez M, Abdelmagid A, Adam LR, Daayf, F (2020) Specific Detection and Identification of *Fusarium graminearum* Sensu Stricto Using a PCR-RFLP Tool and Specific Primers Targeting the Translational Elongation Factor 1a Gene. Plant Dis 104(4):1076-1086.
- Heilos D, Rodríguez-Carrasco Y, Englinger B, Timelthaler G, Schoonhoven S, Sulyok M, Boecker S, Süßmuth RD, Heffeter P, Lemmens-Gruber R, Dornetshuber-Fleiss R, Berger W (2017) The natural fungal metabolite beauvericin exerts anticancer activity *in vivo*: A pre-clinical pilot study. Toxins 9:258.
- Heredia A, Aguilar-Franco M, Magaña C, Flores C, Piña C, Velázquez R, Schäffer TE, Bucio L, Basiuk VA (2007) Structure and interactions of calcite spherulites with  $\alpha$ -chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. Mater Sci Eng C 27:8-13.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J (2003) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Appl Microbiol Biotechnol 64:175-186.
- Huang Y, Gilna P, Li W (2009) Identification of ribosomal RNA genes in metagenomic fragments. BOINFP 25(10):1338-1340.
- Hu, PF, Zhang BB, Huang J, Chen L, Ding Z, Liu L, Molnár I (2020) Oxidative Stress Induction Is a Rational Strategy to Enhance the Productivity of *Antrodia cinnamomea* Fermentations for the Antioxidant Secondary Metabolite Antrodin C. J Agric Food Chem 68(13):3995-4004.
- INECOL (2021) Conociendo a los hongos fitopatógenos. Recuperado de <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2013-06-05-10-34-10/17-ciencia-hoy/1042-conociendo-a-los-hongos-fitopatogenos>.
- Ivanov TV, Evstratov AV, Sumskaya LV, Melnik EI, Chumburidze TS, Portnova SL, Balashova TA, Ovchinnikov Yu A (1973) Sandwich complexes as a functional form of the enniatin ionophores. FEBS. Letters. 36:65-71.
- Jain A, Morlok CK, Henson JM (2013) Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. Appl Microbiol Biotechnol 97:905-917.
- Jensen BD, Knorr K, Nicolaisen M (2016) In vitro competition between *Fusarium graminearum* and *Epicoecum nigrum* on media and wheat grains. Eur J Plant Pathol 146(3):657-670.

- Jiang X, Cheng YJ, Shi LG (2013) Determination of *Fusarium* micotoxina beauvericin in *Bombyx batryticatus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Asian J Chem* 25:6693-6696.
- Jirakkakul J, Punya J, Pongpattanakitsote PP, Vorapreeda N, Tachaleat A, Klomnara C, Tanticharoen M, Cheevadhanarak (2008) Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria spp.* *BCC1067. Microbiology* 154:995-1006.
- Juan C, de Simone G, Sagratini G, Caprioli G, Manes J, Juan-GarciaA (2020) Reducing the effect of beauvericin on neuroblastoma SH-SY5Y cell line by natural products. *Toxicon* 188:164-171.
- Kaur S, Mumbarkar V, Paramjit S, Panesar, Sushma G, Prasad R (2019) Exploring the potential of *Epicoccum nigrum* for pigment production under variable conditions. *Pigment Resin Technol* 48(6):555-562.
- Kaur S, Paramjit S, Panesar SG, Prasad R, Vikas K (2019) Optimization of aqueous extraction of orevactaene and flavanoid pigments produced by *Epicoccum nigrum*. *Pigment Resin Technol* 48(4):301-308.
- Kaur S, Mumbarkar V, Paramjit S, Panesar SG, Prasad R (2019) Exploring the potential of *Epicoccum nigrum* for pigment production under variable conditions. *Pigment Resin Technol* 48(6):555-562.
- Kouri K, Duchon M, Lemmens R (2005) Effects of beauvericin on the metabolic state and ionic homeostasis of ventricular myocytes of the guinea pig. *Chem Res Toxicol* 18:1661-1668.
- Kouri K, Lemmens M, Lemmens-Gruber R (2003) Beauvericin induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1609:203-210.
- Kriegeskorte A, Idelevich EA, Schlattmann A, Layer F, Strommenger B, Denis O, Paterson GK, Holmes MA, Werner G, Becker K (2017) Comparison of Different Phenotypic Approaches to Screen and Detect mecC - Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *JCM* 56(1).
- Kristensen SB, Pedersen TB, Nielsen MR, Wimmer R, Muff J, Sørensen JL (2021) Production and Selectivity of Key Fusarubins from *Fusarium solani* due to Media Composition. *Toxins* 13(6).
- Ku JM, Hong SH, Kim HI, Kim MJ, Kim SK, Kim M, Choi SY, Park J, Kim HK, Kim JH, Seo HS, Shin YC, Ko SG (2020) Synergistic anticancer effect of combined use of *Trichosanthes kirilowii* with cisplatin and pemetrexed enhances apoptosis of H1299 non-small-cell lung cancer cells via modulation of ErbB3. *Phytomedicine* 66.
- Lai Y, Chen H, Wei G, Wang G, Li F, Wang S (2017) *In vivo* gene expression profiling of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* its infection stratagems in *Anopheles* mosquito. *Sci China Life Sci* 8:839-851.
- Lee HS, Kim KA, Seo DG, Lee C (2012) Effects of 14C-labelled precursor feeding on production of beauvericin, enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* KFCC11363P. *JBB* 113(1):58-62.

- Lee HS, Song HH, An JH, Shin CG, Lee GP, Lee C. Statistical optimization of growth medium for the production of the entomopathogenic and phytotoxic cyclic depsipeptide beauvericin from *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *J Microbiol Biotechnol*. 2008 Jan;18(1):138-44.
- Lima-Pérez J, López-Pérez M, Viniegra-González G, Loera O (2019) Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioprocess Biosyst Eng* 42(9):1527-1535.
- Lima-Pérez J, Rodríguez-Gómez D, Loera O, Viniegra-González G, López-Pérez M (2018) Differences in growth physiology and aggregation of *Pichia pastoris* cells between solid-state and submerged fermentations under aerobic conditions. *J Chem Technol Biotechnol* 93:527-532.
- Lim YJ, Choi E, Kwon HJ, Park SH (2020) Genetic localization of the oreovactaene/epipyron biosynthetic gene cluster in *Epicoccum nigrum*. *Bioorganic Med Chem Lett* 30(14).
- Lin H, Lee Y, Chen B, Tsai M, Lu J, Chou C, Jow G (2005) Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett* 230:248-259.
- Liuzzi, VC, Mirabelli V, Cimmarusti MT, Haidukowski M, Leslie JF, Logrieco AF, Caliandro R, Fancesca F, Mule G. (2017). Enniatin and beauvericin biosynthesis in *fusarium* species: Production profiles and structural determinant prediction. *Toxins*. 9:45.
- Llanos R, Chevrier V, Ronjat M, Meurer-Grob P, Martinez P, Frank R, Bornens M, Wade RH, Wehland J, Job Didier (1999) Tubulin binding sites on  $\gamma$ -tubulin: Identification and molecular characterization. *Biochem* 38:15712-15720.
- Logrieco A, Rizzo A, Ferrance R, Ritieni A (2002) Occurrence of Beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl Environ Microbiol* 68:82-85.
- López-Calleja AC, Cuadra T, Barrios-González J, Fierro F, Fernández FJ (2012) Solid-State and Submerged Fermentations Show Different Gene Expression Profiles in Cephalosporin C Production by *Acremonium chrysogenum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 22:126-134.
- Lorenzini M, Zapparoli G (2015) Occurrence and infection of *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum* and *Aureobasidium* in withered rotten grapes during post-harvest dehydration. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108(5):1171-1180.
- Luangsa AJJ, Berkaew P, Ridkaew R, Hywel-Jones NL, Isaka M (2009) A beauvericina hot spot in the genus *Isaria*. *Mycol Res* 113:1389-1395.
- Lu CL, Lin HI, Chen BF, Jow G-M (2016) Beauvericin-induced cell apoptosis through the mitogen-activated protein kinase pathway in human nonsmall cell lung cancer A549 cells. *J Toxicol Sci* 41:429-437.
- Luke JJ, Ott PA, Shapiro GI (2014) The biology and clinical development of mek inhibitors for cancer. *Drugs* 74:2111-2128
- Maluda (2017) *Staphylococcus Aureus: Infections, Treatment and Risk Assessment*. Nova Science Publishers, Inc.

- Martinière A, Fiche JB, Smokvarska M, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C (2019) Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion. *Plant Physiol* 179(4):1581-1593.
- Martín JF (2004) Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* 186:5197–5201.
- Mascarín GM, Jackson MA, Behle RW, Kobori NN, Júnior ID (2016) Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:8359-8370.
- Mayorga-Reyes L, Calderón-Garza E, Gutiérrez-Nava A, González-Cervantes R, Azaola-Espinosa A, Barranco-Flrido E (2012) Characterization and expression of the chitinase CHIT II gene from *Lecanicillium lecani* in solid-state fermentation. *Rev Mex Ing Quim* 11:97-104.
- McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss MM, Andersen P (1996) The Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* 52:1008-1017.
- Meca G, Sospedra L, Soriano JM, Ritiene A, Moretti A, Mañes J (2010) Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat. *Toxicon* 56:349-354.
- Medina A, Gilbert MK, Mack BM, O'Brien GR, Rodríguez A, Deepak B, Payne G, Naresh M (2017) Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production. *Int J Food Microbiol* 256:36-44.
- Meyling NV & Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control* 43:145-155.
- Miao L, Chi S, Wu M, Liu Z, Li Y (2019) Deregulation of phytoene-β-carotene synthase results in derepression of astaxanthin synthesis at high glucose concentration in *Phaffia rhodozyma* astaxanthin-overproducing strain MK19. *BMC Microbiol* 19(1).
- Michels J, Appel E, Gorb SN (2016) Functional diversity of resilin in Arthropoda. *Beilstein J Nanotechnol* 7:1241-1259.
- Minarni EW, Soesanto L, Suyanto A, Rostaman (2021) Molecular identification of three entomopathogenic fungi infecting the brown plant hopper pest in Indonesia. *Egypt J Biol Pest Control* 31(1).
- Miranda RU, Gómez-Quiroz LE, Mejía A, Barrios-González J (2013) Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biol* 117:85-93.
- Miranda RU, Gómez-Quiroz LE, Pérez-Sánchez A, Fierro F, Barrios-González J. (2014) Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biol.* 118 (12):979-989.

- Mirhendi H, Makimura K, Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, Ahmadi B (2015) Translation elongation factor 1- $\alpha$  gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med Mycol J* 53(3):215-224.
- Mohamed-Moustafa, MA, Anders JL, Ahmed MWM, Lee K, Elbaz E, Sashika M, Nakao R, Shimosuru M, Tsubota T (2021) Specific molecular detection of piroplasms and characterization of  $\beta$ -tubulin for a novel babesia species in sika deer (*CERVUS NIPPON YESOENSIS*). *JZWM* 52(1):200-205.
- Montiel-González AM, Viniegra-González G, Fernández FJ, Loera O (2004) Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochem* 39(12):2085-2090.
- Morales-Ubaldo A, Jerelly HA, Benjamín VC, Valente VO, Lucía DR, Carla RM, Nallely RP, Adrián ZB (2020) Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitaria. *Abanico Vet* 10(1):1-10.
- Moretti A, Mulé G, Ritieni A, Láday M, Stubnya V, Hornok L, Logrieco A (2008) Cryptic subspecies and beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from Europe. *International J Food Microbiol* 127(3):312-315.
- Muñiz-Paredes F, Miranda-Hernández F, Loera O (2017) Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J Microbiol Biotechnol* 33(3):1–9.
- Nagavalli M, Ponamgi SPD, Girijashankar V, Rao V (2015) Solid state fermentation and production of Rifamycin SV using *Amycolatopsis mediterranei*. *Lett Appl Microbiol* 60:44-51.
- Nizamani S, Khaskheli AA, Jiskani AM, Khaskheli SA, Khaskheli AJ, Poussio GB, Jamro H, Khaskheli MI (2021) Isolation and Identification of the Fungi Causing Tomato Fruit Rot Disease in the Vicinity of Tandojam, Sindh. *Agric Sci Digest* 41:186-190.
- Oakley BR (2000) An abundance of tubulinas. *Trends Cell Biol* 10:537-542.
- Oliveira F, Moreira C, Salgado JM, Abrunhosa L, Venâncio A, Belo I (2016) Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation *SCI*. 96:3583-3589.
- Pappas PG (2010) Opportunistic fungi: a view to the future. *Am J Med Sci* 340(3):253-257.
- Pedrini N, Crespo R, Juárez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *CBP* 146:124-137.
- Perazzi B, Camacho M, Bombicino K, Flores Z, Vay C, Famiglietti A (2010) *Staphylococcus aureus*: new and old antimicrobial agents. *Rev Argent Microbiol* 42(3):199-202.
- Pérez-Sánchez A, Uríbe-Carvajal S, Cabrera-Orefice A, Barrios-González J (2017) Key role of alternative oxidase in lovastatin solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7347-7356.

- Phuong PTD, Trung TS, Stevens WF, Minh NC, Bao HND, Hoa NV (2021) Valorization of Heavy Waste of Modern Intensive Shrimp Farming as a Potential Source for Chitin and Chitosan Production. *Waste Biomass Valori* 1-8.
- Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JPT, Hyvönen J (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9:6.
- Prince RC, Crofts AR, Steinrauf LK (1974) A comparison of beauvericin, enniatin and valinomycin as calcium transporting agents in liposomes and chromatophores. *Biochem Biophys Res Commun* 59:697-703
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 72:2457-2467.
- Pruteanu LL, Braicu C, Módos D, Jurj MA, Raduly LZ, Zănoagă O, Magdo L, Cojocneanu R, Pașca S, Moldovan C, Moldovan AI, Țigu AB, Gurzău E, Jäntschi L, Bender A, Berindan-Neagoe I (2022) Targeting Cell Death Mechanism Specifically in Triple Negative Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 23(9):4784.
- Pucheta DM, Flores MA, Rodríguez NS, De la torre M (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31:856-860.
- Qi An, Ze-Yang L, Chun-Rui W, Jing Y, Si-Yu C, Xi C, Yi-Jie Z, Lu-Sen B, Mei-Ling H (2021) Laccase Activity from *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* Strains Grown on Agro and Forestry Residues by Solid-state Fermentation. *BioResources*, 16(4):7337-7354.
- Rachmawati R, Kinoshita H, Nihira T (2018) Production of insect toxin beauvericin from entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* by heterologous expression of global regulator. *J Agric Sci* 40:177-184.
- Rehner SA, Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia* 97:84-89.
- Ríos RP, González RA, Sánchez CF, Murguía MP (2015) Tendencia de mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evid Med Invest Salud* 8:5-15.
- Ríos TS & Ríos OL (2011) Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Rev MVZ Córdoba* 16(2):2470-2483.
- Rojas-Badía MM, Sánchez-Castro D, Rosales-Perdomo K, Lugo-Moya D (2017) Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Rev Prot Veg* 32(2):1-9.
- Rondot Y, Reineke A (2018) Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Bio Control* 116:82-89.
- Ruijter GJG, Visser J, Rinzema A (2004) Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology* 150(4):1095-1101.
- Ruiz-Leza, HA, Rodríguez-Jasso, RM, Rodríguez-Herrera, R, Contreras-Esquivel and JC. Aguilar, CN (2007) Bio-reactors design for solid state fermentation. *Rev Mex Ing Quím* 6:33-40.

- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:1.
- Salvadores M, Fuster-Tormo F, Supek F (2020) Matching cell lines with cancer type and subtype of origin via mutational, epigenomic, and transcriptomic patterns. *Sci Adv* 6(27).
- Sanchez M, Hernández O, Velasquez LA, Rivas D, Marín A, González LA, Duque C (2013) Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *INFECTIO* 17(2):66-72.
- Santos VL, Linardi VR (2004) Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential. *Process Biochem* 39(8):1001-1006.
- Sarsaiya S, Jain A, Jia Q, Fan X, Shu F, Chen Z, Zhou Q, Shi J, Chen J (2020) Molecular Identification of Endophytic Fungi and Their Pathogenicity Evaluation Against *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale*. *Int J Mol Sci* 21(1):316.
- Serrano AB, Capriotti AL, Cavaliere C, Piovesana S, Samperi R, Ventura S, Lagana A (2015) Development of a rapid LC-MS/MS method for the determination of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin in human biological fluids. *Toxins* 7(9):3554-3571.
- Shin CG, An DG, Song HH, Lee C (2009) Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *J Antibiot. (Tokyo)* 62:687-690.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 44:13-18.
- Sivanathan S & Scherckenbeck J (2014) Cyclodepsipeptides: A Ricj Source of Biologically Active Compounds for Drug Research. *Molecules* 19:12368-12420.
- Stielow, JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJM, Groenewald M, Chaduli D, Lomascolo A, Welti S, Lesage-Meessen, L, Favel A, Al-Hatmi AMS, Damm U, Yilmaz N, Houbraken J, Lombard L, Quaedvlieg W (2015) One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, 35:242-263
- Sondergaard TE, Fredborg M, Christensen AMO, Damsgaard SK, Kramer NF, Giese H, Sorensen JL (2016) Fast Screening of Antibacterial Compounds from *Fusaria*. *Toxins* 8(12):355.
- Song P, Huang B, Zhang S, Zhang K, Yuan K, Ji X, Ren L, Wen J, Huang H (2018) Novel osmotic stress control strategy for improved pneumocandin B0 production in *Glarea lozoyensis* combined with a mechanistic analysis at the transcriptome level. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(24):10729-10742.
- Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJM, Groenewald M, Chaduli D, Lomascolo A, Welti S, Lesage-Meessen L, Favel A, Al-Hatmi AMS, Damm U, Yilmaz N, Houbraken J, Lombard L, Quaedvlieg W (2015) One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 35:242-263.

- Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A (2018) Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* 120(3):159-167.
- Strauss J, and Reyes-Dominguez Y (2011) Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol* 48:62–69.
- Swanson SJ, Snider C, Braden CR, Boxrud D, Wunschmann A, Rudroff JA, Lockett J, Smith KE (2007) Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Associated with Pet Rodents. *NEJM* 356(1):21-28.
- Tabaraie B, Ghasemian E, Tabaraie T, Parvizi E, Rezazarandi M (2012) Comparative evaluation of cephalosporin-C production in solid state fermentation and submerged liquid cultura. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2:83-94.
- Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81:146-161.
- Tingting T, Min Y, Zhongxi Z, Yuxia L, Xuan T, Meihua Z, & Yan L (2016) Development and Validation of Stability-Indicating Method for the Simultaneous Determination of Ketoconazole and Beauvericin in Pharmaceutical Tablets. *J Chromatogr Sci* 54(3):361-366.
- Trindade LV, Lima AMF, Gomes E, Bonilla-Rodríguez GO, Desagiacomo C, Polizeli MDLTDM, Damasio ARDL (2016) Biochemical characterization, thermal stability, and partial sequence of a novel exopolygalacturonase from the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* a13.36 obtained by submerged cultivation. *BioMed Res Int* 20:1-10.
- Tuiche MV, Lopes AA, Silva DB, Lopes NP, Pupo MT (2014) Direct MALDI TOF/TOF analyses of unnatural beauvericins produced by the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* SS46. *Rev Bras Farmacogn* 24(4):433-438.
- Uchiyama C, Fukuda A, Mukaiyama M, Nakazawa Y, Kuramochi Y, Muguruma K, Arimoto M, Ninomiya A, Kako K, Katsuyama Y, Konno S, Taguchi A, Takayama K, Taniguchi A, Nagumo Y, Usui T, Hayashi Y (2021) Structural Revision of Natural Cyclic Depsipeptide MA026 Established by Total Synthesis and Biosynthetic Gene Cluster Analysis. *Angew Chem Int Ed* 60(16):8792-8797.
- Urbaniak M, Stępień L, Uhlig S (2019) Evidence for naturally produced beauvericins containing N-Methyl-Tyrosine in Hypocreales fungi. *Toxins* 11(3).
- Valencia AJW, Bustamante GAL, Jiménez VA, Grossi-de-Sá FM (2011) Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: An intraspecific evaluation of beauvericin production. *Curr Microbiol* 63:306-312.
- Valero-Jiménez CA, Faino L, Spring in't Veld D, Smit S, Zwaan BJ, van Kan JAL (2016) Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes. *BMC Genom* 17:1-11.
- Vásquez-Bonilla JN, Cabrera-Vega EJ, Vázquez-Olvera JI, Gutiérrez-Nava MA, Hurtado- y de la Peña Marcela, Barranco-Florido JE (2017) Actividad biológica de la micotoxina beauvericina en células cancerosas. *Rev Mex Ciencias Farmacéuticas* 48:16-26.

- Vendruscolo F, Buhler R, Carvalho J, Oliveira D, Moritz D, Schmidell W, Ninow J (2016) Monascus: a reality on the production and application of microbial pigments. *Appl Biochem Biotechnol* 178(2):211-223.
- Wang JJ, Yang L, Qiu X, Liu YG, Zhou W, Wan YJ (2013) Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1263-1269.
- Wang H, Zuo J (2021) Shikonin Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer H1299 Cell Growth through Survivin Signaling Pathway. *Anal Cell Pathol* 2021:6435393.
- Wang L, Hu R, Dai A (2022) Curcumin Increased the Sensitivity of Non-Small-Cell Lung Cancer to Cisplatin through the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *ECAM* 1-15.
- Wang MC, Liang X, Liu ZY, Cui J, Liu Y, Jing L, Jiang LL, Ma JQ, Han LL, Guo QQ, Yang CC, Wang J, Wu T, Nan KJ, Yao Y (2015) *In vitro* synergistic antitumor efficacy of sequentially combined chemotherapy/icotinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 33(1):239-249.
- Wang Q, Xu L (2012) Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules* 17:2367-2377.
- Wang QX, Li SF, Zhao F, Dai HQ, Bao L, Ding R, Liu HW (2011) Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *Fitoterapia* 82:777-781.
- Wang X, Gong X, Li P, Lai D, Zhou L (2018) Structural Diversity and Biological Activities of Cyclic Depsipeptides from Fungi. *Molecules* 23(1):169.
- Wan Q, Shen Y, Zhao H, Wang B, Zhao L, Zhang Y, Bu X, Wan M, Shen C (2019) Impaired DNA double-strand breaks repair by kinesin family member 4A inhibition renders human H1299 non-small-cell lung cancer cells sensitive to cisplatin. *J Cell Physiol* 234(7):10360-10371.
- Wätjen W, Debbab A, Hohlfeld A, Chocou Y, Proksch P (2014) The mycotoxin beauvericin induces apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by an inhibition of NF- $\kappa$ B-activity and modulation of MAP-Kinases. *Toxicol Lett* 232:9-16.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press 315-322.
- World Health Organization (2022) Cancer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- World Health Organization (2022) Cancer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Wroblewska-Luczka P, Grabarska A, Florek-Luszczki M, Plewa Z, Luszczki JJ (2021) Synergy, Additivity, and Antagonism between Cisplatin and Selected Coumarins in Human Melanoma Cells. *Int J Mol Sci* 22(2):537.
- Wu J, Yang B, Xu J, Cuthbertson AGS, Ali S (2021) Characterization and Toxicity of Crude Toxins Produced by *Cordyceps fumosorosea* against *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Aphis craccivora* (Koch). *Toxins* 13(3).

- Wu S, Xu W, Liu S, Chen B, Wang X, Wang Y, Liu S, Wu J (2011) Down-regulation of ALKBH2 increases cisplatin sensitivity in H1299 lung cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 32(3):393-398.
- Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, Xie XQ, Shang Y, Leger RJ, Zhao GP, Wang C, Feng MG (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 2:483.
- Xin Z, Wenyun M, Huawei Z, Kuo Z, Yaling Z, Juan Z, Qinxue Z, Delinur T, Dayong X, Feng L (2019) Production of natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* Z28 through solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Bioresour Technol* 273:377-385.
- Xu Y, Orozco R, Wijeratne EMK, Espinosa-Artiles P, Gunatilaka AAL, Stock SP, Molnár I (2009) Biosynthesis of the cyclooligomer depsipéptido bassianolido, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genet Biol* 46:353-364.
- Xu Y, Zhan J, Wijeratne EMK, Burns AM, Gunatilaka AAL, Molnar I (2007) Cytotoxic and antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *J Nat Prod* 70:1467-1471.
- Yanfang W, Menglei X, Xiaofeng Z, Xiaowei L, Rongzhan Z, Yufeng Y, Fanfan L, Yu Z, Min W (2021) Unraveling the metabolic network of organic acids in solid-state fermentation of Chinese cereal vinegar. *Food Sci Nutr* 9(8):4375-4384.
- Yang SQ, Xiong H, Yang HY, Yan QJ, Jiang ZQ (2015) High-level production of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasa by *Rhizomucor miehei* under solid-state fermentation nad its potential application in the brewing industry. *J Appl Microbiol* 118:84-91.
- Yazid NA, Barrena R, Komilis D, Sánchez A (2017) Solid-state fermentation as a novel paradigm for organix waste valorization: a review. *Sustainability* 9:224.
- Yilmaz E (2014) Mutagenecity of Enniatin A1 and B1 Mycotoxins in Ames Salmonella MicrosomeTest. *Kafkas Univ Vet Fak Dergi* 20(6):893-896.
- Yilmazer C, Germec M, Turhan I (2021) Solid-state fermentation for the production of a recombinant  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on renewable resources. *J Food Process Preserv* 45(8):1-8.
- Yin M, Xiao D, Wang C, Zhang L, Dun B, Yue Q (2022) The regulationof BbLaeA on the production of beauvericin and bassiatin in *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol Biotechnol* 38(1).
- Yiping R, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z (2007) Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1143(1-2):48-64.
- Yu J, Zhang X, Tan T (2008) Ethanol production by soli state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Process Technol* 89:1056-1059.

- Zhang L, Wang X, Houbraken J, Mei H, Liao W, Hasimu H, Liu W, Deng S (2020) Molecular Identification and In Vitro Antifungal Susceptibility of *Aspergillus* Isolates Recovered from Otomycosis Patients in Western China. *Mycopathologia* 185(3):527-535.
- Zhang L, Yan K, Zhang Y, Huang R, Bian J, Zheng C, Sun H, Chen Z, Sun N, An R, Min Z, Zhao W, Zhuo Y, You, J, Song Y, Yu Z, Liu Z, Yang K, Gao H, Dai H, Zhang X, Wang J, Fu C, Pei G, Liu J, Zhang S, Goodfellow M, Jiang Y, -Kuai J, Zhou G, Chen X (2007) High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:4606-4611.
- Zhou D, Xia Z, Xie M, Gao Y, Yu Q, He B (2021) Exosomal long non-coding RNA SOX2 overlapping transcript enhances the resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer cell line H1975. *Human Cell*, 34(5):1478-1489.
- Zhu YX, Zhong K, Shao ZY, Hong F (2008) Production of beauvericin by a high-yield strain *Fusarium sp.* F-1 in static cultivations. *J Biotechnol* 136(Supplement):S432.
- Zobel S, Boecker S, Kulke D, Heimbach D, Meyer V, Sussmuth RD (2016) Reprogramming the biosynthesis of cyclodepsipeptide synthetases to obtain new enniatins and beauvericins. *Chem Bio Chem* 17:283-287.

## 13. ANEXOS

Mycotoxin Research  
<https://doi.org/10.1007/s12550-022-00458-y>

ORIGINAL ARTICLE



### Improvement of beauvericin production by *Fusarium oxysporum* AB2 under solid-state fermentation using an optimised liquid medium and co-cultures

J. Norberto Vázquez-Bonilla<sup>1</sup> · J. Esteban Barranco-Flrido<sup>2</sup> · Edith Ponce-Alquicira<sup>1</sup> ·  
Monica A. Rincón-Guevara<sup>1</sup> · Octavio Loera<sup>1</sup>

Received: 6 August 2021 / Revised: 14 April 2022 / Accepted: 15 April 2022

© The Author(s) under exclusive licence to Society for Mycotoxin (Research Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.) and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

#### Abstract

The production of beauvericin (BEA) by *Fusarium oxysporum* AB2 in liquid medium (SmF) was compared to that on solid medium (SSF) on inert support (polyurethane foam or PUF), using a previously optimised medium. The analysis included two different concentrations of the medium (1× and 3×). Under SSF, the production of BEA (22.8 mg·L<sup>-1</sup>) was higher relative to SmF (0.8 mg·L<sup>-1</sup>). The production increased proportionally in the concentrated medium (3×) (65.3 mg·L<sup>-1</sup>); using the concentrated medium in SmF, the production of BEA was completely inhibited, although more biomass was produced. The peak of BEA production was reached on day 7 and remained stable until day 11; sustained production after several days has not been achieved in similar reports. The presence of BEA was corroborated by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry. The BEA production profile is shown performing mixed cultures of *Fusarium oxysporum* AB2 and *Epicoccum nigrum* TORT using the same system, increasing the production of BEA up to 84.6 mg·L<sup>-1</sup>. We propose SSF using polyurethane foam (PUF) as a solid support as a new culture system for obtaining secondary metabolites such as BEA.

**Anexo 1.** Portada del artículo publicado en la revista Mycotoxin Research

## EXPRESIÓN DEL GEN DE LA BEAUVERICINA SINTETASA EN UN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.

José Norberto Vázquez Bonilla; Juan Esteban Barranco Florido; Edith Ponce Alquicira; Octavio Loera Corral; Doctorado en Biotecnología, Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Ciudad de México C.P.09340. Correo electrónico del responsable del trabajo: norberto.vasquez.bonilla@gmail.com  
 Palabras clave: Cultivo en medio sólido, Beauvericina, Beauvericina sintetasa.

**Introducción.** La beauvericina (BEA) es una micotoxina de interés industrial y farmacéutico que posee una gran variedad de actividades biológicas como: insecticida, antimicrobiana, antifúngica, antiviral y antitumoral, así como interesantes mecanismos de acción<sup>1</sup>. Algunos hongos como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Fusarium sp.* producen BEA mediante una vía no ribosomal por la enzima beauvericina sintetasa codificada por el gen *bbBeas*.<sup>2</sup> El cultivo en medio sólido (CMS) se caracteriza por su bajo costo, alta productividad de compuestos bioactivos y como alternativa frente al cultivo líquido o sumergido. El CMS provee al microorganismo de tres fases para su desarrollo; una fase líquida, una sólida y una gaseosa que se asemejan al ambiente natural del microorganismo lo que contribuye a la producción de componentes activos como metabolitos secundarios.<sup>3</sup>

Debido a que no se han explorado las ventajas que puede tener el CMS en la producción de BEA, el objetivo de este trabajo fue determinar los patrones de expresión del gen *bbBeas* en un CMS.

**Metodología.** El microorganismo utilizado fue *B. bassiana* cepa 882.5. El medio de cultivo contenía (g·L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; NaCl, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.028; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.032; sacarosa, 10; como inductor para la expresión de *bbBeas* se utilizó caparazón de camarón (60 g·L<sup>-1</sup>) y bagazo de caña como soporte sólido.<sup>4</sup> Los niveles de expresión se compararon a los 6, 9 y 12 días de cultivo mediante la técnica de densitometría de banda en gel de agarosa, a partir de los productos de RT-PCR con los oligonucleótidos: Foward: 5'-ATT GGA TGA TGG CTA CAC CG-3' y Reverse: 5'-CTT TCC GGT GGC AGT GCG-3' diseñados basándose en las secuencias conservadas del alineamiento del gen de la beauvericina sintetasa en diferentes cepas de *B. bassiana* y *Fusarium sp.* utilizando el programa de Mega 7, como control positivo se utilizó el gen ribosomal 18S.

**Resultados.** El producto de RT-PCR obtenido tuvo una longitud de 778 pb; según la base de datos de GenBank de nucleótidos, es 97% idéntico al gen de la beauvericina sintetasa. Los niveles de expresión mostraron que el gen se expresó en todos los tiempos de cultivo, sin embargo, la mayor expresión se alcanza a los 9 días de cultivo (Fig.1) lo que se relaciona con lo encontrado por Jiang *et al.*,<sup>5</sup> que determinan que la mayor concentración de BEA en un modelo de infección *in vivo* de *B. bassiana* se encuentra alrededor de los 9 días (Fig. 2).

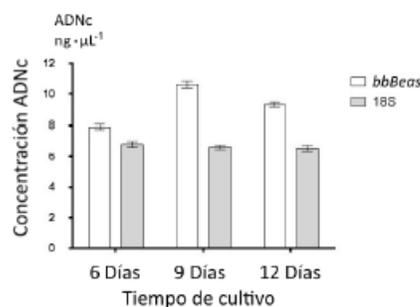


Fig. 1. Cuantificación de la expresión del gen *bbBeas* por densitometría.

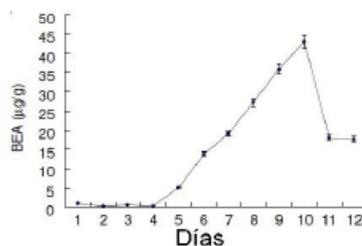


Fig. 2. Concentración de BEA en el cuerpo del gusano de seda (*Bombyx batryticatus*) infectado con *B. bassiana* (modificada de Jiang *et al.*, 2013)

**Conclusiones.** Los oligonucleótidos diseñados son adecuados para el monitoreo de los niveles de expresión del gen *bbBeas*, además existe una clara relación entre los niveles de expresión de este gen en el CMS y la producción de BEA reportada en modelos de infección *in vivo* de *B. bassiana*.

**Agradecimientos.** Se le agradece a CONACyT por el apoyo económico otorgado durante esta investigación y a la Universidad Autónoma Metropolitana.

### Bibliografía.

- Vázquez-Bonilla *et al.*, (2017) Rev. Mex. Cienc. Farm. 48:17-27.
- Wang Q & Xu L (2012) *Molecules*. 17(3): 2367-2377.
- Thomas L, Larroche C & Pandey A (2008) *Biochem. Eng. J.* 81:146-161.
- Barranco-Florido *et al.*, (2002) *Enzyme. Microb. Technol.* 30:910-915.
- Jiang X, Chen YJ & Shi LG (2013) *Chem. Asian. J.* 12:6693-6696.

**Anexo 2.** Resumen del cartel presentado en el XVIII congreso nacional de biotecnología y bioingeniería 2019



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato  
23 al 28 de junio  
**2019**

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A:

**José Norberto Vásquez Bonilla, Juan Esteban Barranco Florido, Edith Ponce Alquicira, Octavio Loera Corral**

Por su participación con la contribución en cartel:

**EXPRESIÓN DEL GEN DE LA BEAUVERICINA SINTETASA EN UN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.**

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,  
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

**Dr. Adelfo Escalante Lozada**  
Presidente de la SMBB

**Dr. Jaime Ortega López**  
Presidente del Comité Organizador

**Dra. Sylvie LeBorgne**  
Presidenta del Comité Científico

León



leon-mexico.com

**Anexo 3.** Constancia por haber presentado el cartel titulado: "Expresión del gen de la beauvericina sintetasa en un cultivo en medio sólido" presentado en el XVIII congreso nacional de biotecnología y bioingeniería 2019

## PRODUCCIÓN DE BEAUVERICINA EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO

Vásquez-Bonilla José Norberto<sup>1\*</sup>, Barranco-Florado Juan Esteban<sup>2</sup>, Ponce-Alquicira Edith<sup>1</sup>,  
Rincón-Guevara Mónica Alejandra<sup>1</sup>, Loera-Corral Octavio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología,  
México, Ciudad de México, 09340

<sup>2</sup> Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas  
Biológicos, México Ciudad de México, 04960

\*norberto.vasquez.bonilla@gmail.com

### RESUMEN

La beauvericina (BEA) es una reconocida micotoxina producida por algunos hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* e *Isaria* (ambos del Orden: Hypocreales y de la Familia: Clavicipitaceae), y fitopatógenos del género *Fusarium* (Orden: Hypocreales Familia: Nectriaceae), que posee gran variedad de actividades biológicas como antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica e insecticida; esta última probada en diferentes especies de insectos consideradas plagas agrícolas. Para la producción de BEA se ha utilizado el cultivo en medio líquido (CML) principalmente, sin embargo, el cultivo en medio sólido (CMS) es una atractiva alternativa para la producción de BEA ya que en los últimos años ha mostrado ventajas ante el CML como una mayor producción de biomasa y metabolitos secundarios. El CMS provee al microorganismo de tres fases para su desarrollo; una fase líquida, una sólida y una gaseosa que se asemejan al ambiente natural del microorganismo. El objetivo del presente trabajo fue comparar los rendimientos de producción de BEA en CMS y CML, utilizando la misma composición del medio de cultivo en ambos sistemas. Se utilizó el aislado identificado como W1185 de la especie *Fusarium oxysporum* en CMS (utilizando como soporte sólido espuma de poliuretano) y CML, ambos con un medio donde se ha observado una alta producción de BEA en CML. Después de 9 días de cultivo, se realizó la extracción de BEA utilizando metanol al 84% y baños sónicos, se purificó mediante extracción en fase sólida con cartuchos C18. La cuantificación de BEA se llevó a cabo mediante HPLC y la confirmación de la misma por espectroscopía de masas. Los resultados mostraron que la cantidad de BEA producida en CMS es más de 13 veces mayor a la cantidad producida en CML (0.5 mg/L vs 6.96 mg/L). Por lo tanto, el CMS es más eficiente para producir BEA, con mejor productividad y rendimiento por unidad de sustrato.

**Anexo 4.** Resumen del cartel presentado en el XLII congreso de control biológico 2019



**Anexo 5.** Constancia por haber presentado el cartel titulado: "Producción de beauvericina en cultivo en medio Sólido" en el XLII congreso de control biológico 2019

**PRODUCCIÓN SOSTENIDA DE BEAUVERICINA POR CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO**

José Norberto Vásquez Bonilla<sup>1</sup>; Juan Esteban Barranco Florido<sup>2</sup>; Edith Ponce Alquicira<sup>1</sup>; Octavio Loera Corral<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Doctorado en Biotecnología, <sup>2</sup>Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Ciudad de México C.P.09340. Correo electrónico del responsable del trabajo: [norberto.vasquez.bonilla@gmail.com](mailto:norberto.vasquez.bonilla@gmail.com)

Palabras clave: *Beauvericina*, *Cultivo en estado sólido*, *metabolito secundario*

**Introducción.** La beauvericina (BEA) es un metabolito secundario producido por algunos hongos entomopatógenos (HE) tales como *Cordyceps* sp. y *Beauveria bassiana*, así como hongos fitopatógenos del género *Fusarium* sp. La molécula tiene diversas actividades biológicas y mecanismos de acción de interés farmacéutico<sup>1</sup>. La mayoría de los estudios para aumentar la producción de BEA se basan en la optimización de cultivos líquidos (SmF)<sup>2</sup>, sin embargo, no se ha explorado las ventajas que tiene el cultivo en estado sólido (SSF) en la producción de BEA. El objetivo de este trabajo es determinar la cinética de producción de BEA en un SSF, usando un medio de cultivo optimizado embebido en un soporte sólido inerte.

**Metodología.** Se utilizó un medio de cultivo líquido previamente optimizado para producción de BEA<sup>2</sup>, inoculado con  $2 \times 10^5$  conidios de *Fusarium Oxysporum* AB2 por mL de medio, y embebido en cubos de 0.7mm de espuma de poliuretano (PUF), en matraces Erlenmeyer de 250mL. La PUF se lavó con 150mL de agua destilada, posteriormente el PUF con la biomasa fue sometida a baños sónicos con metanol al 84%, la purificación de la BEA se llevó a cabo usando cartuchos no polares C18. La cuantificación de la BEA se hizo desde el día 3 hasta el día 24 de cultivo mediante HPLC<sup>3</sup>. La confirmación de la molécula se llevó a cabo mediante espectroscopía de masas por electrospray (MS-ESI).

**Resultados.** La máxima producción de BEA se alcanza en el día 7 de cultivo y permanece hasta el día 11, sin cambios significativos, después de ese día comienza una disminución lenta y constante hasta el día 24, en donde hay una disminución del 19.8% respecto al máximo alcanzado en el día 7 (Fig. 1). Es el primer estudio donde la concentración más alta de BEA se mantiene durante 5 días, sin que exista una disminución significativa como ocurre en la mayoría de los metabolitos secundarios<sup>4</sup>.

Otra de las principales contribuciones es que nuestro sistema disminuye tiempos de producción, ya que alcanza el máximo de producción a los 7 días de cultivo, lo cual supera cualquier otro sistema descrito para la producción de BEA (hasta 30 días) para llegar al máximo de producción<sup>5</sup>.

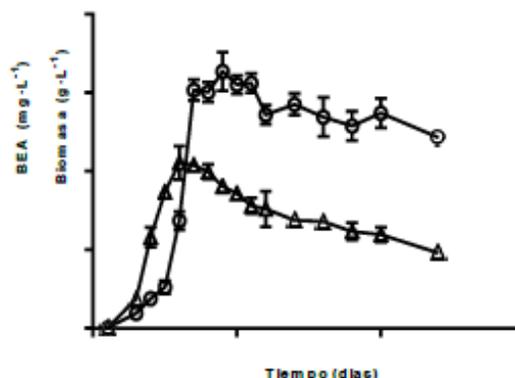


Fig. 1. Cinética de producción de BEA en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (O) y de biomasa en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\Delta$ ).

**Conclusiones.** La máxima producción de BEA se alcanza desde los 7 días de cultivo, y se sostiene sin disminución significativa hasta el día 11.

**Agradecimiento.** Se le agradece a la Universidad Autónoma Metropolitana por el financiamiento para esta investigación así como a CONACyT por la beca otorgada a José Norberto Vásquez Bonilla (745861).

**Bibliografía.**

1. Vásquez-Bonilla N, Cabrera-Vega E, Vázquez-Olvera I, Gutiérrez-Nava A, Hurtado- y de la Peña M, Barranco-Florido E (2017) *Rev Mex Ciencias Farmacéuticas* 48(4):16-26.
2. Xu L, Liu Y, Zhou L, Wu J (2010) *Biotechnol Bioprocess Eng.* 15:460-466.
3. Jiang X, Cheng Y, Shi L (2013) *World J Microbiol Biotechnol* 29:1263-1269.
4. Ascado-Valdés L, Sepúlveda J, Buenrostro-Figueroa A, Barragán A, González M, Agullar C (2018) *Emir J Food Agr* 30(9):750-757
5. Meca G, Sospedra L, Soriano J, Rittene A, Moretti A, Mafes J (2010) *Toxicol* 56:349-354.



Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería



XIX CONGRESO NACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

MODALIDAD  
VIRTUAL

27 SEPTIEMBRE - 1º OCTUBRE, 2021

OTORGA LA PRESENTE

# CONSTANCIA A:

José Norberto Vásquez Bonilla, Juan Esteban Barranco Florido, Edith Ponce Alquicira, Octavio Loera Corral

Por la presentación del e-póster:  
PRODUCCIÓN SOSTENIDA DE BEAUVERICINA POR CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO

en el XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,  
27 de septiembre - 1º de octubre, 2021

  
Dr. Jaime Ortega López  
PRESIDENTE SMBB

  
Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
PRESIDENTA COMITÉ ORGANIZADOR

  
Dr. Avaro R. Lara  
PRESIDENTE COMITÉ CIENTÍFICO

**Anexo 7.** Constancia por haber presentado el cartel titulado: "Producción sostenida de beauvericina por cultivo en estado sólido" en el XIX congreso nacional de biotecnología y bioingeniería 2021

## SIMPOSIO DE PERSPECTIVAS EN BIOTECNOLOGÍA 2021



**El Posgrado en Biotecnología de la UAM agradece a los coautores:**

Vásquez-Bonilla J.N., Barranco-Florido J.E., Ponce-Alquicira E., Loera O.

**Quienes presentaron el trabajo:**

Purificación y caracterización de la beauvericina a partir de un cultivo en estado sólido

**Modalidad Virtual  
5 de noviembre de 2021**



  
**Dr. Octavio Loera Corral**  
Coordinador del Posgrado en Biotecnología



  
**Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde**  
Directora  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Anexo 8.** Constancia por haber participado en simposio de perspectivas en biotecnología 2021 presentando el trabajo titulado: "Purificación y caracterización de la beauvericina a partir de un cultivo en estado sólido"

## SIMPOSIO DE PERSPECTIVAS EN BIOTECNOLOGÍA 2022



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa

### *Constancia de actividades de retribución social*



Institut de Recherche  
pour le Développement  
FRANCE

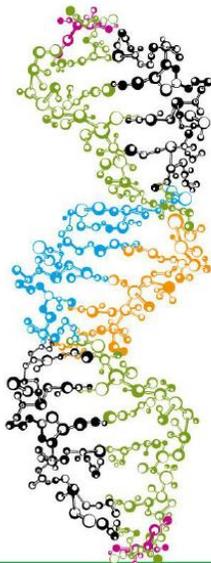
El Posgrado en Biotecnología de la UAM agradece a los coautores:

Vásquez-Bonilla José Norberto, Barranco-Flrido Juan Esteban,  
Ponce-Alquicira Edith, Loera-Corral Octavio

### Quienes presentaron el trabajo de divulgación :

Producción acelerada de una sustancia que podría disminuir el  
costo de las terapias contra el cáncer

Modalidad videos  
6 y 7 de julio de 2022



Dr. Octavio Loera Corral  
Coordinador del Posgrado en Biotecnología

Dr. José Luis Gómez Olivares  
Director  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Anexo 9.** Constancia por haber participado en el simposio de perspectivas en biotecnología 2022 presentando el trabajo de divulgación titulado: "Producción acelerada de una sustancia que podría disminuir el costo de las terapias contra el cáncer".



[Imprimir](#)

Número 358  
4 de julio de 2022

## MOLÉCULA DE CIERTOS HONGOS REDUCIRÍA COSTOS DE TERAPIAS CONTRA DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER

*\*Alumno de la UAM investiga la Beauvericina, con capacidad como insecticida y antibiótico*

*\*La meta es obtener un fármaco basado en ese compuesto para tratar también infecciones*



El maestro José Norberto Vásquez Bonilla, alumno del Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), investiga sobre la producción acelerada de la molécula Beauvericina (BEA), proveniente de algunos hongos que infectan plantas e insectos, en particular el *Fusarium oxysporum*, que podría disminuir costos de terapias contra el cáncer y otros padecimientos.

Descubierta en 1969, se le han atribuido actividades biológicas como insecticida, antibiótico, antimicótico, antiviral y, más recientemente, como agente antitumoral, por lo que se llevan a cabo diversos estudios, entre ellos el del maestro Vásquez Bonilla, enfocado en la acción antitumoral y la generación rápida del compuesto.

El propósito es la obtención a futuro de un fármaco basado en BEA para tratar infecciones bacterianas, virales y distintos tipos de cáncer, e incluso podría utilizarse en conjunto con los medicamentos habituales para potenciar su efecto o reducir las secuelas que éstos provocan.

En entrevista, el licenciado en Química Farmacéutica Biológica por la Unidad Xochimilco de la UAM añadió que busca atender un problema real de la sociedad, ya que representa una de las principales causas de muerte en el mundo, frente a la cual la química, la fisicoquímica y la biotecnología tienen mucho que aportar.

La Beauvericina suele hallarse en algunos hongos que se encuentran en la naturaleza infectando insectos y plantas y, aunque posee diferentes actividades biológicas, el interés está centrado en su capacidad anticancerígena, cobrando auge en relación con el cáncer desde el año 2000; a partir de entonces se han practicado experimentos, entre los cuales algunos que propician el crecimiento de las células cancerosas para observar la toxicidad del compuesto en éstas.

Además, se ha incrementado en forma exponencial la investigación de esa molécula y su impacto en distintos tipos de

cáncer, comprobándose sus propiedades con efectividad contra los de mama, retinoblastoma, piel, páncreas y otros, pero sobre todo en casos de cáncer de pulmón.

El doctorante explicó que BEA es bastante costosa –alrededor de mil pesos por miligramo– y debido a su complejidad no se puede sintetizar químicamente, como ocurre con la mayoría de los fármacos, por lo que debe recurrirse a técnicas biotecnológicas.

Ante estas limitaciones, su objetivo central es cultivar *Fusarium oxysporum*, con el fin de aplicar estrategias biotecnológicas para lograr BEA, por ejemplo, semejando las condiciones donde el hongo puede encontrarse en la naturaleza o sometándolo a ambientes diversos de estrés donde compita con otras especies, dándoles nutrientes y oxígeno, menos humedad.

La primera parte del proceso consiste en aumentar la producción del compuesto, probarlo en células cancerígenas y luego comparar sus efectos, individual y en conjunto con otros fármacos, con la finalidad de proponer terapias innovadoras contra el padecimiento. Esto es relevante, pues son conocidos los estragos secundarios de quimio y radioterapias, en especial la pérdida de cabello y de defensas, así como los dolores estomacales.

La combinación de BEA con otros medicamentos ayudaría a aminorar la cantidad de quimioterapias y, en consecuencia, las reacciones adversas; además serían más económicas, menos agresivas y el consumo menor de fármacos llevaría a una rápida recuperación del paciente, explicó.

Los estudios existentes hasta ahora han reportado la obtención de BEA en un mínimo de nueve días y, al alcanzar la producción máxima, se destruye en el hongo por sí misma, disminuyendo a los 13 días hasta en 50 por ciento.

Otros análisis comprenden entre dos y tres semanas e incluso hasta 28 días para crear la molécula, por lo que "mi principal contribución en este sentido" es que a los siete días se alcanza la mayor generación, que se mantiene durante cinco días, es decir, se cuenta con ese margen para extraerla y purificarla. Este conjunto de estrategias "me llevó a la producción de BEA", aun en mucho menos tiempo que lo reportado en otras investigaciones en el mundo, precisó Vásquez Bonilla.

Al aplicar todas estas técnicas biotecnológicas, el aumento en la elaboración de BEA ha sido de hasta 400 por ciento, por la vía de cultivos convencionales; la reducción del tiempo a tan sólo siete días, manteniéndose durante cinco días, convierte a este sistema en el más rápido descrito hasta ahora a nivel mundial, expuso el maestro en Ciencias Farmacéuticas por la Unidad Xochimilco.

El siguiente paso en su trabajo –publicado en la revista especializada *Mycotoxin Research*– es realizar las pruebas para combinar BEA con sustancias anticancerígenas –que son por sí mismas mucho más caras que dicha molécula– con la finalidad de determinar si la multiplicación de las células cancerosas se detiene o si el tamaño de los tumores disminuye, empleando menos cantidad de la sustancia anticancerígena, lo que a su vez reduciría las drásticas secuelas de la mayoría de fármacos dispuestos para las quimioterapias.

En particular "iniciaré con la combinación de BEA y cisplatino, ampliamente utilizado contra el cáncer de pulmón" para ver si arroja potenciales consecuencias en células cancerígenas y si con menos cantidad de ambos se logra el efecto deseado, con lo cual "estaríamos más cerca de contar con terapias más accesibles, eficaces" y menos severas para quienes las necesitan.

Vásquez Bonilla indicó que hasta el momento hay sólo dos proyectos en el mundo que han llegado a etapas en las que BEA haya sido probada con tumores en ratas, pero esta labor científica es todavía amplia y faltan muchos años para seguir indagando esta molécula, hacer análisis en otros animales y, en el futuro, obtener un nuevo medicamento contra el cáncer.

Para ello sería necesario que una empresa se interese en la molécula y emprenda los ensayos pertinentes con personas, antes de que pueda considerarse un fármaco innovador contra distintos tipos de cáncer.

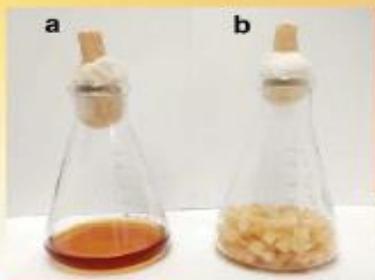
La biotecnología "es la ciencia del futuro" porque con seguridad va a ayudar a la sociedad a enfrentar problemas de escasez de alimentos, contaminación medioambiental y salud, como el cáncer, cuyo número de casos va a crecer y será necesario innovar en terapias contra la enfermedad, por lo que esta investigación va en ese camino.

El Doctorado en Biotecnología de la Unidad Iztapalapa de la UAM está incorporado en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad y esto significa que cubre ciertos requisitos, entre ellos contar con docentes altamente calificados, planes académicos de excelencia y una infraestructura adecuada de laboratorios. Debido a esto, tanto en el nivel de Maestría como en el de Doctorado puede llevarse a cabo indagación de punta que cumple y atiende asuntos que impactan a la sociedad.



**Anexo 10.** Artículo de divulgación titulado: "Molécula de ciertos hongos reduciría costos de terapias contra distintos tipos de cáncer" publicado en Boletines UAM. Julio 2022.

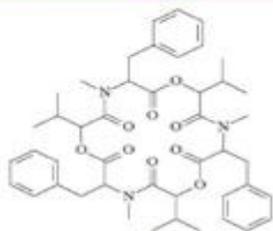
## Molécula Beauvericina podría reducir los costos de terapia contra algunos tipos de cáncer



a. Cultivo convencional de producción de BEA.  
 b. Sistema desarrollado por el Mtro. Vázquez-Bonilla.



Hongos productores de BEA a la izquierda (color rojo) a natural (*Fusarium oxysporum*) y a la derecha (color blanco) a artificial (*Epicothium nigricans*). Ambos utilizados por el Mtro. Vázquez-Bonilla para producir BEA.



**Fuente:**  
 Semanario UAM  
 Molécula Beauvericina (BEA) Tomada de Wang & Xu, 2012  
**Asesor:**  
 Mtro. José Norberto Vázquez Bonilla  
 UAM Iztapalapa

Desde el año 1969 se ha estudiado a la molécula Beauvericina y a partir del año 2000 han prosperado las investigaciones acerca de su capacidad anticancerígena contra el cáncer de pulmón, mama, colon, páncreas, piel, retinoblastoma y otros.

La molécula Beauvericina (BEA) proviene de algunas especies de hongos que pueden infectar a insectos y plantas. La BEA funciona como agente antiviral, insecticida, antimicótico, antibiótico y antitumoral. Estas dos últimas cualidades han sido investigadas por el Mtro. José Norberto Vázquez Bonilla, estudiante del doctorado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El maestro Vázquez Bonilla investiga sobre esta molécula enfocándose en la generación más eficiente y rápida de BEA y en su acción antibiótica y antitumoral de dicha molécula, con el propósito de que los resultados de su investigación sean la obtención de un fármaco que funcione en el tratamiento de infecciones bacterianas y de distintos tipos de cáncer, y poder ser usada como complemento de los medicamentos anticancerígenos actualmente utilizados y así reducir las secuelas de estos.

La obtención de BEA es bastante costosa, afirmó el maestro Vázquez, por lo que se vende en aproximadamente mil pesos cada miligramo y dadas sus particularidades no es posible sintetizarla químicamente, como la mayoría de los medicamentos actuales. Por esto, su investigación se centra en cultivar *Fusarium oxysporum*, un hongo productor de BEA, con el propósito de aplicar estrategias biotecnológicas, las cuales se asemejan a las condiciones del hongo en la naturaleza para así obtener BEA de una manera más económica, rápida y expedita.

En la fase inicial de esta estrategia, se aumenta la producción del compuesto, se acortan los tiempos de producción, se prueba en células cancerígenas y en bacterias de interés clínico, después se comparan sus efectos de manera individual y con otros fármacos. La finalidad es proponer terapias innovadoras contra el cáncer que minimicen el uso de otros fármacos, lo que reduciría el costo y llevaría a una recuperación en menor tiempo. Por ejemplo, la combinación de BEA con otros medicamentos ayudaría a aminorar la cantidad de quimioterapias y, a su vez, tener menos efectos secundarios como lo son la pérdida de cabello y la baja de defensas.

La principal contribución hasta ahora del Mtro. Vázquez es la disminución de los días de producción de BEA de tan solo 7 días aplicando diversas técnicas biotecnológicas en comparación con otros estudios que pueden llegar a tardar hasta 28 días en producir, posicionando su método de producción como el más rápido a nivel mundial. Esta investigación ha sido publicada recientemente en la revista científica "Mycotoxin Research" la cual posee reconocimiento internacional.



La Dirección de Comunicación del Conocimiento,  
de la Universidad Autónoma Metropolitana,  
otorga la presente constancia al:

**Mtro. José Norberto Vásquez Bonilla**

Por su asesoría en la revisión del artículo:  
**Molécula Beauvericina podría reducir  
los costos de terapia contra algunos  
tipos de cáncer**

publicada el 6 de agosto de 2022.



Dr. Mario Andrés De Leo Winkler  
Director de Comunicación del Conocimiento



Lic. Miriam Carrillo Baragán  
Jefa de Fomento del Conocimiento

**Anexo 12.** Constancia por haber participado como asesor en la revisión del artículo titulado “Molécula Beauvericina podría reducir los costos de terapia contra algunos tipos de cáncer”

# HONGOS SERÍAN CURA DEL CÁNCER

## Alumno de la UAM investiga la Beauvericina, una molécula del hongo que tiene sustancia antitumoral

Verónica Lago

En la vida los hongos son malos, y prueba de ello es el Aspergillus que produce una toxina que afecta a diversos órganos y a los ojos de quienes se exponen, de hecho que en un campo de fútbol, por lo que puede estar por eso el Aspergillus. Uno de ellos, Beauvericina, es el que se estudia.

El investigador se recibió el doctorado en la UAM y ahora es profesor de la UAM, además del doctorado en el extranjero de la Universidad de California en Berkeley. Su tesis de doctorado se titula "Efectos de la Beauvericina BBO en células del tejido conectivo humano y sus efectos en la proliferación de células cancerosas".

Anticancerígena, antiinflamatoria y antiangiogénica, la Beauvericina ha demostrado en estudios que tiene actividad biológica como anticancerígena, antiinflamatoria, antiangiogénica, antiapoptótica y antiapoptótica, ya que se le ha atribuido efectos similares a los que se le atribuyen a la quimioterapia.



En la UAM se trabaja en la producción de la sustancia Beauvericina.

### UN VISTAZO

La combinación de BBO con otros medicamentos ayuda a aminorar la cantidad de quimioterapia y sus efectos secundarios, incluso mejorando la calidad de vida de los pacientes. El uso de BBO en combinación con otros medicamentos puede ser una opción viable para el tratamiento de pacientes con cáncer.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos. Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.



Con la Beauvericina, se ha obtenido una molécula que tiene actividad antitumoral, antiinflamatoria, antiangiogénica y antiapoptótica, como se puede observar.



José Yáñez, investigador de la UAM.



# EN UNA SEMANA BATE RÉCORD

## El investigador logró crear la molécula Beauvericina en 7 días, una contribución de la UAM

Hasta la fecha, para crear esta molécula se lleva de 2 a 3 semanas con lo que la principal contribución de la UAM es el tiempo en el que se logró crear la molécula, ya que se logró en una semana.



Trabajando sobre la producción de la molécula Beauvericina.

José Yáñez ha sido reconocido por su contribución a la ciencia.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

La producción de esta molécula es un hito para la UAM.

El tiempo en el que se logró crear la molécula es un récord.

# Hongo vence el papiloma humano

## Reducción de la incidencia de cáncer de cuello uterino

Un estudio reciente ha demostrado que el uso de la Beauvericina BBO en combinación con otros medicamentos puede ser una opción viable para el tratamiento de pacientes con cáncer de cuello uterino.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.

Los resultados de estos ensayos se publicarán próximamente.

El uso de un fármaco basado en BBO para tratar pacientes con cáncer de cuello uterino, como el melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, se está estudiando en ensayos clínicos.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00273

Matrícula: 2183802102

Mejoramiento en la producción de beauvericina en cultivo sólido para su uso como agente antimicrobiano

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 4 del mes de noviembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA  
DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA  
DR. CESAR ESPINOZA RAMIREZ  
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: JOSE NORBERTO VASQUEZ BONILLA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE NORBERTO VASQUEZ BONILLA  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL

DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA

VOCAL

DR. CESAR ESPINOZA RAMIREZ

SECRETARIO

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ