



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BÚSQUEDA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO EN
MICROORGANISMOS ENDÓFITOS DE *Amphipterygium adstringens*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. KAROL RODRÍGUEZ PEÑA

TUTOR: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
INSTITUTO DE QUÍMICA

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Secretario: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Vocal: Dr. Daniel Genaro Segura González

Vocal: Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo

Vocal: José Adelfo Escalante Lozada

Tutor:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Sustentante:

M en C. Karol Rodríguez Peña

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 161183 otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado, y por el apoyo financiero de los proyectos DGAPA, UNAM PAPIIT IN-202219, al Programa NUATEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y al proyecto CONACyT número INFR-2017-01 279880, que permitió la adquisición de los resultados TOF-MS.

Al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Unidad de Administración del Posgrado (UAP) de la UNAM por el apoyo otorgado.

A mi tutor, el Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por la orientación, comprensión, amistad y apoyo durante la elaboración de este trabajo de tesis y durante todo el posgrado. Así mismo a la Dra. Beatriz Ruíz Villafán por sus atenciones, su guía y soporte en todo momento en el laboratorio y fuera de él.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por su tiempo, dedicación apoyo incansable, orientación constante y generosidad durante todo el tiempo del posgrado. Gracias por su bella amistad y por compartir su laboratorio, equipo y conocimientos conmigo. De igual manera a sus alumnos Lore, Rosita, Mónica, Rodrigo, Gonzalo, Marbella, etc., quienes en todo momento me ayudaron y orientaron durante el desarrollo de la parte química de este trabajo.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja, por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo, por su orientación personal y profesional, así como su apoyo constante. A sus alumnos, particularmente a Silvia Armenta y Silvia Andrea por sus palabras, apoyo y sugerencias en momentos de crisis.

A la Dra. Leticia Rocha Zabaleta, por compartir conmigo todo su conocimiento sin límites, por siempre sugerir y aportar puntos valiosos en este trabajo, ofreciendo siempre todo lo necesario para llevarlo a cabo. Agradezco también a su equipo, principalmente a la M en C. Cecilia Aguilar Zacarías quien en todo momento me ayudó con técnicas, células, procedimientos, etc. así como brindándome su bella amistad. A Liliana y Ela, gracias por todo su apoyo.

Al Ing. Abel Blancas Cabrera y el M. en B. Jesús Villegas Cruz de la Unidad de Bioprocesos de Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por su participación y ayuda en la fermentación en biorreactor, así como al Dr. Mauricio Trujillo por las facilidades de uso de la Unidad.

A mis alumnas que participaron en estancias de investigación en este proyecto: Gabriela Sánchez Ruiz, Regina González Moguel, Lourdes Tovilla Coutiño, Miriam Trenado Uribe y Diana Marisol Vázquez Enciso. Porque ellas aportaron en algún momento en resultados de este trabajo, y su participación siempre resultó muy valiosa.

A la Dra. Kalina Bermúdez Torres y al personal del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN) por su asesoría y apoyo en la colecta de las muestras de las plantas.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco del ICMYL-UNAM, por apoyo en la realización de las micrografías electrónicas de barrido.

A la Bióloga Rosalinda Medina Lemos del Instituto de Biología de la UNAM por la identificación de las plantas colectadas.

A la Dra. Nuria Estrau Escofet y la Dra. Beatríz Quiroz García por las facilidades y toma de muestras en los equipos de RMN, a la Dra. María de la Paz Orta por los estudios de FTIR, a la Dra. Lucero Ríos y la Dra. Carmen Márquez por los estudios de CLAR-MS, todas ellas del Instituto de Química, UNAM.

Al E. B. Marco Antonio Ortiz Jiménez por la preservación de las cepas de las actinobacterias, el Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su ayuda, orientación y adquisición de las imágenes de microscopía óptica, a la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por su apoyo en el análisis de las muestras en el UPLC-TOF-MS y a la Dra. Roxana Olguín y Dra. Andrea Bedoya del LabNaCit por su ayuda en la adquisición de resultados de las citometrías de flujo, todos estos desarrollados en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. También a María Paula Gómez Román por la actualización del estudio Antismash aquí presentado.

A mis compañeros del Laboratorio C-106: Monse, Brenda, Brendita, Allan Muffin, Marianneee, Silvia, Diana y Dianita, Bety, Colombiana, Victor, muchos que van y vienen y siempre aportan algo bello, constantemente en pro de ayudar, aprender y divertirnos, a mis compañeras que también llegaron a ser niñeras, gracias siempre.

A mi mana mana Silvia Margarita Guzmán Trampe 🐦 cuyo sello está puesto en esta tesis, apasionada por la ciencia y gran amiga. Gracias por todo.

A mi familia Katia, Marian y David, por esos tiempos robados para la realización de este trabajo, por su entusiasmo y amor para que todos podamos realizar nuestros sueños. A mis padres Juanita Peña y Salvador Rodríguez alias Gutty, porque su ejemplo y tenacidad me enseñaron a esforzarme y concluir mis metas. Finalmente, a todos mis amigos de vida, que me acompañan, aconsejan, guían y respetan mi ser y mis decisiones, especialmente a Anita Labastida y Yenny Gómez, gracias por existir.

Dedicatoria:

A Marian Y Katia

La inspiración y felicidad de mi vida

A mis padres Juanita y Guty

mi ejemplo, mi orgullo

A Silvia y Martina de la Cruz

mis ángeles

Si no puedes volar, entonces corre, si no puedes correr entonces camina, si no puedes caminar entonces gatea, pero hagas lo que hagas tienes que seguir adelante. - Martin Luther King, Jr.

Índice

Índice de Figuras	10
Índice de Cuadros	14
Lista de abreviaturas	15
RESUMEN	18
ABSTRACT	20
1. Introducción	22
2. Antecedentes	24
2.1. Productos Naturales	24
2.1.1. Productos naturales bioactivos	24
2.1.2. Productos naturales como agentes anitcancerígenos	25
2.1.3. Los microorganismos como fuente de obtención de productos naturales bioactivos.....	26
2.2. Endófitos.....	27
2.2.1. Microorganismos endófitos como productores de metabolitos secundarios	29
2.2.2. Bacterias endófitas y sus compuestos bioactivos	33
2.3. El Cuachalalate – <i>Amphipterygium adstringens</i>	35
2.4. Cáncer	36
2.4.1. Agentes quimioterapéuticos	37
2.4.2. Antraciclinas y sus mecanismos de acción	41
2.5. Historia de las estefimicinas, sus derivados, actividades y biosíntesis	43
3. Justificación	50
4. Hipótesis	50
5. Objetivos	51
5.1. Objetivo general	51
5.2. Objetivos Particulares	51
6. Metodología.....	52
6.1. Recolecta del material vegetal	52
6.2. Tratamiento de muestras y aislamiento de endófitos.....	52
6.3. Descripción morfológica de hongos endófitos y su conservación	53
6.4. Caracterización y evaluación de actinobacterias endófitas	53
6.4.1. Caracterización molecular de actinobacterias endófitas.....	53
6.4.2. Caracterización microscópica de las actinobacterias endófitas.....	54
6.4.3. Crecimiento de las actinobacterias endófitas en diferentes medios de cultivo y su actividad antibiótica por el método de estría	55
6.4.4. Cinéticas de crecimiento y obtención de sobrenadantes.....	56

6.4.5. Fermentación y obtención de extractos orgánicos de las actinobacterias endófitas	56
6.4.6. Ensayo de actividad antibiótica por concentración mínima inhibitoria	56
6.5. Cultivo de líneas celulares	57
6.6. Evaluación de citotoxicidad <i>in vitro</i> y cálculo del valor de CI_{50}	58
6.7. Ensayo biodirigido para el aislamiento de los compuestos citotóxicos de la cepa <i>Embleya</i> sp. NF3	59
6.7.1. Fraccionamiento preliminar de los extractos orgánicos	59
6.7.2. Fermentación en biorreactor de la cepa <i>Embleya</i> sp. NF3.....	59
6.7.3. Obtención de extractos orgánicos y fraccionamiento químico por métodos cromatográficos	60
6.7.4. Aislamiento y purificación de las estefimicinas y estefimicinonas	60
6.7.5. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados	61
6.8. Evaluación de la actividad biológica en células MCF-7	61
6.8.1. Determinación de la actividad de la StefB por citometría de flujo.....	61
6.8.2. Ensayo de proliferación celular por western blot	62
6.8.3. Evaluación de senescencia y cambios morfológicos	63
6.9. Análisis estadístico	63
7. Resultados	64
7.1. Identificación de la planta hospedera.....	64
7.2. Aislamiento de microorganismos endófitos.....	64
7.3. Caracterización molecular de las actinobacterias endófitas	66
7.4. Caracterización microscópica de las actinobacterias endófitas, su crecimiento y actividad antibiótica en diferentes medios de cultivo.....	69
7.5. Efecto en la proliferación o muerte celular de los sobrenadantes de las actinobacterias aisladas.	72
7.6. Cinética de crecimiento de las actinobacterias	74
7.7. Análisis por cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos.....	75
7.8 Actividad antibiótica por concentración mínima inhibitoria de los extractos orgánicos de las actinobacterias	76
7.9. Evaluación citotóxica de extractos orgánicos de las actinobacterias endófitas.....	77
7.10. Bioprospección del extracto de <i>Embleya</i> sp. NF3	78
7.10.1. Evaluación preliminar de la actividad citotóxica de los compuestos mayoritarios	78
7.10.2. Evaluación del método de extracción en la fermentación a gran escala	80
7.10.3. Fermentación y evaluación del extracto orgánico.....	81
7.10.4. Fraccionamiento químico biodirigido.....	82
7.11. Caracterización química de los compuestos aislados	88
7.11. 1. Esfefimicina B (1)	90

7.11. 2. Esfefimicina C (2)	94
7.11. 3. 8-demetoxiestefimicina B (3).....	96
7.11.4. 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4).....	98
7.11. 5. 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona (5)	100
7.11. 6. 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona (6)	102
7.11.7. 7-deoxiestefimicinona (7a) y 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona (7b).....	104
7.12. Actividad citotóxica de compuestos aislados	111
7.13. Evaluación de la actividad de la StefB por citometría de flujo	113
7.14. Proliferación celular, senescencia y cambios morfológicos de StefB (1) en células MCF-7	115
8. Discusión.....	118
9. Conclusiones	130
10. Perspectivas	132
11. Bibliografía.....	134
12. ANEXOS.....	146
ANEXO 1. Recopilación del descubrimiento de las estefimicinas y estefimicinonas a lo largo del tiempo.	146
ANEXO 2. Secuencias del gen 16S rRNA de las actinobacterias	148
ANEXO 3. Estudio Antismash del genoma de la cepa NF3.....	150
ANEXO 4. Artículo publicado.	151
OTRAS PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO:	162

Índice de Figuras

Figura 1. Diferentes mecanismos de colonización de los endófitos en la planta hospedera. La transmisión vertical se presenta cuando los endófitos pasan de generación en generación por medio de las semillas, mientras que la transmisión horizontal se presenta de diversas formas en la planta (modificado de Arora y Ramawat, 2017).	28
Figura 2. Actividad de los agentes quimioterapéuticos antineoplásicos dependiendo de la fase del ciclo celular (modificada de De Almeida <i>et al.</i> , 2005).	38
Figura 3. Estructuras químicas de algunas moléculas utilizadas como anticancerígenos (Modificado de Snape, 2013).	39
Figura 4. Principales tratamientos contra el cáncer durante las pasadas décadas (modificado de Bailly, 2009).	40
Figura 5. Estructura base de las estefimicinas donde las letras R representan los sitios en la molécula que tienen variaciones en las diferentes estefimicinas y estefimicinonas (Imagen propuesta a partir de la revisión de las estefimicinas conocidas hasta este momento).	44
Figura 6. Ejemplares de <i>Amphipterygium adstringens</i> depositados en el Herbario Nacional de la UNAM. a) Árbol masculino, b) Árbol femenino	64
Figura 7. Distribución por porcentaje de los microorganismos aislados de <i>A. adstringens</i> por área muestreada, el medio de cultivo del cual se aisló y la colecta en la que se encontró.	65
Figura 8. Árbol filogenético de la cepa <i>Embleya</i> sp. NF3 utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei. Los valores de bootstrap fueron calculados de 1,000 remuestreos y los valores arriba del 50% se muestran con un recuadro naranja. <i>J. jiangxiensis</i> representa al grupo externo.	67
Figura 9. Árbol filogenético de las cepas de <i>Actinoplanes</i> sp. YF4, TFC3 y TMC5 utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei. Los valores de bootstrap fueron calculados de 1,000 remuestreos y los valores arriba del 50% se muestran con un recuadro naranja. <i>C. minutisporangium</i> representa al grupo externo.	68
Figura 10. Micrografías de endófitos. a) <i>Embleya</i> sp. NF3, b) <i>Actinoplanes</i> sp. YF4, c) <i>Actinoplanes</i> sp. TFC3 y d) <i>Actinoplanes</i> sp. TMC5. La columna 1 contiene micrografías tomadas en microscopio estereoscópico (X250), la columna 2 muestra imágenes adquiridas en un microscopio óptico (X1000) y las columnas 3, 4 y 5 son micrografías obtenidas en un microscopio electrónico de barrido cuyos aumentos se muestran en cada imagen.	72
Figura 11. Efecto en la proliferación de células MFC-7 de: a) Los sobrenadantes de las actinobacterias fermentadas por 8 días en diferentes medios de cultivo; b) Controles utilizados: medios del cultivo sin inóculo, fármacos citotóxicos como controles positivos, DMSO como vehículo de los fármacos y como control negativo las células sin ningún tratamiento. Las líneas punteadas indican el crecimiento de las células sin tratamiento.	73
Figura 12. Cinéticas de crecimiento de las actinobacterias aisladas en medio ISP-2, mostrando resultados de biomasa \blacklozenge y pH \blacksquare .	75
Figura 13. CCF de los extractos orgánicos de diclorometano (D) y acetato de etilo (A) de las actinobacterias aisladas y del medio de cultivo sin microorganismo (ISP-2), eluida con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (80:20) y observada a a) λ 365 nm y b) λ 254 nm.	76

Figura 14. CCFP de los extractos orgánicos de CH ₂ Cl ₂ (D) y AcOEt (A) de <i>Embleya</i> sp. NF3 eluida con CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10) y observadas a λ 365 nm.	79
Figura 15. CCF eluída con 85:15 CH ₂ Cl ₂ :MeOH de los extractos obtenidos a partir de la biomasa (B), sobrenadante (S) y la mezcla de ambos (C) utilizando solo diclorometano (D), sólo acetato de etilo (A), S primero con D y posteriormente con A (D+A) y el control del medio utilizado ISP-2 observados a: a) λ 365 nm y b) λ 254nm.	80
Figura 16. Cinética de crecimiento de la fermentación en biorreactor de la cepa <i>Embleya</i> sp. NF3 en medio ISP-2, mostrando resultados de biomasa \blacklozenge y pH \blacksquare	81
Figura 17. Perfil químico mediante CCF del extracto orgánico total (Br) de la fermentación de <i>Embleya</i> sp. NF3 empleando distintas fases móviles: a) Hex:CH ₂ Cl ₂ (1:1); b) CH ₂ Cl ₂ :MeOH (98:2); c) CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1); d) Monitoreo de las fracciones obtenidas del fraccionamiento en cromatografía en columna abierta; e) Grupos de fracciones primarias 4, 5, 6 y 7 en CH ₂ Cl ₂ :MeOH (96:4); f) Grupos de fracciones primarias 12, 13 y 14 en CH ₂ Cl ₂ :MeOH:Ac Acético (85:5:10). Placas observadas a λ 365 nm.	82
Figura 18. Perfil cromatográfico por CLAR de la fracción primaria activa 4.	85
Figura 19. Placas de CCF del aislamiento de compuestos de la fracción primaria 4. a) CCF preparativa CH ₂ Cl ₂ :MeOH 99:1 observada a 365 nm, b) observada a 254 nm y c) CCF de la banda 2-3 eluída a CH ₂ Cl ₂ :MeOH 96:4 revelada con H ₂ SO ₄	86
Figura 20. Cromatografía en capa fina de la unión de las fracciones 6 y 7, eluidas con CH ₂ Cl ₂ :MeOH (96:4) observada a λ 365 nm.	88
Figura 21. Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de la estefimicina B (1).	90
Figura 22. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la estefimicina B (1).	91
Figura 23. Estructura química de la estefimicina B (1) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	92
Figura 24. Estudio comparativo TOF-MS entre a) el compuesto 1 purificado en este trabajo y b) el estándar comercial de la estefimicina B.	92
Figura 25. Espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz, DMSO-d ₆) de la estefimicina C (2).	94
Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, DMSO-d ₆) de la estefimicina C (2).	95
Figura 27. Estructura química de la estefimicina C (2) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	95
Figura 28. Espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz, DMSO-d ₆) de la 8-demetoxiestefimicina B (3).	96
Figura 29. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, DMSO-d ₆) de la 8-demetoxiestefimicina B (3).	97
Figura 30. Estructura química de la 8-demetoxiestefimicina B (3) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	97
Figura 31. Espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz, DMSO-d ₆) de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4).	98
Figura 32. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, DMSO-d ₆) de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4).	99

Figura 33. Estructura química de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	99
Figura 34. Espectro de RMN- ¹³ C (700 MHz, DMSO-d ₆) de la 8-demetoxi-10-deoxi estefimicinona (5).	100
Figura 35. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, DMSO-d ₆) de la 8-demetoxi-10-deoxi estefimicinona (5).	101
Figura 36. Estructura química de la 8-demetoxi-10-deoxi estefimicinona (5) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	101
Figura 37. Espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz, DMSO-d ₆) de la 7-deoxi-8-deoxiestefimicinona (6).	102
Figura 38. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, DMSO-d ₆) de la 7-deoxi-8-deoxiestefimicinona (6).	103
Figura 39. Estructura química de la 7-deoxi-8-deoxiestefimicinona (6) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	103
Figura 40. Espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz, DMSO-d ₆) de la mezcla de compuestos 7-deoxiestefimicinona (7a) y la 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona (7b). Las señales sin asterisco representan a la molécula 7a y las señales marcadas con un asterisco a la 7b	104
Figura 41. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, DMSO-d ₆) de la mezcla de compuestos 7-deoxiestefimicinona (7a) y la 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona (7b). Las señales sin asterisco representan a la molécula 7a y las señales marcadas con un asterisco a la 7b	105
Figura 42. Estructura química de la 7-deoxiestefimicinona (7a) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	106
Figura 43. Estructura química de la 7-deoxi-10deoxiestefimicinona (7b) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.	106
Figura 44. Número de células vivas después de los tratamientos con los compuestos aislados de <i>Embleya</i> sp. NF3, evaluados a 6.25 µg/mL en células MCF-7, así como células sin tratamiento. Las barras indican el error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey, las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, ANOVA F _(8,18) =285, P<0.05.	113
Figura 45. Determinación del efecto de la StefB (1) en células MCF-7 mediante citometría de flujo con Anexina V a diferentes tiempos de contacto. Cuadrantes Q1=apoptosis temprana, Q2=apoptosis tardía, Q3=necrosis, Q4=células vivas.	114
Figura 46. Efecto de los compuestos 1-6 a una concentración de 6.25 µg/mL en células MCF-7 evaluado mediante citometría de flujo con Anexina V y 7AAD a 48 horas de contacto.	115
Figura 47. Análisis por western blot de la expresión del marcador de proliferación celular PCNA en células MCF-7 tratadas con StefB (1). Se incluye la detección de GADPH como un control interno.	115
Figura 48. Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica inversa X20 de células MCF-7 tratadas con StefB (1) mostrando cambios morfológicos y células teñidas con β-galactosidasa.	116

Figura 49. Micrografía de los cristales de la StefB (1) obtenida en microscopía inversa X20 a 2 horas de haber sido colocado en medio acuoso (RPMI) con células MCF-7. 117

Figura 50. Propuesta de parte de la ruta metabólica de la StefB en *Enbleya* sp. NF3 basada en los compuestos químicos identificados. 127

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Caracterización de las actinobacterias en diferentes medios de cultivo y su antibiosis por el método de estría.	70
Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria de los extractos orgánicos de las actinobacterias crecidas en medio ISP-2.	77
Cuadro 3. Efecto citotóxico de los extractos orgánicos de las actinobacterias crecidas en medio ISP-2.	78
Cuadro 4. Ensayo preliminar para evaluar cualitativamente la citotoxicidad de diferentes fracciones de los extractos orgánicos de la cepa <i>Embleya</i> sp. NF3.	79
Cuadro 5. Efecto citotóxico del extracto orgánico obtenido de la fermentación en biorreactor de <i>Embleya</i> sp. NF3.	81
Cuadro 6. Fraccionamiento primario del extracto orgánico de la fermentación en biorreactor de <i>Embleya</i> sp. NF3.	83
Cuadro 7. Efecto citotóxico de las fracciones primarias del extracto orgánico de <i>Embleya</i> sp. NF3.	84
Cuadro 8. Análisis CLAR-UV-MS-ESI de la fracción primaria activa 4.	85
Cuadro 9. Metabolitos secundarios aislados a partir de la actinobacteria endófito <i>Embleya</i> sp. NF3.	87
Cuadro 10. Constantes espectroscópicas de UV-Vis, IR y espectrométricas TOF-MS de los compuestos aislados.	89
Cuadro 11. Solubilidad de compuestos purificados en diversos solventes.	93
Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C de los compuestos 1-7a y 7b	107
Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H de los compuestos 1-7a y 7b	108
Cuadro 14. Datos espectroscópicos de las correlaciones heteronucleares HMBC de los compuestos 1-7a y 7b	110
Cuadro 15. CI ₅₀ de la actividad citotóxica de la StefB (1) en diferentes líneas celulares.	112

Lista de abreviaturas

7AAD	7-amino-actinomicina D
AA	Agar agua
AcOEt	Acetato de etilo
APC	Aloficocianina, lee a 660 nm
ATCC	American type culture collection
B	Biomasa
BAPT	Bacclin amino fenilpropanol transferasa
<i>br. s</i>	Señal de singulete ancho
°C	Grados celcius
C	Biomasa y sobrenadante juntos
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CCF	Cromatografía de capa fina
CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
CCNS	Fármacos ciclo celular no específicos
CCS	Fármacos ciclo celular específicos
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno/Diclorometano
CH ₃ COONa	Acetato de sodio
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CLF	Factor de alargamiento de cadena
cm	centímetros
CO ₂	Bióxido de carbono
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear
CYC	Ciclasas
<i>d</i>	Señal doble
DBPN	Derivado biológico de producto natural
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
DGAPA	Dirección general de asuntos del personal académico
DGPN	Derivado de un producto natural obtenido de modificaciones genéticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleótido
DQPN	Derivado químico de producto natural
DOXO	Doxorrubicina
eV	Electrón volts
ESI	Ionización por electrospray
FeCl ₃	Cloruro férrico
FDA	Food and drug administration
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
Fx	Fracción
g	Gramos
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GGPP	Pirofosfato de geranylgeranilo
h	Horas
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KR	Cetorreductasas

KS	Cetosintasas
L	Litro
m	metro
<i>m</i>	Señales múltiples
M ⁺	Ion molecular
<i>m/z</i>	Unidades de masa carga
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MeOH	Metanol
Mg	Miligramo
MHz	Megahertz
MIC	Concentración mínima inhibitoria
min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhousser Enhancement Spectroscopy
NRPS	Sintetasas de péptidos no ribosomales
NUATEI	Programa nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas
PAPIIT	Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
pH	Potencial de hidrógeno
PKS	Policétido sintasas
PM	Peso molecular
PN	Producto natural
ppm	Partes por millón
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
<i>q</i>	Señal quintuple
rRNA	RNA ribosomal
RE	Receptor de estrógenos
Rha	Ramnosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
R.T.	Tiempo de retención
s	Segundo
<i>s</i>	Señal simple
S	Sobrenadante
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sp.	Especie no identificada plenamente
Stef	Estefimicina
STR	Streptocidina sintasa

t	Señal triple
TBS	Buffer de tris salino
THG	Transferencia horizontal de genes
TIA's	Alcaloides indol terpenoides
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tiempo de vuelo
UAP	Unidad de Administración del Posgrado
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
v_{max}	Frecuencia máxima
Vis	Visible
v/v	volumen/volumen
vvm	Volumen de aire/volumen de medio • minuto

RESUMEN

Este proyecto se realizó con la finalidad de aislar y purificar microorganismos endófitos de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) que fueran capaces de producir metabolitos secundarios con actividad citotóxica. De entre los endófitos aislados se identificaron cuatro actinobacterias mediante la secuenciación y análisis del gen 16S rRNA. Esta clase de bacterias son características por la alta capacidad que tienen de producir compuestos bioactivos. Tres de las cepas pertenecen al género *Actinoplanes* (TFC3, TMC5 y YF4), mientras que el cuarto fue identificado como *Embleya* sp. NF3.

Aunque *Embleya* es un género descrito recientemente, se conocen dos especies que lo conforman: *Embleya hyalina* (antes *Streptomyces hyalinum*) y *Embleya scabrispora* (descrita previamente como *Streptomyces scabrisporus*), la primera con reportes de producción de nibomicina y deoxinibomicina ambos compuestos con actividad antibiótica. La segunda tiene reportes de compuestos citotóxicos bioactivos, todos ellos incoloros. Los extractos orgánicos de la cepa NF3 mostraron esta actividad en compuestos de color amarillo no antes descritos para este género, evaluados contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), de cáncer cervicouterino (HeLa) y menor actividad contra una línea no cancerosa de queratinocitos (HaCaT). Se logró la caracterización química de 8 compuestos pertenecientes a la familia de las estefimicinas y estefimicinonas, siendo 4 de estas moléculas conocidas: la estefimicina B (StefB), la estefimicina C (StefC), la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona y la 7-deoxiestefimicinona. Así mismo se caracterizaron cuatro nuevos productos naturales pertenecientes a la misma familia de compuestos: 8-demetoxiestefimicina B, la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B, la 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona y la 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona. La StefB resultó ser el compuesto mayoritario.

En la evaluación citotóxica de los compuestos identificados contra células de cáncer de mama MCF-7 se observó que el grupo metoxilo del C-8 de las estefimicinas es importante para la actividad mientras que la StefB resultó ser el que tuvo mayor actividad citotóxica. La concentración inhibitoria media de este metabolito fue evaluada contra de la línea MCF-7 y células de cáncer de mama muy resistentes denominadas triples negativas: HCC1806, HCC70 y DU4475 (valores de CI_{50} de 2.56, 18.2, 0.79 y 4.81 μ M, respectivamente), interesantemente este compuesto mostró menor actividad contra la línea de queratinocitos HaCaT (CI_{50} 156 μ M) con respecto a las líneas celulares de cáncer y también en relación con la doxorubicina (4.67 μ M). También se encontró que la StefB 2.56 μ M (CI_{50} en células MCF-7) disminuyó la

expresión del antígeno nuclear de proliferación celular PCNA, indujo cambios morfológicos y apoptosis en células MCF-7, lo cual aumenta con el tiempo de contacto con el compuesto, soportando que la StefB puede ser un fármaco promisorio para el tratamiento de cáncer de mama.

ABSTRACT

This project was carried out to isolate and purify *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) endophytic microorganisms that could produce secondary metabolites with cytotoxic activity. Four actinobacteria were identified among the isolated endophytes by sequencing and analysis of the 16S rRNA gene. This class of bacteria are characteristic for the high capacity to produce bioactive compounds. Three of the strains belong to the *Actinoplanes* genus (TFC3, TMC5 and YF4), while the fourth was identified as *Embleya scabrispora* NF3.

Although *Embleya* is a recently described genus, two species belong to it, *Embleya hyalina* (previously named *Streptomyces hyalinum*) and *Embleya scabrispora* (previously described as *Streptomyces scabrisporus*). The first one with reports of nybomycin and deoxynybomycin production, both compounds with antibiotic activity. The second had registered bioactive cytotoxic compounds, all colorless. The organic extracts of the NF3 strain showed this activity in yellow compounds, previously not described for this genus. These extracts show high activity when evaluated against two cancer cell lines (breast MCF-7 and cervical cancer HeLa). However, low activity was observed against a non-cancerous keratinocyte line (HaCaT). The chemical characterization of 8 compounds belonging to the family of steffimycins and steffimycinones was achieved, with four of these molecules previously described: steffimycin B (StefB), steffimycin C (StefC), 8-demethoxy-10-deoxysteffimycinone and 7 – deoxiesteffimycinone. On the contrary, four new natural products belonging to the same family of compounds were characterized: 8-demethoxysteffimycin B, 8-demethoxy-10-deoxysteffimycin B, 7-deoxy-8-demethoxysteffimycinone and 7-deoxy-10-deoxysteffimycinone. StefB turned out to be the majority compound.

Cytotoxic evaluation of the identified compounds evaluated in MCF-7 breast cancer cells, allowed to conclude that the C-8 methoxyl group of the steffimycins is essential for activity. The StefB turned out to be the one with the highest cytotoxic activity. The mean inhibitory concentration of StefB, evaluated against the MCF-7 cell line and highly resistant triple-negatives breast cancer cells: HCC1806, HCC70 and DU4475 gave CI_{50} values of 2.56, 18.2, 0.79 and 4.81 μ M respectively. Regarding CI_{50} values of the previously mentioned cancer cell lines, and the antitumor drug doxorubicin (4.67 μ M), StefB showed less activity against the HaCaT cell line (CI_{50} 156 μ M). In its mechanism, this compound lows down the PCNA (proliferation cell nuclear antigen) expression. This effect results in morphological changes in MCF-7 cells and apoptosis. Besides, an increase in the contact time between MCF-7 cells and

the compound shows greater cytotoxic activity. These facts supported StefB as a promising drug for breast cancer treatment.

1. Introducción

La industria de los fármacos, así como diferentes instituciones académicas se encuentran en una búsqueda constante de sustancias activas que ayuden a resolver problemas de salud. El requerimiento de nuevos medicamentos debido al descubrimiento de nuevos padecimientos, otros a la resistencia de los microorganismos a los fármacos ya existentes, además de una gran variedad de enfermedades que no han encontrado sustancias eficientes para contrarrestarlas, provocan que las investigaciones continúen.

Un ejemplo importante es el cáncer, el cual en nuestro país representa la tercera causa de mortalidad con más de 84 mil muertes en 2017 (INEGI, 2017) y a nivel mundial causa hasta 9.6 millones de muertes al año (OMS, 2019). En este sentido, el cáncer de mama es uno de los más frecuentes en el mundo, con un registro de 2.09 millones de mujeres diagnosticadas cada año (OMS, 2019).

Entre 1940 y 2010 se registraron 128 nuevos compuestos químicos con actividad antitumoral, de origen diverso. La gran mayoría proveniente de fuentes naturales, otras son derivados de productos naturales o bien son productos sintéticos con farmacóforos de origen natural (Newman y Cragg, 2012).

Las fuentes de origen natural como las plantas y los microorganismos han sido importantes para el descubrimiento de nuevas moléculas que actualmente son utilizadas en tratamientos contra diversos tipos de cánceres. Ejemplos como el taxol proveniente de la planta *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971), el cual estabiliza los microtúbulos durante la mitosis; la vincristina, aislada de la planta *Catharanthus roseus* (Parr *et al.*, 1988), la cual se une a las subunidades α y β de la tubulina; y la doxorrubicina, obtenida de la actinobacteria *Streptomyces peucetius* (Grein, 1987), molécula que se intercala en las cadenas de DNA. Todos estos compuestos son utilizados de manera exitosa hoy en día (Snape., 2013).

Existen unos microorganismos llamados endófitos, los cuales habitan como hospederos en los tejidos de las plantas sin causar un daño aparente. El ambiente único y las interacciones físicas y químicas que mantiene con la planta hospedera, contribuyen a su riqueza química (Kusari *et al.*, 2012). Diversos estudios han mostrado que estos microorganismos producen una gran variedad de compuestos bioactivos contra diversas enfermedades (Zhao *et al.*, 2010; Joseph y Priya, 2011) y que las plantas medicinales son una fuente importante en la obtención de este tipo de sustancias, y en ocasiones muy particulares los endófitos producen la misma sustancia que la planta. El ejemplo más característico y exitoso a este respecto es el del taxol obtenido a partir de la planta *Taxus brevifolia* (Wani, *et al.*, 1971), de la cual se aisló

un hongo endófito llamado *Taxomyces andreanae* que también produce este compuesto (Stierle, *et al.*, 1993). La relación mutualista entre ambos organismos sugiere la producción de metabolitos secundarios muy parecidos, mientras que estudios en las rutas biosintéticas de las plantas y sus endófitos muestran similitudes en algunos casos particulares, lo que sugiere una transferencia horizontal de genes de la planta al endófito (Chandra, 2012).

A partir de estos hallazgos, el estudio de endófitos en plantas medicinales ha ido en aumento en las últimas décadas encontrando compuestos con actividad antimicrobiana, insecticida, anticancerígena, etc., los cuales químicamente pueden ser alcaloides, terpenoides, esteroides, quinonas, isocumarinas, lignanos, fenilpropanoides, fenoles, lactonas, etc. (Zhao, *et al.*, 2012; Martínez-Klimova *et al.*, 2017).

Para elegir una planta medicinal como modelo de estudio para la búsqueda de endófitos se debe tener en cuenta su disponibilidad, estudios previos, así como la importancia cultural, etnobotánica y etnomédica de la región a la que pertenece (Strobel, *et al.*, 2004).

Una de las plantas medicinales mexicanas más utilizada en la herbolaria tradicional es el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht ó *Juliania adstringens*) también conocido como Cuachalalate, fue registrado desde el año 1843 en los Anales del Museo Nacional de México, DF. (Cuevas, 2005) Este árbol se ha utilizado en México por generaciones para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los que se encuentran: problemas circulatorios, enfermedades gastrointestinales incluyendo el cáncer de estómago, entre muchas otras (Solares y Gálvez, 2002). Estudios fitoquímicos de la corteza de este árbol han mostrado diversos compuestos con actividad farmacológica como el ácido masticadienóico y el 3 α -hidroximasticadienóico que presentaron actividad antiinflamatoria (Oviedo-Chávez, *et al.*, 2004), triterpenos con actividad inhibitoria contra células de leucemia (Makino, *et al.*, 2004), etc.

En este contexto, el presente trabajo comprende el estudio de los microorganismos endófitos presentes en *A. adstringens* en la búsqueda de aquellos que produzcan compuestos bioactivos, con actividad citotóxica.

2. Antecedentes

2.1. Productos Naturales

Los productos naturales son moléculas obtenidas de organismos vivos, incluyen plantas, animales, microorganismos y organismos marinos. En algunos casos, estos compuestos son metabolitos secundarios producidos por el organismo para ayudar a protegerse dentro de su nicho ambiental, teniendo reportados al 2018 alrededor de 2,140,000 metabolitos secundarios (Thirumurugan *et al.*, 2018). En otros casos los compuestos pueden ser parte integral de la existencia cotidiana del organismo productor, pero tienen actividad fortuita en sistemas biológicos no relacionados. Este último escenario es ejemplificado por la búsqueda de nuevas aplicaciones bioactivas en beneficio de la humanidad.

2.1.1. Productos naturales bioactivos

Se denominan productos naturales bioactivos a aquellos compuestos químicos producidos por organismos vivos que ejercen un efecto biológico sobre otros organismos, incluyendo actividad terapéutica contra enfermedades en humanos y animales, actividad tóxica responsable de causar enfermedades en humanos y animales, y toxicidad selectiva y biodegradable para ayudar a combatir las plagas que pueden afectar adversamente a la población humana (Colegate y Molyneux, 2007). Se estima que una tercera parte de los compuestos actualmente utilizados como fármacos son derivados de los productos naturales (Snape, 2013).

La búsqueda de sustancias activas aisladas de fuentes naturales tiene una larga historia, desde Friedrich Sertürner que aisló en 1803 el primer compuesto puro farmacológicamente activo, la morfina, a partir de la planta *Papaver somniferum* (Hamilton y Baskett, 2000) a Alexander Fleming en 1928 con el descubrimiento de la penicilina. Esto llevó a una revolución científica en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacéuticas, que ha evolucionado a lo largo de los años. Inicialmente a partir de productos naturales, pero con el desarrollo de diferentes técnicas, ha sido posible crear compuestos sintéticos o medicamentos derivados de productos naturales con resultados muy exitosos (Li y Vederas, 2009).

Hace algunas décadas, los programas de descubrimiento de productos naturales más importantes estaban dirigidos por industrias farmacéuticas que solían gastar una gran cantidad de recursos en la búsqueda de estas nuevas moléculas, y desarrollaron la detección de alto rendimiento (high throughput screening) para hacer más eficiente esa investigación (Genilloud, 2014). Con los años y con el estudio de diferentes blancos terapéuticos la industria

farmacéutica se alejó de los productos naturales, disminuyendo drásticamente el número de aprobaciones de medicamentos de origen natural (Gravitz, 2012).

Actualmente, existen muchos frentes para descubrir nuevos fármacos, trabajando en equipos multidisciplinarios. Por ejemplo, la Unión Europea en el 2012 lanzó la “Iniciativa de Medicamentos Innovadores” apoyada con financiamiento público y privado por 500 millones de euros, con el cual se buscaban compuestos para combatir a los microorganismos patógenos resistentes a antibióticos, los cuales han generado numerosas muertes en Europa. En este proyecto interactúan a la fecha compañías farmacéuticas, instituciones académicas y de investigación, así como las organizaciones biotecnológicas con la finalidad de encontrar nuevas moléculas activas con blancos definidos, teniendo como base más de 500,000 pequeñas moléculas para probar (Scott, 2013) y que hasta estos días han resultado en varias historias de éxito y más financiamiento de las distintas partes que lo integran (IMI, 2020).

2.1.2. Productos naturales como agentes anticancerígenos

El potencial del uso de productos naturales como agentes anticancerosos fue reconocido en la década de 1950 por el Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. (NCI) bajo el liderazgo del Dr. Jonathan Hartwell, y desde entonces el NCI ha realizado importantes contribuciones al descubrimiento de nuevos agentes anticancerígenos naturales. Aunque diferentes enfoques, como el uso de la química combinatoria han eclipsado la investigación de compuestos anticancerígenos naturales de diferentes fuentes (Cragg *et al.*, 2009), la aplicación de la minería genómica en los últimos años, ha vuelto a abrir un panorama muy amplio para el descubrimiento de nuevas moléculas de origen natural, en donde se pueden encontrar una gran cantidad de genes de metabolitos secundarios novedosos que se encuentran encriptados y que tienen un gran potencial para su aplicación biotecnológica (Doroghazi y Metcalf, 2013).

Entre los años 1940-2014, fueron aprobadas 175 moléculas con actividades anticancerígenas. Según la clasificación propuesta por Newman y Cragg (2016), solo el 25% de ellas se clasificaron en la categoría de compuestos de origen sintético y las otras moléculas como productos de origen natural, que imitaban un producto natural o derivados de productos naturales. Desde 1930 hasta 2014, todos menos 17 de los 246 medicamentos descubiertos fueron aprobados por la FDA. Del total, el 14% eran biológicos (más de 45 péptidos o proteínas), el 12% eran productos naturales no modificados (metabolitos secundarios), menos

del 0,5% productos naturales de origen botánico, el 25% productos naturales modificados, el 19% compuestos sintéticos sin concepción del producto natural, el 9% compuestos sintéticos que muestran una inhibición competitiva a un sustrato de origen natural, 9% compuestos sintéticos con un farmacóforo de un producto natural, 10% compuestos sintéticos con un farmacóforo del producto natural que muestran una inhibición competitiva a un sustrato de origen natural, y finalmente el 2% eran vacunas. Si luego se eliminan los materiales de alto peso molecular (productos biológicos y vacunas), reduciendo el número total a 175 (100%), el número de agentes inspirados naturalmente es 131 (74.9%).

2.1.3. Los microorganismos como fuente de obtención de productos naturales bioactivos

Los metabolitos secundarios de microorganismos son típicamente productos naturales de bajo peso molecular que generalmente no son esenciales para su supervivencia y crecimiento, pero se encuentran involucrados en las interacciones con su entorno como mecanismos de defensa o adaptación a su medio ambiente, y cuya producción o biosíntesis está regulada por estas interacciones y las necesidades del microorganismo productor. Estos compuestos son derivados de metabolitos primarios y a menudo tienen funciones fisiológicas distintas y versátiles (Sánchez *et al.*, 2018).

Para fines humanos, los microorganismos son excelentes productores de metabolitos primarios como aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, y también son una fuente prolífica de metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes para la industria farmacéutica, incluyendo agentes antibacterianos como las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, agentes inmunosupresores, antiparasitarios y antitumorales. Para el año 2012, se tenían registradas 16 compuestos químicos, también llamadas entidades moleculares, obtenidas de microorganismos, en la fase III de evaluación clínica (Cragg *et al.*, 2012; Sánchez y Demain, 2014).

Los hongos y las bacterias, en especial un tipo de bacterias llamadas actinomicetos o actinobacterias han resultado ser los mayores productores de metabolitos secundarios bioactivos en la naturaleza, teniendo la capacidad de sintetizar una gran diversidad de moléculas. En 2010 se tenía registro de más de 13,700 compuestos bioactivos producidos sólo por los actinobacterias filamentosos, siendo 10,400 procedentes del género *Streptomyces* y 3,300 de los llamados actinobacterias raras. Con respecto a los hongos, se tenía un registro de 15,600 compuestos bioactivos, siendo los hongos microscópicos los productores

principales seguidos de los basidiomicetos. En total se registraron hasta esa fecha 33,500 compuestos bioactivos de origen microbiano (Bérdy, 2012).

Como fuente de compuestos bioactivos nuevos, se ha vuelto evidente que un número significativo de fármacos de origen natural encontrados en los últimos años son producidos por microorganismos que interaccionan con otros de igual o diferente taxa, en muchas ocasiones encontrándose como huéspedes en el interior de estos, y que debido a esa interrelación producen compuestos novedosos, algunas veces activando clústeres de genes que se encontraban silenciados (Newman y Gragg, 2012).

2.2. Endófitos

La palabra endófito significa "dentro de la planta" (*endon* Gr., en el interior; *phyton*, planta) y su definición ha cambiado con respecto al tiempo. Primeramente, incluía solamente a los hongos, hasta que se encontró que las bacterias formaban parte importante de este microbioma. El uso de este término es tan amplio como su definición literal y espectro de posibles huéspedes y habitantes en la planta, incluidas bacterias, hongos, algas, etc. En 1997, Hallman y colaboradores definen a los endófitos como los organismos aislados de explantes esterilizados de la superficie o del tejido vegetal, los cuales no producen daño a la planta huésped; sin embargo, esta definición es válida sólo para especies cultivables. Otra definición los describe como microorganismos que pasan al menos una parte de su ciclo de vida en el interior de la planta (Hardoim *et al.*, 2015).

La característica principal de los endófitos es que habitan dentro de las plantas sin causar síntomas visibles de enfermedad y viven de una manera mutuamente beneficiosa con su planta hospedera. Cualquier interacción planta-endófito está precedida por un encuentro físico entre una planta y el microorganismo, seguido de varias barreras físicas y químicas que deben superarse para establecer con éxito una asociación (Schulz y Boyle, 2005).

Existen diversas formas en las que los endófitos colonizan las plantas (Figura 1), por ejemplo, la microbiota de la rizosfera y la filosfera penetra a través de las raíces, preferentemente en la zona apical, donde existe una pared celular delgada. También estos microorganismos pueden introducirse por heridas en diversas partes de la planta, así como en otras aberturas naturales, como los estomas y las lenticelas. La producción de enzimas como la celulasa y pectinasa ayudan a disolver la pared celular de los diferentes tejidos para colonizarlos, y la producción de lipasas, proteasas, fenoloxidasas y enzimas catalizadoras de

lignina les ayudan a establecerse en los diversos tejidos. Sólo algunos endófitos atraviesan la barrera endodérmica y entran al tejido del xilema. Su presencia en el xilema provoca que el endófito se disperse en todos los tejidos y órganos de la planta, incluyendo los órganos reproductivos, penetrando así en las semillas en desarrollo, transfiriéndose de generación en generación a través de las semillas (Arora y Ramawat, 2017).

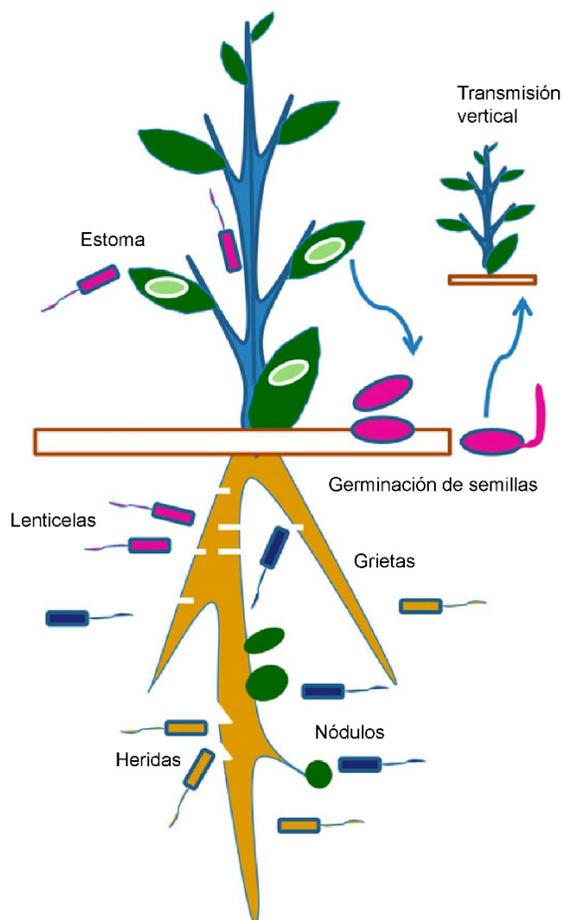


Figura 1. Diferentes mecanismos de colonización de los endófitos en la planta hospedadora. La transmisión vertical se presenta cuando los endófitos pasan de generación en generación por medio de las semillas, mientras que la transmisión horizontal se presenta de diversas formas en la planta (modificado de Arora y Ramawat, 2017).

Los endófitos reciben protección y nutrición de las plantas hospedadoras al tiempo que proporcionan o facilitan la absorción de nutrientes y protección a la planta contra diversos tipos de estrés biótico y abiótico, entre ellas algunas enfermedades, por lo que su presencia influye en el crecimiento y desarrollo de la planta. Estos microorganismos han evolucionado junto con su planta hospedadora durante periodos prolongados y han desarrollado estrategias para vivir, sobrevivir, evolucionar y refinar su relación mutua, incluso se ha encontrado que la colonización de las plantas, así como el establecimiento del endófito en ella está relacionado con genes específicos que presentan los endófitos (Hardoim *et al.*, 2015).

En 2012, Kusari y colaboradores proponen la hipótesis del antagonismo balanceado, donde se describe una comunicación química constante entre la planta y el endófito. El endófito

evade la activación de las defensas del hospedero y asegura su propia resistencia antes de ser incapacitado por los metabolitos tóxicos de este, habitando en la planta sin causar manifestaciones visibles de infección o enfermedad. También se considera una interacción mucho más compleja y precisa donde ambos organismos aprenden a vivir con los metabolitos secretados por el otro después de un periodo de evolución, donde se ven expuestos a estos compuestos.

2.2.1. Microorganismos endófitos como productores de metabolitos secundarios

En una relación mutualista entre ambos organismos, los endófitos inducen en las plantas reacciones de defensa, también llamada “resistencia sistémica inducida” la cual permite una mayor tolerancia de la planta a patógenos. En las bacterias, los factores que pueden desencadenar esta respuesta son los flagelos, antibióticos, las N-acil-homoserina lactonas, ácido salicílico, ácido jasmónico, sideróforos, acetoínas y lipopolisacáridos. Con respecto a los hongos, se ha encontrado que actúan mediante la producción de compuestos que inhiben el crecimiento de patógenos como los alcaloides, esteroides, terpenoides, péptidos, policetonas, flavonoides, quinonas, fenoles y compuestos clorados. La producción de metabolitos secundarios producida por los endófitos se asocia con mecanismos de señalización, defensa y regulación genética para el establecimiento de la simbiosis y la defensa de la planta ante situaciones adversas o de estrés. Aunado a la producción de estos compuestos por los endófitos, estos microorganismos son capaces de promover la producción de metabolitos secundarios en las plantas (Hardoim et al., 2015).

Como resultado directo del papel que estos metabolitos secundarios pueden desempeñar en la naturaleza, también se ha encontrado su utilidad en la medicina (Strobel, 2003). Una comparación de 135 metabolitos aislados cuyas estructuras se determinaron, muestra que la proporción de nuevas estructuras producidas por endófitos (51%) es considerablemente mayor que la producida por aislamientos de suelo (38%) (Schulz *et al.*, 2002).

La diversificación de nuevos compuestos producidos por endófitos aumenta cada día, entre 1990 y 2010 se aislaron 100 moléculas anticancerígenas, que pertenecen a 19 clases químicas diferentes y muestran actividad contra 45 líneas celulares diferentes Kharwhar *et al.*, 2011). Debido al enorme valor económico, de 2010 a 2013, se informaron casi 100 estudios sobre los metabolitos bioactivos de hongos endófitos que cubren la mayoría de los países y regiones, especialmente los países con una rica biodiversidad. Estos estudios se refieren a una gran variedad de plantas hospederas que incluyen helechos, gimnospermas y

angiospermas; se encontraron al menos 30 compuestos nuevos (Chen *et al.*, 2014). Las actividades biológicas de estos compuestos aislados son muy variadas entre ellas destacan la antibiótica (Martinez-Klimova *et al.*, 2017), antifúngica (Sánchez-Fernández *et al.*, 2015), antiparasitaria (Guzmán-Trampe *et al.*, 2015) y actividades antivirales (Zhang *et al.*, 2011).

2.2.1.1. Plantas y endófitos produciendo los mismos metabolitos

Algunos endófitos pueden producir compuestos que se han aislado exclusivamente de plantas superiores. Se cree que, durante el largo período de coevolución, se formó una relación entre cada endófito y su planta huésped y esa podría ser la razón por la cual algunos endófitos tienen la capacidad de producir los mismos compuestos bioactivos o similares a los que se originaron a partir de sus plantas hospederas (Zhao *et al.*, 2010).

El primer descubrimiento de un endófito produciendo el mismo compuesto que el de su planta hospedera fue el de la biosíntesis del agente anticancerígeno Taxol (Paclitaxel), originalmente aislado del árbol *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971) y cuya función en la naturaleza es brindar protección antifúngica en la planta (Soliman *et al.*, 2013). El aislamiento y estudio de sus hongos endófitos permitió el hallazgo de *Taxomyces andreanae*, hongo que mostró la capacidad de producir el mismo metabolito que la planta (Stierle *et al.*, 1993). Después de este hallazgo, varios endófitos han mostrado producir este compuesto, siendo reportados para el año 2010, 57 endófitos fúngicos y 13 endófitos bacterianos que producen taxol o algunos de sus precursores (Flores-Bustamante *et al.*, 2010), alcanzando más de 80 hongos en 2014 (Rajendran *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

La ruta de biosíntesis del taxol involucra 19 pasos enzimáticos, siendo dos de ellos de gran importancia, la taxadieno sintasa (TXS) que realiza la bioconversión de la oleofina original, el pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP) a taxadieno, y la baccatin amino fenilpropanoil transferasa (BAPT), que cataliza la última acilación de la estructura central del taxol. Los genes de ambas enzimas son tomados como blancos de la presencia de la ruta metabólica del taxol. En un estudio minucioso realizado por Staniek y colaboradores (2009) encontraron la presencia de los genes *txs* y *bapt* en el hongo endófito *T. andreanae*, sin embargo, la producción del metabolito final no fue observada. Ellos sugieren que el medio ambiente específico de la planta es necesario para la inducción de los genes biosintéticos del taxol y que la transferencia horizontal de genes (THG) pudo estar involucrada en la presencia de estos genes en el endófito. Para el caso particular del hongo endófito *Aspergillus candidus* MD3 aislado de *Taxus x media*, se corroboró la producción de taxol y la presencia del gen de la 10-

deacetilbaccatina-III-10-O-acetil transferasa (*dbat*) que cataliza la formación del último diterpeno intermedio, compartiendo el 99% de identidad con el presente en *Taxus x media* y 97% con *Taxus x wallichiana* (Zhang *et al.*, 2009b)

Así como el taxol, historias similares han sucedido para otros compuestos anticancerígenos comercialmente importantes como es el caso de la camptotecina, que se ha encontrado en 11 hongos endófitos y las podofilotoxinas en 14 hongos endófitos, aislados de diversas plantas huésped (Nadeem *et al.*, 2012; Shweta *et al.*, 2013; Kharwhar *et al.*, 2011).

Después de estos hallazgos, muchos trabajos se han centrado en la investigación de compuestos con actividades farmacéuticas en endófitos (Hyde y Soyong, 2008). Los primeros, buscando las mismas sustancias que producían las plantas huésped, pero después de que se mostró por diferentes grupos, la gran cantidad de compuestos nuevos que se podían encontrar en este tipo de microorganismos, el cribado se extendió a cualquier tipo de compuestos nuevos con actividades atractivas (Joseph y Priya, 2011; Zhao *et al.*, 2010).

2.2.1.2. La teoría de la transferencia horizontal de genes en endófitos

La teoría más importante que puede explicar la presencia de los mismos metabolitos secundarios tanto en la planta como en el endófito es la transferencia horizontal de genes (THG), que es el movimiento e integración de material genético entre especies no relacionadas o filogenéticamente distantes. Se ha encontrado que 81% de los genes de 181 genomas de procariontes han sido sujetos de THG a lo largo de la historia de la evolución de los procariontes. En los eucariontes se pensaba que este era un fenómeno raro, sin embargo, en un estudio basado en los datos genómicos disponibles, se encontró que 57 familias de genes del musgo *Physcomitrella patens* fueron obtenidos de procariontes, hongos o virus. Con respecto a los hongos, 713 genes transferidos fueron detectados en 60 secuencias de genomas. La THG puede mejorar la habilidad adaptativa de los organismos en medios ambientes cambiantes. Por ejemplo, en *P. patens* promueve la formación de xilema, defensa de plantas y la biosíntesis de hormonas. (Meng *et al.*, 2018)

Los estudios que utilizan secuencias del genoma completo y tecnologías de alto rendimiento revelaron que los eventos de THG en genomas eucariotas, particularmente en el reino vegetal, tienen un impacto crucial en la evolución de la planta. Los análisis filogenéticos exhaustivos de genomas en 6 especies de plantas, junto con otros genomas procariontes y eucariotas, identificaron 1,689 genes que eran similares a los hongos, lo que indica el

intercambio de material genético entre plantas y hongos. El fenómeno de la THG en endófitos marca un mecanismo biológico importante para su adaptación evolutiva y le confiere rasgos novedosos, llevando a la inclusión de genes de la planta huésped al endófito o viceversa (Tiwari y Bae, 2020).

En un análisis realizado por Sachin y colaboradores (2013), evalúan la ruta de biosíntesis de los alcaloides indol terpenoides (TIA's por su abreviatura en inglés) y si esta ocurre en verdad en el hongo endófito o es en conjunto con la planta. Estos metabolitos provienen de la ruta del shikimato y del mevalonato necesitando como estructura esencial la estreptocidina producida mediante la estreptocidina sintasa (STR), precursor de más de 1800 alcaloides indólicos, incluidos diversos compuestos anticancerígenos como la vinblastina y la camptotecina. Este precursor se encuentra sólo en las vacuolas y no está presente en ninguno de los endófitos estudiados. Los autores proponen tres diferentes teorías por las cuales los endófitos la puede producir: la primera propone que existe una proteína completamente diferente a la STR que realiza la misma función. La segunda propone que el hongo no contiene el gen STR por sí mismo, pero lo puede albergar mediante elementos extracromosomales en el citoplasma del hongo que fueron transferidos horizontalmente de la planta en interacciones evolutivas, pudiendo ser transmitidas por plásmidos. La tercera hipótesis sugiere que el gen *STR* se encuentra en un plásmido en una bacteria albergada en las hifas del hongo (endohifa). La hipótesis de los plásmidos gana credibilidad con las evidencias de presencia de grandes plásmidos lineales aislados de varias especies de *Streptomyces*. Esta teoría también podría explicar la atenuación o desaparición de los metabolitos por subcultivos que podría deberse a la pérdida de los plásmidos o de las bacterias endohifas.

2.2.1.3. Recomendaciones en la búsqueda de endófitos con actividad biológica

En el 2004, Strobel y colaboradores enumeraron algunos parámetros que se deben tomar en cuenta para la selección de plantas hospederas y el estudio de sus endófitos, con la finalidad de tener mejores oportunidades de encontrar moléculas bioactivas. 1) Plantas habitando en entornos ambientales únicos, especialmente aquellos con una biología inusual y que posean estrategias novedosas para la supervivencia, se consideran seriamente para su estudio. 2) Plantas que tengan historia etnomédica, específicamente relacionada con las aplicaciones de interés en el estudio, entendiendo que, si a la planta se le atribuyen propiedades curativas, los metabolitos causantes de estas pudieran estar siendo sintetizados o

facilitados por compuestos producidos por endófitos asociados a la planta. 3) Plantas endémicas que tienen una longevidad inusual, las cuales pudieran tener un mayor tiempo de coevolución con sus endófitos. 4) Las plantas que crecen en áreas de gran biodiversidad pueden albergar una gran diversidad de endófitos al igual que la diversidad química producida por ambos organismos. En este sentido, hay diversos trabajos que muestran que las plantas medicinales son una fuente importante de endófitos que producen sustancias bioactivas y en ocasiones muy particulares los endófitos producen la misma sustancia que la de la planta (Golinska *et al.*, 2015).

La selección final del hospedero dependerá también de la aplicación que se está buscando en el endófito y/o al metabolito secundario que produce, por ejemplo, en la fitorremediación de suelos se buscan hospederos cuyas características sean la sobrevivencia en suelos altamente contaminados, los cuales pueden albergar endófitos capaces de metabolizar los contaminantes presentes en el suelo (Taghavi *et al.*, 2005). La búsqueda de compuestos con otras características como bioinsecticida, antifúngicos, antivirales, promotores de crecimiento, etc., estarán relacionados con plantas hospederas que presenten por sí solas la capacidad de producir compuestos con estas actividades o que parezcan tener una mayor fortaleza en presencia de amenazas bióticas o abióticas (Arora y Ramawat, 2017).

2.2.2. Bacterias endófitas y sus compuestos bioactivos

Existen asociaciones entre bacterias y plantas que han resultado ser altamente beneficiosas, como es el caso de las rizobacterias, las cuales son bacterias asociadas a las raíces de las plantas y unas de las más estudiadas, ya que proporcionan efectos positivos sobre su hospedero, estimulando su crecimiento, incrementando su resistencia contra enfermedades, mejorando la habilidad de la planta a defenderse a diferentes tipos de estrés y ayudando a la fijación de nitrógeno (Sturz y Nowak, 2000), en ocasiones pueden inhibir la colonización por microorganismos patógenos (Cankar *et al.*, 2005). Diversos estudios muestran un control significativo de las rizobacterias contra diversos hongos patógenos en las plantas, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en algodón, *Verticillium albo-atrum* y *Rhizoctonia solani* en papa y algodón, *Sclerotium rolfsii* en frijol, etc. (Hallmann *et al.*, 1997). En un estudio de 45 bacterias aisladas de la rizosfera y endosfera de la caña de azúcar mostró que todas eran capaces de producir proteasas y sideróforos con actividad antifúngica y que tres de ellas eran capaces de producir la enzima hidrolítica glucanasa, la cual ayuda a romper la pared celular de los hongos patógenos al ser el glucano uno de sus principales

componentes. Estas bacterias inhibieron significativamente el crecimiento de hongos patógenos de importancia económica e indujeron la resistencia sistémica en la planta, contra los patógenos, a través de la activación de enzimas eliminadoras de especies reactivas de oxígeno (antioxidantes) (Zia et al., 2019).

Los endófitos bacterianos en general, promueven el crecimiento y la salud de las plantas y, en muchos casos, los efectos benéficos están mediados y caracterizados por interacciones metabólicas (Kandel *et al.*, 2017). Se han realizado avances recientes con respecto a la producción de metabolitos por parte de los microsimbiontes de las plantas, lo que demuestra que pueden producir una variedad de diferentes tipos de metabolitos, los cuales juegan un papel de defensa y competencia, pero también pueden ser necesarias para la interacción y comunicación específica con el huésped de la planta (Brader *et al.*, 2014).

Se han encontrado diferentes bioactividades en endófitos bacterianos como antioxidantes (Nimal *et al.*, 2013), insecticidas (Shi *et al.*, 2013), antimicrobianos (Ding *et al.*, 2011), como promotor de absorción de glucosa con un uso probable como antidiabético (Akshatha *et al.*, 2013) y, por supuesto, citotoxicidad (Chen *et al.*, 2013).

Las actinobacterias son un grupo de bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina y citosina en su DNA. Por lo general, se encuentran en ambientes terrestres y acuáticos, y también como huéspedes en las plantas. Una revisión realizada en 2012 mostró que las especies de actinobacterias tienen registro de producir de 60 a 80 mil productos naturales, siendo 12,000 de ellos compuestos bioactivos y particularmente 10,000 con actividad antibiótica, produciendo en total el 28.5% de los compuestos bioactivos microbianos conocidos a esa fecha (Bérdy, 2012). Los genomas de este grupo han revelado que estas bacterias tienen una gran cantidad de genes que codifican rutas metabólicas generadoras de productos naturales. El análisis del genoma de algunos de ellos mostró que tienen el potencial de producir más de 60 compuestos químicos probablemente bioactivos, en su mayoría desconocidos (Doroghazi y Metcalf, 2013).

En un análisis de 41 actinobacterias endofíticas aisladas de plantas con reportes etnomédicos, en la selva tropical de Yunnan, China, el 31.7% de ellas mostró actividad citotóxica en las células A549 de carcinoma de pulmón, el 29.3% en las células humanas de leucemia HL-60, el 85.4% en las células cancerosas de hígado BEL-7404 y el 90.2% en células P388D1 macrófagos con morfología de linfoblastos provenientes de ratones. En casi todas las cepas probadas que mostraban actividades antitumorales significativas se detectaron

genes codificantes para policétido sintetasas tipo I y II (PKS-I y PKS-II) así como la presencia de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) (Li *et al.*, 2008).

En otro trabajo (Wu *et al.*, 2009), aislaron 150 actinobacterias endofíticas de tres plantas de uso medicinal, *Annonaceae squamosal*, *Camptotheca acuminata* y *Taxus chinensis*. La prueba de bioactividad con extractos de metanol mostró que el 9.3% de las cepas presentaban actividad citotóxica contra las líneas celulares tumorales humanas Raji y HepG2.

2.3. El Cuachalalate – *Amphipterygium adstringens*

Una de las plantas medicinales mexicanas más utilizada en la herbolaria tradicional es el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlech ó *Juliania adstringens*) también conocido como chalalate, coachalalate, cuachalala, volador, etc. Es un árbol endémico de México de 10 m de altura de clima cálido, semicálido y templado que se localiza en regiones que van desde los 100 a los 3000 msnm. Fue descrito y registrado desde el año 1843 por Schiede en los Anales del Museo Nacional de México, DF. (Cuevas, 2005). Se ha utilizado en México por generaciones para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los que se encuentran: problemas circulatorios, enfermedades bucales, enfermedades gastrointestinales incluyendo el cáncer de estómago, infecciones diversas incluyendo al paludismo, afecciones urinarias, heridas, diversas enfermedades de la piel, tratamientos postparto y lavados vaginales, padecimientos hepatobiliares, afecciones del pulmón y vías respiratorias entre otras (Solares y Gálvez, 2002).

Estudios fitoquímicos de la corteza de este árbol han mostrado diversos compuestos con actividad farmacológica, algunos ejemplos son los siguientes: el ácido masticadienóico y el 3 α -hidroximasticadienóico que presentaron actividad anti-inflamatoria (Oviedo-Chávez, *et al.*, 2004); el ácido anacárdico con actividad antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena y anti-inflamatoria (Wu, *et al.*, 2011); fenoles de cadena larga con efecto hipocolesterolémico (Mata *et al.*, 1991); triterpenos con actividad inhibitoria contra células de leucemia (Makino, *et al.*, 2004); y los ácidos 3 α -hidroximasticadienóico, 3-epioleanóico y el β -sitosterol con actividad gastroprotectora (Navarrete *et al.*, 2005).

Debido a que la planta *A. adstringens* tiene una gran variedad de aplicaciones etnomédicas y que diversos estudios muestran la presencia de distintos metabolitos secundarios bioactivos, esta especie constituye un modelo de estudio ideal para encontrar endófitos productores de sustancias de interés farmacológico.

2.4. Cáncer

El cáncer es definido como un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento no controlado y propagación de células anormales. Si no se controla la propagación, puede provocar la muerte. El cáncer es causado tanto por factores externos (tabaco, organismos infecciosos, químicos y radiación) como por factores internos (mutaciones hereditarias, hormonas, afecciones inmunes y mutaciones que se producen por el metabolismo). Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo del cáncer, conociendo alrededor de 200 diferentes tipos de cáncer dependiendo de los diferentes defectos celulares. A menudo pasan diez o más años entre la exposición a factores externos y el cáncer detectable. El cáncer se trata con cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y terapia dirigida (Snape, 2013).

El cáncer es la segunda causa de mortandad a nivel mundial sólo después de afecciones al corazón, siendo en nuestro país la tercera causa de mortalidad que provocó 84,142 defunciones en 2017 (INEGI, 2017) y en el mundo causó hasta 9.6 millones de muertes sólo en 2018 (OMS, 2019). Aproximadamente el 70% de las muertes de cáncer a nivel mundial ocurrieron en países poco o medianamente desarrollados y en 2017 sólo el 26% de los países poco desarrollados reportaron tener servicios patológicos de salud disponibles en el sector público, por lo que la prevención es una de las principales metas para controlar esta enfermedad. El cáncer de mama es uno de los más frecuentes en el mundo, con un registro de 2.09 millones de mujeres diagnosticadas en 2018, llegando a 627,000 muertes por esa causa (OMS, 2019), llegando a 6,889 defunciones en el 2017 en nuestro país (INEGI, 2017).

Existen varios mecanismos involucrados en la evolución de una célula normal a una maligna o cancerosa, siendo la mayoría de ellos los que interfieren en la división celular. Las fases del ciclo celular están conformadas por la interfase (G_0 , G_1 , S y G_2) y la fase mitótica. Si la célula no se replica aparece como G_0 . G_0 puede cambiar a G_1 donde hay preparación celular para su proliferación con la producción de constituyentes celulares esenciales para las nuevas células, además de la preparación para la síntesis de DNA que ocurrirá en la fase S. En las fases G_1 y S existen varios mecanismos reguladores que pueden afectar la multiplicación celular. Factores de crecimiento como productos de oncogenes, activan la multiplicación celular, mientras que los controles de retroalimentación “feedback” son inhibidores de la multiplicación celular como los genes supresores tumorales que detienen la replicación celular cuando hay daño en el DNA para que pueda repararse. En la fase G_2 la célula crece más,

sintetiza proteínas y organelos, comienza a reorganizar su contenido preparándose para la mitosis. En la fase mitótica la célula divide su DNA y se lleva a cabo la citocinesis donde se forman las dos nuevas células completas, terminando así el ciclo de replicación celular y entrando nuevamente al estado G_0 . La célula tumoral o transformada no finaliza el ciclo de replicación celular en G_0 sino que de la mitosis entra a la fase G_1 (De Almeida *et al.*, 2005).

2.4.1. Agentes quimioterapéuticos

Las fuentes de origen natural como las plantas y los microorganismos han sido importantes para el descubrimiento de moléculas que actualmente son utilizadas en tratamientos contra diversos tipos de cánceres. Ejemplos como el taxol y la vinblastina obtenidos de las plantas *Taxus brevifolia* y *Catharanthus roseus* respectivamente, son muy exitosos (Stierle *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1988), así como la doxorubicina obtenida de la actinobacteria *Streptomyces peucetius* (Grein, 1987).

El objetivo principal de la quimioterapia es destruir a las células neoplásicas preservando las células normales, sin embargo, la mayoría de los agentes utilizados actúan de manera inespecífica dañando ambas células malignas y normales.

La clasificación de los agentes antineoplásicos utilizados es complicada debido a la gran cantidad de compuestos con estructuras químicas complejas y la participación de diferentes grupos funcionales en ellas. La clasificación más amplia e incluyente se muestra en la Figura 2, la cual está basada en la participación de los agentes en las diferentes fases del ciclo celular (De Almeida *et al.*, 2005).

Muchos medicamentos eficaces contra el cáncer funcionan en las células que están en determinado momento del ciclo celular y se llaman fármacos ciclo celular específicos (CCS) como los antimetabolitos y algunos productos naturales. El grupo de agentes ciclo celular no específicos (CCNS) tienen la capacidad de exterminar células tumorales independientemente de su estado en el ciclo celular o si están en reposo G_0 y algunos ejemplos son los complejos coordinados de platino, algunos agentes alquilantes y antibióticos naturales como las antraciclinas (De Almeida *et al.*, 2005).

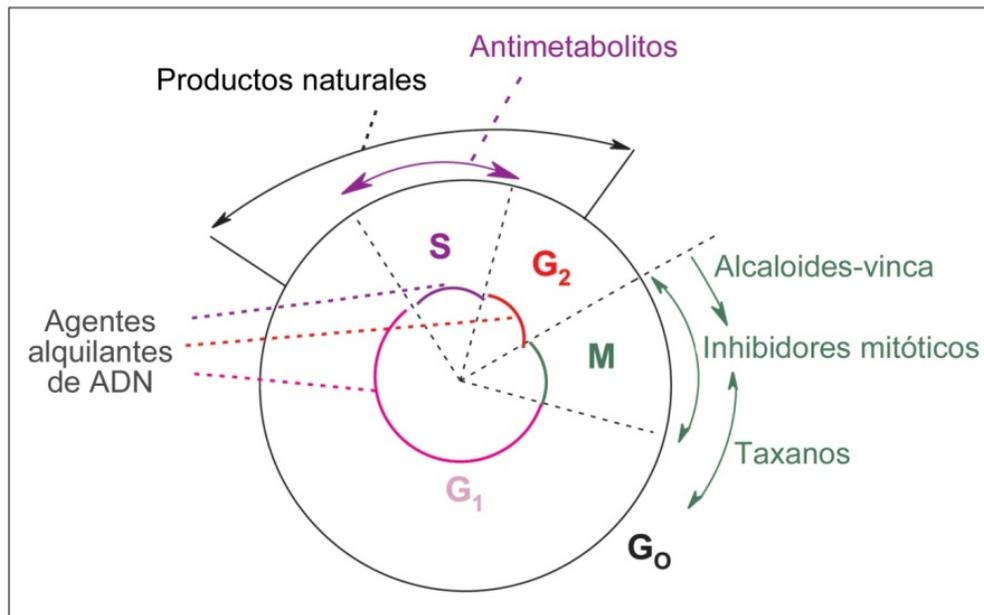


Figura 2. Actividad de los agentes quimioterapéuticos antineoplásicos dependiendo de la fase del ciclo celular (modificada de De Almeida et al., 2005).

Los antimetabolitos son aquellos compuestos que interfieren en el funcionamiento normal de metabolitos específicos o de enzimas que los producen en las células. Generalmente son análogos químicos de los metabolitos normales como el análogo de la guanina (tioguanina) o de la adenosina (cladribina). Otro tipo de antimetabolitos son los que afectan la función normal de la célula interfiriendo con el ensamble de los microtúbulos ya sea inhibiéndolos o fomentando su formación (Weinberg, 2014).

En la Figura 3 se muestran algunos ejemplos de compuestos de diversas estructuras químicas que son utilizados como agentes antineoplásicos: La bleomicina es un glucopéptido que causa fragmentación del DNA. Por su parte, la doxorubicina cuenta con cuatro anillos fusionados, creando una estructura plana, la cual es capaz de deslizarse entre los pares de bases del DNA, proceso llamado intercalación y esto evita la replicación del DNA. La mitomicina C tiene un mecanismo más complejo, esta molécula permite alquilar el DNA desorganizándolo y formando complejos.

También existen metabolitos que interactúan con proteínas como el paclitaxel, la combretastatina A4 y la vincristina, productos naturales que inducen la muerte celular interfiriendo con la estructura crucial de la proteína tubulina, estabilizando los microtúbulos, impidiendo la despolimerización e inhibiendo la formación del huso mitótico en la división celular y bloqueando el proceso de mitosis (Snape, 2013).

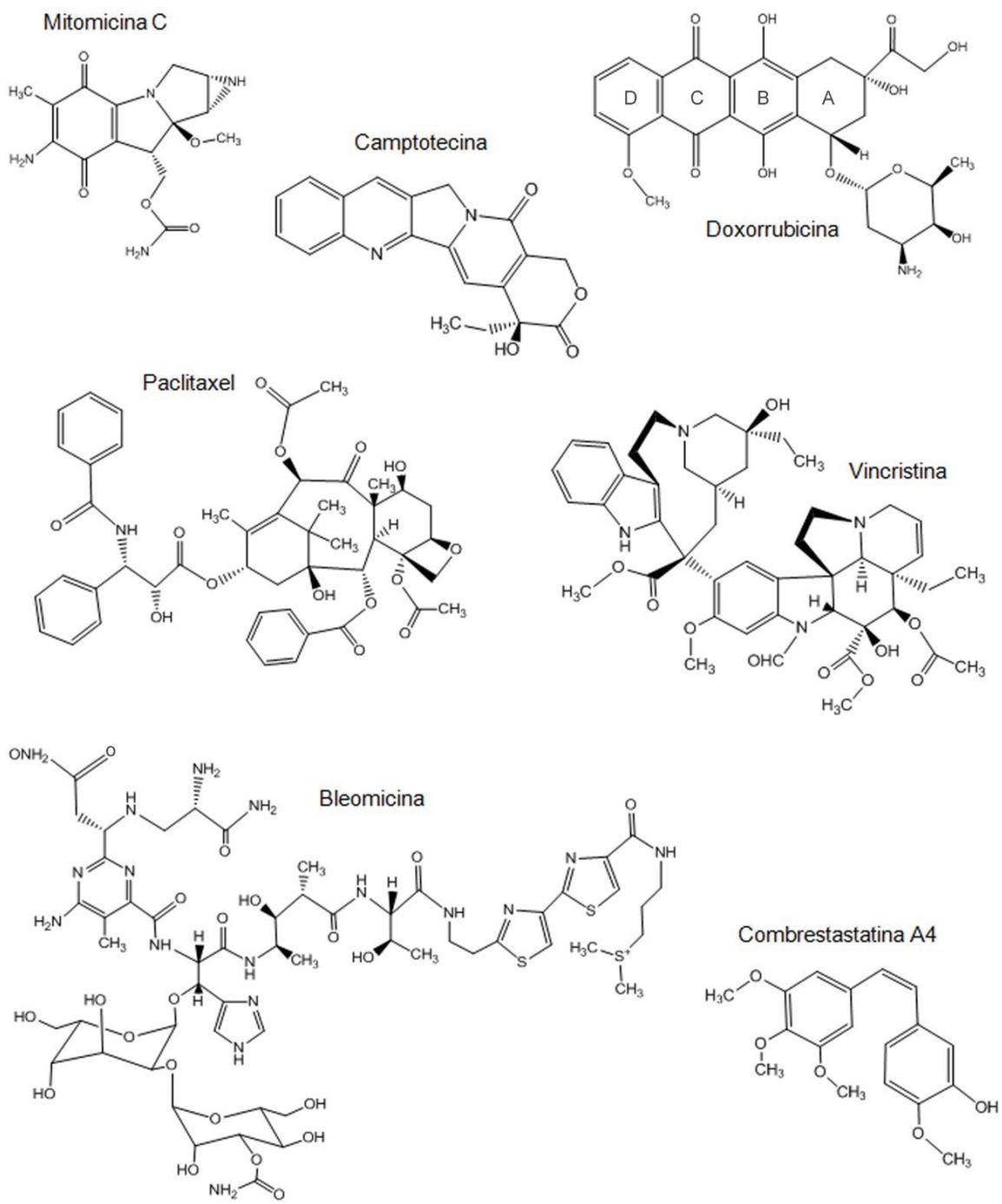


Figura 3. Estructuras químicas de algunas moléculas utilizadas como anticancerígenos (Modificado de Snape, 2013).

El descubrimiento de una gran cantidad de compuestos anticancerígenos obtenidos de plantas y microorganismos ha permitido tener compuestos que a la fecha son ampliamente prescritos y han salvado o prolongado la vida de millones de pacientes con cáncer, sin embargo a finales de los 1990s un nuevo universo onco-farmacológico apareció con el uso de terapias dirigidas donde se descubrieron las moléculas pequeñas inhibidoras de tirosinas cinasas como el imatinib y los anticuerpos monoclonales como el rituximab y el trastuzumab, los cuales son receptor-específico y han sido ampliamente aplicados desde entonces, llevando en declive la investigación de los productos naturales

En la Figura 4 se muestran cuatro categorías de compuestos para el tratamiento de cáncer que han sido utilizados desde 1950 hasta después del 2000, donde se observa que los productos naturales citotóxicos jugaron un papel principal hasta la aparición de los anticuerpos monoclonales y las moléculas pequeñas inhibidoras de cinasas. Sin embargo, con la aprobación por la FDA en 2007 de tres nuevos fármacos derivados de productos naturales, la ixabepilona, derivado del epotilona B cuyo sitio de acción son los microtúbulos, el alcaloide de origen marino trabectedina que es un alquilante de DNA y el inhibidor de la proteína mTOR temsirolimus, la investigación ha resurgido, mostrando la importancia de los microorganismos como fuente de fármacos en el tratamiento del cáncer (Bailly, 2009).

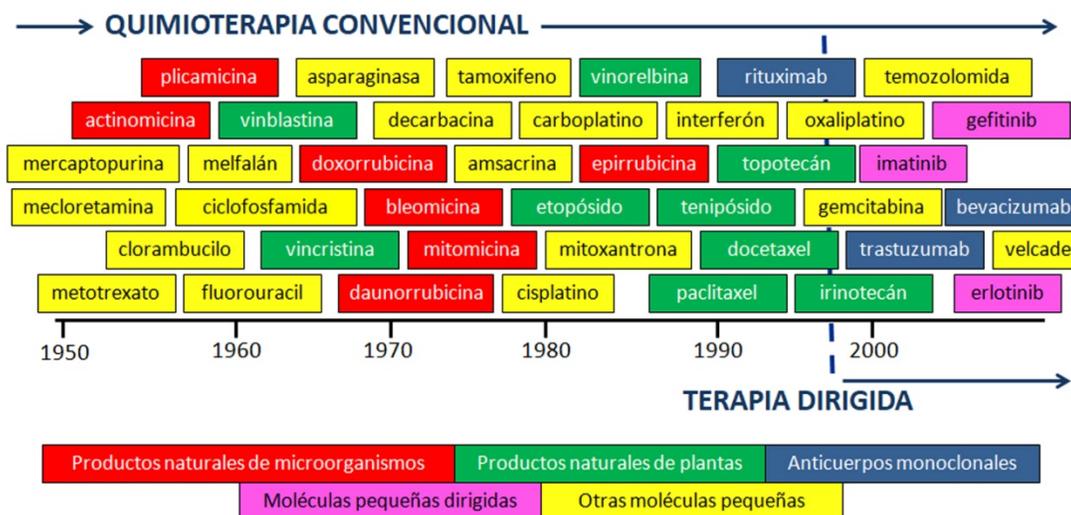


Figura 4. Principales tratamientos contra el cáncer durante las pasadas décadas (modificado de Bailly, 2009).

2.4.2. Antraciclinas y sus mecanismos de acción

Las antraciclinas son una familia importante de policétidos aromáticos tetracíclicos cuya biosíntesis comienza con la condensación de pequeños ácidos carboxílicos con la acción iterativa de una policétido sintasa tipo II (PKS-II) compuesta de dos cetosintasas KS_{α} y KS_{β} , conocidas como factor de alargamiento de cadena (CLF) y una proteína acarreadora de acilo. Una vez que el esqueleto se forma, diferentes cetorreductasas (KR), ciclasas (CYC), aromatasas y oxigenasas toman acción para doblar y modificar el policétido y formar el compuesto aromático, característico por su sistema de anillos ABCD (Figura 3 Doxorubicina) que proporcionan características particulares en sus actividades biológicas. Estas agliconas poliaromáticas son modificadas por glicosiltransferasas que adicionan deoxi- y aminodeoxi-azúcares. Varios de estos compuestos se utilizan clínicamente para el tratamiento del cáncer (Metsä-Ketelä *et al.*, 2008).

El uso clínico de las antraciclinas es un arma de dos filos, por un lado, desempeñan un papel clave en el tratamiento de muchas enfermedades neoplásicas, pero por otro lado su administración crónica introduce miocardiopatías e insuficiencia cardiaca congestiva. A pesar de ser ampliamente utilizados, los mecanismos de acción en las células continúan en controversia (Minotti *et al.*, 2004). Se consideran diferentes mecanismos entre los que se encuentran: el intercalamiento en el DNA conduciendo a la inhibición de la síntesis de macromoléculas, la generación de radicales libres que conducen a daños en el DNA o peroxidación de lípidos, la unión y alquilación del DNA, la reticulación del DNA, la interferencia con el desenrollado del DNA o separación de cadenas de DNA y la actividad de la helicasa, efectos directos en la membrana, iniciación en el daño del DNA induciendo la apoptosis (Gewirtz, 1999).

Las topoisomerasas modifican la topología del DNA sin alterar su estructura ni la secuencia de sus desoxinucleótidos. La topoisomerasa I es la encargada de cortar sólo una de las dos cadenas de la doble hélice del DNA y actúa en la transcripción del DNA, mientras que la topoisomerasa II corta ambas cadenas del DNA para aliviar el superenrollamiento, y actúa durante la replicación del DNA, siendo esta actividad modulada de acuerdo con la fase del ciclo celular y la actividad transcripcional (Binaschi *et al.*, 2001). Las antraciclinas actúan estabilizando una reacción intermedia en la que las cadenas de DNA se cortan y se unen covalentemente a un residuo de tirosina de la topoisomerasa II, evitando que eventualmente se vuelvan a unir. La formación del complejo ternario antraciclina-DNA-topoisomerasa II dependen de determinantes estructurales definidos. El sistema de anillos planos es importante en el intercalamiento del DNA ya que los anillos B y C se superponen con pares de bases

adyacentes y el anillo D pasa a través del sitio de intercalación, los restos de la molécula de la antraciclina que no se intercalan en el DNA, es decir el residuo del azúcar y el ciclohexano del anillo A parecen jugar un papel importante en la formación y estabilización del complejo ternario. El residuo del azúcar es determinante en la actividad de la antraciclina con las topoisomerasas II y esta aumenta la eliminar los amino sustituyentes del C-3 del azúcar o el grupo metoxilo del C-4 del anillo D de la antraciclina. Se ha observado que algunas antraciclinas también afectan a la topoisomerasa I (Minotti *et al.*, 2004). El daño causado al DNA por el complejo formado genera en la célula un arresto en el ciclo celular en las etapas G1 y G2 lo cual provoca muerte celular programada (Perego *et al.*, 2001; Zunino *et al.*, 2001). Se deduce que las células tumorales pueden volverse resistentes a las antraciclinas debido a la alteración de la expresión de genes de la topoisomerasa II (Lage *et al.*, 2000).

También se ha encontrado que muchos agentes anticancerígenos incluidas las antraciclinas, inducen el daño en el DNA mediante una respuesta apoptótica dependiente de la proteína p53, la cual recibe información de desórdenes metabólicos o daño genético en las células y si detecta daño severo emite señales para debilitar a estas células hasta llevarlas a la apoptosis, también denominada muerte celular programada (Weinberg, 2014). Se ha propuesto que esta proteína juega un papel importante en la citotoxicidad de las antraciclinas, habiendo reportes preclínicos y clínicos que lo sustentan, así como otros que lo rechazan, y esto puede ser debido a la gran heterogeneidad en cuanto a los tumores evaluados, a los métodos utilizados y a la respuesta de cada tumor (Bertheau *et al.*, 2002). Otro factor por considerar es el papel de p53 en regular la transición de las distintas fases del ciclo celular. Células tratadas con doxorubicina dependientes de p53 contribuyen a la inducción del producto del gen *p21*, un fuerte inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas involucradas en la transición de G₁ a S, lo que contribuye al arresto celular en G₁. Debido a la alta frecuencia de mutaciones de p53 en células tumorales, hasta en el 50% de los tumores, (Beroud y Soussi, 1998), se piensa que esta proteína contribuye a la resistencia a los agentes terapéuticos más utilizados (Bertheau *et al.*, 2002; Gasco y Crook, 2003). Por eso es importante identificar medicamentos que induzcan muerte celular independiente de p53 y definir el mecanismo de acción de estas drogas. Se ha informado que la citotoxicidad del taxol es independiente de la función p53 (Wahl *et al.*, 1996). Además, se ha descrito que varios medicamentos de investigación tienen mecanismos de acción independientes de p53 (De Bufalo *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1998; Kuroda *et al.*, 2003).

Una manera frecuente de evaluar el efecto de los compuestos citotóxicos en la proliferación celular es mediante la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), el cual

es una proteína muy bien conservada mostrada primeramente como un factor de la DNA polimerasa requerido para la síntesis de DNA en la replicación; sin embargo, se le han atribuido otras funciones como el remodelado de la cromatina, reparación del DNA, cohesión de las cromátidas hermanas y el control del ciclo celular (Maga y Hubscher, 2003) y se ha encontrado que los niveles de expresión de *PCNA* están asociados directamente con la proliferación celular (Strzalka y Ziemienowicz, 2011).

El gen *PCNA* es inducido por *p53* mientras que la proteína PCNA interactúa con las proteínas controladas por *p53* como la Gadd45, MyD118, CR6 y la más importante en el proceso de decidir el destino celular, la *p21*. Si la proteína PCNA está presente en abundancia en la célula en la ausencia de *p53*, la replicación del DNA ocurre. Por otro lado, si los valores de PCNA son altos en presencia de *p53* el DNA es reparado. Si PCNA se presenta en forma no funcional, está en cantidades bajas o no se encuentra, entonces la apoptosis ocurre (Paunesku *et al.*, 2001).

2.5. Historia de las estefimicinas, sus derivados, actividades y biosíntesis

Las estefimicinas son policétidos de la familia de las antraciclinas cuya estructura base se muestra en la Figura 5, donde cada letra “R” representa diferentes radicales o sustituciones en la molécula en las diferentes estefimicinas y estefimicinonas descubiertas. Una de las principales características de estas antraciclinas es la ramnosa ubicada en la posición R3, glucósido no presente en la mayoría de las otras antraciclinas encontradas. En el Anexo 1 se muestra una tabla con los diferentes sustituyentes en las posiciones “Rs” en las diferentes estefimicinas y estefimicinonas descritas”.

La **estefimicina (Stef)** primeramente llamada antibiótico U-20, 661 es un policétido de la familia de las antraciclinas que fue aislada de una cepa de *Streptomyces steffisburgensis* (Bergy y Reusser, 1967) y algunos estudios mostraron que esta molécula inhibía la síntesis de DNA al unirse a la doble cadena (Reusser, 1967). Posteriormente, la **estefimicina B (StefB)** fue descubierta en 1974 por Brodasky y Reusser y su estructura química completamente identificada en 1977 por Kelly *et al.*, donde a diferencia de la **Stef**, presenta un grupo metoxilo en el C-4' del glicósido en lugar del grupo hidroxilo de la **Stef**. Se encontró que la **StefB** tenía actividad contra bacterias Gram-positivas y también era capaz de inhibir las células de leucemia de ratón L-1210 y, por el contrario, no se detectó actividad antifúngica contra catorce hongos patógenos humanos evaluados (Brodasky y Reusser, 1974). Posteriormente, su estructura química fue corroborada por cristalografía (Arora, 1985)

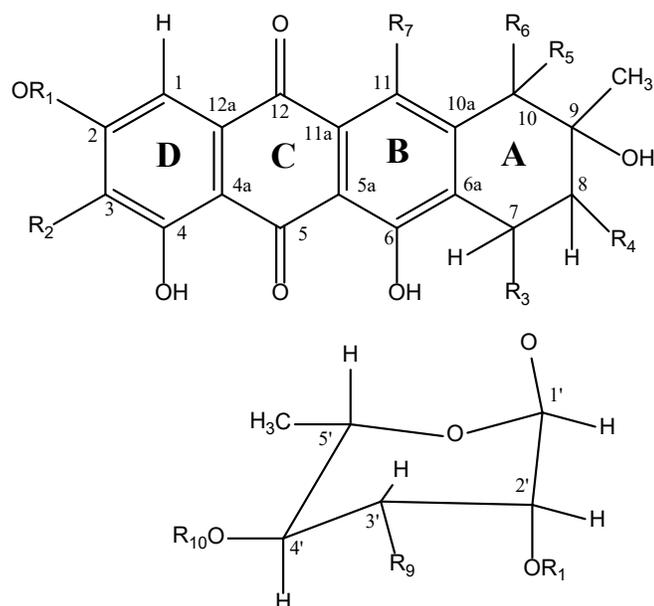


Figura 5. Estructura base de las estefimicinas donde las letras R representan los sitios en la molécula que tienen variaciones en las diferentes estefimicinas y estefimicinonas (Imagen propuesta a partir de la revisión de las estefimicinas conocidas hasta este momento).

En 1976, Kelly produjo la **estefimicinona** mediante la hidrólisis ácida o metanólisis de la **Stef** o la **StefB**, molécula que tuvo actividad contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium avium* y *Bacillus cereus*; y mediante hidrogenólisis obtuvo la **7-deoxiestefimicinona**, activa contra *Sarcina lutea* y *M. avium*. Al año siguiente, realizaron la metilación de la **Stef** y la **estefimicinona** en los carbonos 4 y 6 obteniendo la **4,6-Di-O-metilestefimicina** y la **4,6-Di-O-metilestefimicinona**, y en ese mismo trabajo obtuvieron nuevamente la **7-deoxiestefimicinona** mediante la reducción catalítica a baja presión en un exceso de FeCl_3 en HCl 1N a partir de la **Stef** (Kelly *et al.*, 1977). La **7-deoxiestefimicinona**, también fue acetilada en C-4 y C-6 lo que modificó su solubilidad, sin embargo, no evaluaron su actividad. En 1977 McCarville y Marshall utilizaron una enzima aislada de *Aeromonas hydrophila* dependiente de NADH para romper el enlace del glicósido unido a la **Stef**, logrando obtener también el compuesto **7-deoxiestefimicinona**. En este mismo año Wiley y colaboradores realizaron la reducción del grupo carbonilo de la estefimicinona en el C-10 mediante la catálisis de *Streptomyces nogalater* UC®-2787 y *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, obteniendo también el **estefimicinol**.

En 1978 Wiley y colaboradores estudiaron la biosíntesis de la **StefB** producida por *S. elgreteus* UC-5453 en medio mínimo adicionado con CH_3COONa , glucosa y metionina

marcados con ^{13}C , concluyendo que el C-9 es el iniciador, siendo el grupo metilo de ese carbono perteneciente al primer acetato, y que las otras metilaciones fueron agregadas a partir de metionina. El glucósido, en este caso ramnosa fue sintetizado a partir de la glucosa añadida.

La **10-dihidroestefimicina** y la **10-dihidroestefimicina B** fueron obtenidas a partir de **Stef** y **StefB** mediante reducción del grupo carbonilo del C-10 mediante la participación de *Actinoplanes utahensis* UC[®]-5885 y *Chaetomium* sp. UC[®]-4634, respectivamente, utilizando directamente a la Stef y Stef B como precursores de la reacción (Marshall *et al.*, 1980) o con los extractos libres de células de estos microorganismos (Wiley *et al.*, 1980), observando que la reacción es dependiente de NADPH. Su actividad antibiótica fue evaluada mostrando menor actividad que los compuestos originales, a excepción del ensayo con *Bacillus cereus* UC[®]-3145.

La **estefimicina C (StefC)** fue descubierta en 1985 por Brodasky y Mizsak, como un compuesto residual en la purificación de la **StefB**, la cual tiene un grupo metileno en el C-10 en lugar del grupo carboxilo de la **StefB**. Esta molécula presentó menor potencia como antibiótico en comparación con la **StefB** a excepción de una prueba con *Streptococcus pneumoniae* UC[®]-41.

Wiley y colaboradores (1987) realizaron una serie de modificaciones químicas en el C-3 de la **StefB**, colocando principalmente compuestos nitrogenados y algunos halógenos. Se encontró que en general, los derivados químicos mantenían la actividad antibiótica contra las bacterias Gram-positivas y la actividad anti-leucémica evaluada *in vivo*.

Posteriormente, Suzukake-Tsuchiya y colaboradores (1990) encontraron la **estefimicina D (StefD)** y la **2-demetilestefimicina D (2dm-StefD)**, producidas por *Streptomyces* sp. MH 538-30F7 donde el C-10 tiene un grupo metileno y el C-4' del glicósido tiene un grupo hidroxilo en lugar del metoxilo característico de la **StefB** y en el caso de la **2-dmStef-D** tiene un grupo hidroxilo en C-2 en lugar del grupo metilo. En ese estudio evaluaron diversos compuestos buscando aquellos que fueran preferentemente activos contra células que expresan el oncogen *ras*, con efectos de inhibición de crecimiento de células tumorales *ras*⁺ o evaluando compuestos que alteraran la morfología de las células *ras*⁺ y las cambiaran a células *ras*⁻. Los valores de CI_{50} de la **2dm-StefD** en las células de riñón de rata con oncogén *rasNRK* y una línea celular de riñón de rata no cancerosa NRK49 era de 0.73 y 5.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, siendo mucho más selectivo que la **StefD** y la doxorubicina. También se observó que la **2dm-StefD** modificó la morfología de las células *rasNRK* a concentraciones mayores del valor de

CI₅₀, sin embargo, no modificaba la morfología de las células NRK (sin oncogen), incluso a concentraciones de inhibición completa de crecimiento. Estos cambios morfológicos no se observaron en las otras antraciclinas estudiadas. Con respecto su actividad antibiótica, resultaron ser menores activas que la **StefB** y también su rendimiento de producción en la fermentación.

En 1991, Sriram y colaboradores obtuvieron la estructura molecular y el cristal de la **Stef**, encontrando una estructura tridimensional en la parte de la aglicona muy similar a la daunorubicina. Bajo un modelado con DNA se observó que la **Stef** tenía una mayor especificidad con CpG que con TpA, al igual que la daunorubicina y la nogalamicina. Entre estas moléculas hay diferencias en la quiralidad del C-9 con respecto a al grupo hidroxilo, donde la daunorubicina y la doxorubicina lo tienen en una posición axial y la **Stef** en posición ecuatorial. La hidrofobicidad de la **Stef** en comparación con los otros compuestos se debe básicamente a la ausencia de los amino azúcares cargados positivamente.

Se sabe que las antraciclinas mantienen su rigidez conformacional cuando están unidas al DNA, sin embargo, se conoce cierta flexibilidad limitada sobre todo en el C-7 del anillo A, donde se encuentra unido el glicósido, y entre los anillos B y D que se doblan ligeramente. Se sabe que los cromóforos de las agliconas de las antraciclinas se intercalan entre el par de bases GC con el dinucleótido CpG y que el glicósido sale de entre los surcos de la doble hélice de B-DNA. Los puentes de hidrógeno se encuentran en el complejo entre el compuesto y las bases de G para anclar la molécula en una orientación específica. Debido a que la **Stef** tiene más sustituyentes que otras antraciclinas en el anillo A, en los carbonos C-7, C-8, C-9 y C-10 y como la quiralidad del C-9 es igual a la de la nogalamicina, en el estudio *in silico* realizado por Sriram *et al.*, (1991), se asume que la **Stef** se comporta de igual manera que esta, en la preferencia de bases al unirse con el DNA. Se observaron tres puentes de hidrógeno que unen a la **Stef** y el DNA. El oxígeno del metoxilo en C-8 forma un puente de hidrógeno con el grupo amino de un residuo de guanina (G16). El nitrógeno de la G6 dona un enlace hidrógeno al oxígeno de C-7 del S21 del azúcar y el oxígeno en C-3' del azúcar S21 y oxígeno en C-2 a la T7, y de igual manera se observó que existía más afinidad a CpG que a TpA al igual que en la daunomicina y la nogalamicina (Wang 1992).

Kunnari y colaboradores en 1997 aislaron de *S. steffisburgensis* NRRL 3193, ATCC 27466 la **8-demetoxiestefimicina C**, la **8-demetoxiestefimicina** y la **8-2'-demetoxiestefimicina C** de forma natural e introdujeron a esta cepa genes que codifican para la enzima policétido ceto

reductasa y aromatasas en la biosíntesis de la nogalamicina, logrando la síntesis de la **2-8-2' demetoxiestefimicina C**.

En un estudio realizado en 2004 por Erdal y colaboradores, evaluaron 879 compuestos de la biblioteca del Instituto Nacional de Cáncer con diversos mecanismos de acción, entre ellos la **Stef**. 175 de estos compuestos indujeron la escisión de la citoqueratina-18 (CK-18) por una caspasa en cultivos de cáncer de colon HCT116 dependientes o independientes de p53, a concentraciones entre 1 y 5 μM . La **Stef** apareció como dependiente de la p53 para apoptosis mediante la medición de la CK-18-Asp396 y a través de un estudio concentración-respuesta se encontró que tenía una mayor actividad en células con p53 que en las $-p53$. Se encontró una fuerte inducción de la proteína p53, pero esta inducción no está relacionada con el grado de apoptosis. La **Stef** provocó daño del DNA y la apoptosis no mostró estar asociada al citoplasma o a la vía lisosomal.

El aislamiento, caracterización y expresión heteróloga del clúster de genes de biosíntesis de la **Stef** fue estudiado en 2006 por Gullón y colaboradores en *S. steffisburgensis* encontrándose 38 marcos de lectura abiertos (ORFs) de los cuales 24 están involucrados en la biosíntesis de la estructura, regulación y genes de resistencia; sin embargo, no se encontró ninguno de la biosíntesis de la L-ramnosa. Este clúster de 15 kb fue expresado heterológamente en *Streptomyces albus*, logrando el aislamiento de un intermediario biosintético, que combinado con la expresión de un plásmido pRHAM que dirige la biosíntesis de la L-ramnosa, se logró producir la **Stef**. La biosíntesis de la **Stef** inicia con la condensación de acetil-CoA como unidad iniciadora y 9 moléculas de malonil-Co-A como unidad extendedora, mediante la acción iterativa de una poliketido sintasa tipo II (PKS-II) que se asemeja mucho a la de la nogalamicina, hasta la formación del 2-hidroxi-ácido nogalónico. Sin embargo, difiere en la presencia de una poliketido reductasa responsable de la pérdida del grupo hidroxilo en C-2 que sucede en la en la **Stef**, y cuya reacción no está presente en la biosíntesis de la nogalamicina. La ciclación del cuarto anillo pareció ser diferente a otras antraciclinas, en las que se necesitan al menos tres actividades enzimáticas. En este caso, se encontró solamente la actividad de una ciclasa y una reductasa para terminar los cuatro anillos y obtener la **2-O-demetil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona**. Posteriormente, la C-O-2 metilación y la glicosilación se llevan a cabo, seguido de la 2'-O-metilación de la L-ramnosa, la oxidación del C-10 a un grupo ceto y la introducción del grupo metoxilo en C-8.

En 2008, Olano y colaboradores obtuvieron por biosíntesis combinatoria 12 nuevos derivados de la **Stef** mediante la expresión heteróloga en *S. albus* con combinaciones

diferentes de genes que dirigen la biosíntesis de varias deoxiazúcares. La glicosiltransferasa del clúster de la **Stef (StfG)** no logró reconocer los L-aminoazúcares, aunque se había observado cierta flexibilidad de la enzima por deoxiazúcares neutros o en cadena. En el análisis de actividad biológica contra células de cáncer de mama (MDA-MB-231), células de cáncer de pulmón no pequeñas (NSCLC A549) y adenocarcinoma de colon (HT29), se observó que la metilación en la posición C-3' de la **3'-O-metilestefimicina** aumentaba la actividad, estando en configuración axial. La ausencia del grupo ceto y del metoxilo en las posiciones C-10 y C-8, respectivamente de la **D-digitoxil-8-demetoxi-10-estefimicinona** aumentaron hasta 24 veces la actividad de la **Stef**, correspondiendo con la mayoría de las antraciclinas más activas como la daunorubicina, doxorubicina y epirubicina, en las que no existe 8-metoxilo ni 10-ceto ni otros sustituyentes en C-8 ni C-10 del núcleo tetracíclico.

Nachtigall y colaboradores en 2010 aislaron a partir de *Streptomyces* sp. Tü 6384 la aranciamicina anhidra, una antraciclina muy relacionada al grupo de las estefimicinas, salvo modificaciones en el C-2 característico de la aranciamicina y el glicósido. En su evaluación antibiótica esta molécula mostró sólo baja actividad contra *B. subtilis* y al ser evaluada contra adenocarcinoma gástrico (HM02), adenocarcinoma de seno (MCF-7) y carcinoma hepatocelular (HM02) se encontró menor actividad comparada con la aranciamicina.

Intaraudom y colaboradores (2015) obtuvieron la StefB, la 10-dihidroesftefimicina B y la **7-deoxiestefimicinona** a partir de *Streptomyces* sp. BCC27095 aislado de suelo, compuestos previamente descritos, al igual que un compuesto que erróneamente nombraron **StefC**. Este compuesto presenta en C-11 un grupo hidroxilo en lugar del protón característico de la **StefC**, por lo que la denominará **StefC***. Se encontró que la **StefB** tenía la mayor actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra con valores equivalentes al estándar de referencia, la rifampicina. La **StefC*** mostró la mayor actividad contra *Plasmodium falciparum* (antimalaria), mientras que, en la evaluación citotóxica, la **StefB** tuvo una mayor actividad contra las células de cáncer de mama (MCF-7), carcinoma epidermoide humano (KB) y células pequeñas de cáncer de pulmón de humano (NCI-H187) y la **StefC*** la mayor contra las células de fibroblastos renales de mono verde africano (Células VERO). Finalmente, se evaluó la actividad de la **StefB** en *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y la cepa patógena resistente a rifampin *M. tuberculosis* Mtb-209, obteniendo resultados atractivos para posteriores estudios.

El descubrimiento más reciente fue el de la estefimicina E la cual fue obtenida a partir de la cepa *Streptomyces* sp. OPMA02852 de origen marino. Esta molécula, a diferencia de la **Stef**, no se encuentra metoxilada en el C-8, tiene un grupo hidroxilo en el C-10 y otro en el C-4'. En

pruebas de bioactividad, esta presentó actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium bovis* BCG y *Mycobacterium smegmatis*.

3. Justificación

Los microorganismos juegan un papel relevante en la producción de compuestos bioactivos. Debido a la necesidad constante de nuevos y más efectivos fármacos para el tratamiento de enfermedades diversas como lo es el cáncer, se han buscado microorganismos productores de los mismos a partir de fuentes no convencionales.

Diversos estudios muestran que las plantas medicinales pueden ser una fuente para el aislamiento de microorganismos endófitos, principalmente actinobacterias, que por su hábitat y función característicos puedan producir compuestos de interés farmacológico

Amphipterygium adstringens representa una alternativa interesante como fuente potencial de microorganismos endófitos productores de compuestos bioactivos debido a su historial etnomédico con estudios fitoquímicos que corroboran algunas de sus actividades, así como por tratarse de una especie endémica mexicana que proporciona a sus endófitos características únicas para su desarrollo.

4. Hipótesis

Basados en los diversos estudios etnomédicos y fitoquímicos que apoyan las actividades biológicas del cuachalalate, así como su hábitat, que representa retos de supervivencia en los organismos que lo habitan, debido a las variaciones climáticas a lo largo del año y a la gran biodiversidad que caracteriza a la selva baja caducifolia, se piensa que puede ser una planta hospedera idónea para localizar microorganismos endófitos con la capacidad de producir compuestos bioactivos, principalmente con actividad citotóxica que puedan ser de interés farmacológico.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Aislar y purificar microorganismos endófitos en *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht (Cuachalalate) que sean capaces de producir metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

5.2. Objetivos Particulares

- Colectar muestras de *A. adstringens* en la Reserva Estatal Sierra Monte Negro en el estado de Morelos y aislar microorganismos endófitos de las mismas.
- Seleccionar los microorganismos con mayor potencial biosintético para su subsecuente estudio.
- Evaluar la actividad citotóxica de las cepas seleccionadas con líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos producidos por la cepa con mayor potencial citotóxico, mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar el posible mecanismo de acción del compuesto puro mayoritario sobre una línea celular cancerosa.

6. Metodología

6.1. Recolección del material vegetal

Las colectas de muestras de árboles de *A. adstringens* fueron realizadas en la Reserva Estatal Sierra Monte Negro en el poblado de Barranca Honda, en Tlaltizapán, Estado de Morelos, México (coordenadas 18°48'33.4476N, -99°07'13.944'W'). La primera colecta se realizó el día 5 de febrero del 2013 en época de sequía, donde se muestrearon tejidos vasculares de tronco y semillas de un árbol femenino y tejido vascular de tronco de un árbol masculino. En esta colecta no había hojas presentes en el árbol. La segunda colecta se realizó el día 19 de agosto del 2013 en época húmeda. Se tomaron muestras de tejido vascular de tronco, hojas y semillas del árbol femenino, así como muestras de tejido vascular de tronco y hojas del árbol masculino. En las dos colectas se muestrearon los mismos árboles tomando 3 muestras diferentes de cada tejido. Las muestras utilizadas para evaluación microbiológica fueron asperjadas con etanol al 70% y almacenadas en bolsas estériles Whirl-Pak®, estas se resguardaron en una hielera con hielo para disminuir la temperatura durante su transporte y posteriormente fueron manipuladas para su estudio. De igual forma, se tomaron muestras de hojas de ambos árboles y se colocaron en prensas para su posterior identificación en el Herbario Nacional de México de la UNAM.

6.2. Tratamiento de muestras y aislamiento de endófitos

Las muestras colectadas de *A. adstringens* se desinfectaron superficialmente de la siguiente manera: primeramente, se limpiaron con agua corriente, posteriormente en condiciones de esterilidad, se cortaron en piezas más pequeñas. Estas fueron sometidas a un procedimiento de esterilización por inmersión secuencial (un minuto por paso), en agua destilada estéril, etanol al 65%, agua destilada estéril, NaClO al 3.4% y finalmente con agua destilada estéril (modificada de Sánchez-Fernández *et al.*, 2015). 500 µl del último lavado fueron inoculados en agar nutritivo Difco™ 213000 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) e incubados a 29°C por una semana como prueba de la esterilidad superficial de la muestra. Las muestras ya desinfectadas se cortaron en pequeñas piezas de 0.3 cm² aproximadamente y fueron colocadas en diferentes medios de cultivo, característicos para diferentes tipos de microorganismos: agar nutritivo, medio rico para crecimiento de bacterias y hongos; ISP-2 (Shirling y Gottlieb 1966), medio rico para crecimiento principalmente de actinobacterias; 2% Agar (Bacto™ 214040), medio mínimo para un crecimiento lento de microorganismos para su fácil aislamiento; Czapek (Difco™ 233910), medio para crecimiento principalmente de hongos; Agar papa dextrosa (PDA) (Merck 110130), para crecimiento de hongos; y finalmente el medio

S7 (Stierle *et al.*, 1993), el cual se asemeja a los constituyentes de una planta para el crecimiento de microorganismos endófitos. Las cajas sembradas se mantuvieron en incubación hasta 2 meses a 29°C, con un fotoperiodo de luz-obscuridad 12:12h.

Para el aislamiento completo de las cepas, los crecimientos microbianos que emergieron de las muestras fueron resembrados en cajas petri con medio fresco del cual fueron obtenidas. Para el caso de las bacterias, estas se separaron mediante estría cruzada y diluciones en agar nutritivo hasta observar microscópicamente, y con ayuda de la tinción de Gram las cepas puras. Para los crecimientos fúngicos el aislamiento fue mediante resiembras por picadura en agar PDA y Czapek.

6.3. Descripción morfológica de hongos endófitos y su conservación

Para definir los diferentes morfotipos de los hongos endófitos aislados, estos se sembraron mediante picadura en agar en diferentes medios de cultivo: PDA, Czapek, ISP-2 y Sabouraud al 0.5% de dextrosa. Se realizaron observaciones continuas y después de dos semanas se evaluó la morfología macroscópica en los diferentes medios de cultivo. Los hongos que presentaron la misma morfología macroscópica en los diferentes medios de cultivo se registraron como el mismo morfotipo. Los morfotipos con características únicas fueron conservados en tubos inclinados conteniendo PDA en condiciones de temperatura ambiente y obscuridad.

6.4. Caracterización y evaluación de actinobacterias endófitas

6.4.1. Caracterización molecular de actinobacterias endófitas

Cuatro microorganismos que presentaron características morfológicas de actinobacterias durante el aislamiento de los endófitos fueron caracterizados molecularmente. El DNA de las actinobacterias se aisló utilizando el kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para amplificar la región de DNA que codifica para el gen 16S rRNA ribosomal se utilizaron los oligonucleótidos universales fD2 fwd5' -CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATG GCTCAG y rP2 rev 3' CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTACGACTTTGTTACGACTT (Weisburg *et al.*, 1991). La amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con la enzima Taq-DNA-Polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), primeramente con la desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 94°C, seguido de

30 ciclos (30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 56.5°C y 2 minutos de extensión a 72°C), con un paso de extensión final de 4 minutos a 72°C (Guzmán-Trampe *et al.*, 2015).

El producto de PCR fue purificado utilizando el kit comercial WizardRSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y enviado a la empresa Laragen, Inc. (CA, USA) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas del gen 16S rRNA (Anexo 2) fueron depositadas en el GeneBank bajo los números de acceso KU579247 al 50 y posteriormente analizadas mediante BLAST comparándolas con secuencias existentes en la base de datos de NCBI de 16S rRNA (Altschul *et al.*, 1997), realizando la última actualización de este análisis en el mes de junio del 2020. Se realizó el alineamiento de secuencia múltiple (MUSCLE) de las secuencias de las cepas YF4, TFC3 y TMC5 para conocer el grado de similitud entre las tres cepas. Los árboles filogenéticos fueron construidos con el programa Mega X (Kumar *et al.*, 2018) utilizando el método de máxima verosimilitud. Se realizó el alineamiento de las secuencias de las cepas aisladas con aquellas secuencias con las que presentaron mayor porcentaje de identidad y cobertura en el análisis BLAST. Para el caso de la cepa TFC3 que contaba con 1232 pb, se completó utilizando el genoma completo de esta cepa (Centeno-Leija *et al.*, 2016) mediante el servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008) ver Anexo 2. Las secuencias se alinearon y se recortaron, buscando tamaño homogéneo en todas las secuencias utilizadas. Para el árbol filogenético de la cepa NF3 se alinearon 1512 pb y como grupo externo se utilizó una secuencia de la especie de *Streptacidiphilus jiangxiensis*, para el caso de las cepas YF4, TFC3 y TMC5 se alinearon 1431 pb y como grupo externo se utilizó una secuencia de la especie *Cryptosporangium minutisporangium*. Los grupos externos para ambos árboles se eligieron según la clasificación taxonómica reportada por Nouioui y colaboradores (2018), donde se observó que pertenecían a clados diferentes. En el programa Mega X se realizó un estudio para elegir el modelo de sustitución adecuado para cada alineamiento, encontrando para ambos casos el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) como el más adecuado. Se corrió un bootstrap de 1000 réplicas para ambos árboles.

6.4.2. Caracterización microscópica de las actinobacterias endófitas

Matraces Erlenmeyer de 250-mL conteniendo 50 mL de medio ISP-2 líquido fueron inoculados con colonias de las cepas de actinobacterias aisladas, se dejaron crecer durante 8 días a una temperatura de 29 y 180 rpm. 200 μ L del cultivo fueron utilizados para inocular cajas petri conteniendo medio ISP-2 semisólido, dispersando el inóculo lentamente con perlas

de vidrio sobre toda la superficie. Las cajas se incubaron por 8 días a 29°C y se observaron en el microscopio estereoscópico Spencer. Se realizaron preparaciones en portaobjetos utilizando la tinción de Gram y se observaron en el microscopio Primo Star Zeiss de campo claro.

Colonias del mismo cultivo fueron tomadas para su visualización en el microscopio electrónico de barrido, siguiendo el protocolo descrito previamente (Bozzola y Russell, 1992). Una colonia de cada muestra se tomó directamente de la caja petri con un sacabocado de 5 mm de diámetro, se retiró el exceso de agar con ayuda de un bisturí y se colocó en un microtubo de 1.5 mL conteniendo formaldehído al 3% en buffer de fosfatos (PBS) donde permaneció por 24 horas. Las muestras fueron lavadas utilizando un gradiente de etanol de 30%, 50%, 70% 85% y 100% y fueron colocadas en un equipo Samdri-795 para el secado por punto crítico con CO₂. Cada muestra fue colocada en un portamuestra e introducida al equipo Jeol ion sputter JFC-1100 para ser cubiertas con oro y finalmente fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6360LV.

6.4.3. Crecimiento de las actinobacterias endófitas en diferentes medios de cultivo y su actividad antibiótica por el método de estría

Las actinobacterias aisladas fueron crecidas de igual forma que para su observación macroscópica, ahora utilizando diversos medios de cultivo semisólidos para observar su crecimiento, esporulación, producción de exudados y metabolitos secundarios difundidos al medio de cultivo. Los medios de cultivo evaluados fueron: GAE (Suárez *et al.*, 1980), MS (Hobbs *et al.*, 1989) y TYG-3 (Kontro *et al.*, 2005), como medios para esporular. El NMMP y MM (Hopwood 1967), NDMY y NMDV (Dekleva *et al.*, 1985), como medios mínimos, y el ISP-2 (Shirling y Gottlieb 1966), LB (Bertani 1951), R5 (Thompson *et al.*, 1980) y Seino (Ara *et al.*, 2008), como medios ricos.

Cada uno de estos medios de cultivo fue utilizado también para evaluar la actividad antibiótica de las cepas de actinobacterias mediante el método de estría (Williston *et al.*, 1947). Las actinobacterias fueron inoculadas con una estría a lo largo del diámetro de la caja petri conteniendo los diferentes medios de cultivo y se sellaron con papel Parafilm®, incubándolos a 29°C hasta lograr un crecimiento considerable de al menos 1 cm de ancho. Posteriormente, se inocularon de forma perpendicular las cepas prueba *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), representando bacterias Gram-positivas, *Escherichia coli* (ATCC 11229), como Gram-negativa, y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), como organismo eucarionte. Se inoculó siempre empezando del centro a la orilla con 0.5 cm de separación de

la estría central. Las cepas prueba se colocaron en ambos lados en orden inverso y se incubaron a 29°C por 8 días, monitoreando diariamente su crecimiento. Antes del ensayo se corroboró que todas las cepas fueran capaces de crecer en los medios de cultivo evaluados.

6.4.4. Cinéticas de crecimiento y obtención de sobrenadantes.

Matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido ISP-2 fueron inoculados con 10% v/v de un preinóculo de 3 días e incubados por 21 días a 29°C a 180 rpm. A partir del día cero se fueron tomando diariamente tres matraces, se filtraron 5 mL de cada matraz a través de membranas de celulosa de 0.45 µm (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) para la determinación de biomasa (peso seco) y se midió el pH de los sobrenadantes. Para obtener los sobrenadantes utilizados en las pruebas preliminares de citotoxicidad, se prepararon los matraces de igual manera que para las cinéticas y se detuvo la fermentación a los 8 días de crecimiento.

6.4.5. Fermentación y obtención de extractos orgánicos de las actinobacterias endófitas

Matraces de vidrio Fernbach de 2.8 L, conteniendo 1 L de medio líquido ISP-2, fueron inoculados con 10% v/v de un preinóculo de 3 días e incubados por 8 días a 29°C a 180 rpm. Después del tiempo de fermentación, cada cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue extraído exhaustivamente con 500 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) (X 8) seguido de 500 mL de acetato de etilo (AcOEt) (X 8). Los solventes orgánicos fueron evaporados mediante un evaporador rotativo de presión reducida Büchi R-215 acoplado a una bomba de vacío V-700. Los extractos orgánicos obtenidos fueron utilizados para determinaciones de actividad antibiótica y citotóxica.

6.4.6. Ensayo de actividad antibiótica por concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) fue calculada utilizando el método de dilución de medio (Wiegand *et al.*, 2008). Las cepas prueba utilizadas fueron las mismas empleadas en el método de estría. La estreptomycin (Sigma-Aldrich S6501) fue empleada como control positivo para *E. coli* y *M. luteus*, mientras que el ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich N4382) fue utilizado para *B. subtilis* y la cicloheximida (Sigma-Aldrich C6255) para *S. cerevisiae*. Cada extracto orgánico fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) puro a 10 mg/mL como solución stock. Para evaluar la actividad de los extractos orgánicos,

concentraciones de 1.6 a 800 µg/mL se utilizaron para *E. coli* y *S. cerevisiae*, mientras que concentraciones de 0.1 a 200 µg/mL se emplearon para *M. luteus* y *B. subtilis*. Se utilizó DMSO como control del diluyente, no presentando actividad en ninguna de las concentraciones utilizadas en los experimentos. Los fármacos comerciales fueron evaluados a las mismas concentraciones que los extractos orgánicos. Extractos orgánicos del medio de cultivo fueron utilizados como control negativo sin presentar actividad antibiótica.

Los experimentos fueron realizados por triplicado en microplacas de 96 pozos. El crecimiento se evaluó por turbidez a 595 nm en el Thermo Scientific Multiscan™FC Microplate Photometer. Los valores de CI_{50} obtenidos fueron calculados a partir de 12 diferentes concentraciones evaluadas y con curvas de inhibición sigmoideal mediante regresión lineal.

6.5. Cultivo de líneas celulares

Se utilizaron para este estudio líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 ATCC HTB-22), cáncer cérvico uterino (HeLa ATCC CCL-2) y la línea inmortal de queratinocitos (HaCaT), esta última donada por el Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, y autenticada por el Instituto Nacional de Medicina Genómica, México.

Las células MCF-7 y HaCaT fueron cultivadas rutinariamente como monocapa en medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina marca Caisson RPL03 (Caisson Laboratories, East Smithfield, UT, USA), 10% (v/v) de suero fetal bovino y 1% (w/v) de penicilina/estreptomicina. Las células HeLa fueron cultivadas también en monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle's suplementado con alta glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio marca Claisson DML10, 10% (v/v) suero fetal bovino y 1% (w/v) de penicilina/estreptomicina. Las células fueron incubadas a 37°C con una humedad de 98% en atmosfera de 5% CO₂ (Modificado de Alcántara-Flores *et al.*, 2015).

Para la evaluación de la StefB, se probaron otras líneas celulares de cáncer de mama, con características particulares en cuanto a la presencia o ausencia de: receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), células con la proteína HER2 (HER2) y la proteína p53 (p53-), siendo algunas de ellas líneas triple negativas. Las células evaluadas fueron: HCC1806 ATCC CRL-2335 (RE-, RP-, HER2-, p53-), HCC1937 ATCC CRL-2336 (RE-, RP-, HER2-, p53-), DU4475 ATCC HTB-123 (células no adherentes obtenidas de un proceso de metástasis RE-, RP-, HER2-), HCC70 ATCC CRL-2315 (HER2-) y la MBCD5 (donada por el Instituto Nacional

de Ciencias Médicas y Nutrición), todas estas cultivadas en medio RPMI-1640, como fue descrito anteriormente para MCF-7 y HaCaT.

Para los ensayos con las líneas celulares adherentes: MCF-7, HeLa, HCC1806, HCC1937, y MBCD5, las cajas de células con crecimiento confluyente fueron cosechadas, primero sustrayendo el medio de cultivo de las cajas y realizando un enjuague de estas con medio PBS. Posteriormente, se adicionaron 3 mL de solución de verseno (3.04 g Tris base, 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.4 g EDTA, 1 L H₂O MilliQ, pH 7.7) para despegar las células y se incubó a 37°C por 5 minutos. Posteriormente las células suspendidas en la solución fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos, lavadas con buffer PBS y vueltas a centrifugar para obtener el botón de células. Estas fueron resuspendidas en su medio de cultivo para ser contadas mediante una cámara de Neubauer. Para las células HaCaT y las HCC70, se utilizó una solución de tripsina final de 0.05% disuelta en PBS y se incubaron a 37°C por 5 minutos para despegar las células, y para las células DU4475, que son células no adherentes, estas se recuperaron por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos.

Para todas las células evaluadas se realizaron curvas de calibración con número de células conocidas (0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000, 15000, 20000, 30000, 40000 y 50000 células). En cada pozo por triplicado se colocaron las células y se incubaron por 2 horas, posteriormente se adicionaron 10 µl del kit WST-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) utilizado para medir proliferación celular y sobrevivencia mediante la sal monosódica 2-(2-Metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio y se incubaron por 2h a 37°C, con una humedad de 98% en atmosfera de 5% CO₂. Finalmente, las placas fueron leídas a 450 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiscan™ FC Microplate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

6.6. Evaluación de citotoxicidad *in vitro* y cálculo del valor de CI₅₀

Para evaluar la citotoxicidad se utilizaron placas de 96 pozos conteniendo 5000 células por pozo y se dejaron incubar 24 horas. Los extractos orgánicos, fracciones y los compuestos puros evaluados fueron tomados de soluciones stock previamente disueltas en DMSO puro hasta alcanzar las concentraciones deseadas (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL). Para la evaluación de sobrenadantes de cultivos, estos se filtraron en membranas de 0.22 µm con un diámetro de 2.5 cm (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) y se concentraron 10 veces en un equipo SpeedVac Concentrator Savant ISS110 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los tratamientos fueron incubados durante 48 horas. En todos los casos, el DMSO fue evaluado como control del diluyente (vehículo), el medio de cultivo estéril fue

utilizado como control negativo de citotoxicidad, y doxorubicina Sigma-Aldrich D1515 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a las mismas concentraciones que las evaluadas, fue utilizada como control positivo. Cuando la concentración final de DMSO fue mayor a 5% v/v (solo en concentraciones a 100 µg/mL), el efecto de mortalidad del DMSO fue sustraído del resultado, siendo 20% para las células MCF-7, 22% para las células HeLa y en la línea celular HaCaT el DMSO no presentó mortalidad a ninguna concentración probada. Después del tiempo de incubación, se utilizó el kit colorimétrico de conteo celular WST-8 y dependiendo del análisis a evaluar se calculó el número de células vivas utilizando las curvas de calibración, o el porcentaje de mortandad, tomando en cuenta como el 100% de viabilidad el número de células contabilizadas que no recibieron ningún tratamiento. Los valores de CI_{50} fueron determinados mediante un gráfico de porcentaje de mortandad contra concentración de extracto orgánico o compuesto químico y calculados por análisis de regresión logarítmico. Los resultados presentados son representativos de tres experimentos individuales.

6.7. Ensayo biodirigido para el aislamiento de los compuestos citotóxicos de la cepa *Embleya sp.* NF3

6.7.1. Fraccionamiento preliminar de los extractos orgánicos

Los extractos orgánicos de CH_2Cl_2 y AcEtO de la fermentación en matraz agitado de *Embleya sp.* NF3 fueron aplicados en una placa de CCFP (cromatografía de capa fina preparativa) de 20 cm de largo para realizar una separación preliminar e identificar si más de un compuesto presente en los extractos tenía actividad citotóxica. La placa cromatográfica fue eluída con una fase móvil CH_2Cl_2 :MeOH (90:10) y observadas a λ 365 nm. Posteriormente se delimitaron zonas en las placas de las cuales se recuperaron los compuestos presentes y se realizó una evaluación citotóxica cualitativa con células MCF-7, HeLa y HaCaT diluyendo en 1 ml de DMSO el total del compuesto recuperado en cada zona marcada.

6.7.2. Fermentación en biorreactor de la cepa *Embleya sp.* NF3.

Se utilizó un biorreactor de 14 L New Brunswick equipado con una turbina Rushton y un difusor de aire fue utilizado, conteniendo 10 L de medio ISP-2. El medio esterilizado fue inoculado con 10% v/v (inóculo de 3 días) de la cepa NF3 y la fermentación fue conducida a 60 rpm y 0.5 vvm por 8 días a 29°C, con control de temperatura por inmersión y con adición de antiespumante cuando fue necesario. Después del tiempo de fermentación, el medio de cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue extraído exhaustivamente

por el método de partición y la biomasa por maceración, ambos con acetato de etilo (AcOEt) hasta no obtener residuo. Los solventes orgánicos fueron evaporados mediante un evaporador rotativo de presión reducida Büchi R-215 acoplado a una bomba de vacío V-700 y después de ser evaluados por cromatografía de capa fina (CCF), estos fueron unidos, obteniendo 1 gramo de extracto orgánico. Para la CCF la fase estacionaria utilizada fue una placa de aluminio de Sílica Gel 60F₂₅₄ Sigma-Aldrich (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) y la fase estacionaria un sistema de elución CH₂Cl₂/MeOH 85:15. Las cromatoplasmas se observaron a 254 y 365 nm y posteriormente fueron tratadas con una solución de H₂SO₄ al 10%, como cromógeno, y calentadas por 2 minutos a aproximadamente 90°C (Sánchez-Ortiz, 2016).

6.7.3. Obtención de extractos orgánicos y fraccionamiento químico por métodos cromatográficos

El extracto orgánico (1 g) fue fraccionado mediante cromatografía en columna abierta, utilizando una columna de vidrio de 77 cm de largo empacada con 169 g de sílica gel 60 (malla 70-230) Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). La columna fue eluída con un gradiente de *n*-hexano/CH₂Cl₂ (100:0 a 0:100) y CH₂Cl₂/MeOH (99.9:0.1 a 0:100), obteniendo 256 fracciones de 10 mL, las cuales fueron analizadas mediante CCF y aquellas que tuvieron un perfil cromatográfico similar se combinaron, resultando en 14 fracciones primarias. A continuación, se evaluó la actividad citotóxica de las fracciones con células MCF-7, HeLa y HaCaT y la fracción más activa fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), utilizando un equipo con bomba binaria SL Agilent Serie 1200 (Santa Clara, CA, USA) empleando una columna Synergi 4u Polar RP 80A 150 X 2.0 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) y con fase móvil en gradiente, comenzando con MeOH:H₂O (80:20, v/v) hasta 100% MeOH a 0.2 mL/min de flujo. Este equipo se encontraba acoplado a un espectrofotómetro Waters 2996 con detector PDA (Milford, MA, USA) y a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) Esquire 600 (Bruker, Billerica, MA, USA).

6.7.4. Aislamiento y purificación de las estefimicinas y estefimicinonas

La purificación de compuestos se llevó a cabo en placas de CCFP de vidrio con Sílica gel 60 F₂₅₄ de 20 X 20 cm Sigma-Aldrich (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), siendo el primer sistema de elución utilizado el de CH₂Cl₂/MeOH 99:1 que permitió separar de la fracción primaria 4 los siguientes compuestos: 9 mg de 8-Demetoxi-10-deoxiestefimicinona (**5**), y 8 mg de la 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona (**6**), y se obtuvieron 10 mg de los compuestos 7-

Deoxiestefimicinona (**7a**) y 7-Deoxi-10-deoxiestefimicinona (**7b**) juntos. Los compuestos Estefimicina C (**2**), 8-Demetoxi-estefimicina B (**3**) y la estefimicina B (**1**) por tener polaridades muy similares se separaron mediante un sistema de elución CH₂Cl₂/MeOH 96:4 logrando purificar el compuesto **1** (18 mg) y posteriormente para separar los compuestos **2** (2.2 mg) y **3** (1.5 mg), se utilizó una fase móvil de AcOEt:Hex:Acetona:MeOH 96:2:1:1.

El compuesto 8-Demetoxi-10-deoxiestefimicina B (**4**) (11.8 mg) fue obtenido a partir de la unión de las fracciones 6 y 7 mediante CCFP con un sistema de elución CH₂Cl₂/MeOH 96:4.

6.7.5. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de **3** se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance a 400 MHz para el protón (RMN-¹H) y en 100 MHz para el carbono-13 (RMN-¹³C), utilizando cloroformo deuterado como disolvente. Los espectros de protón y carbono de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7a** y **7b** se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III con criosonda de tres canales enfriada por helio a 700 MHz para la RMN-¹H y en 175 MHz para la RMN-¹³C, utilizando Tetrametilsilano (TMS) como control interno. Para todos los compuestos aislados se utilizó DMSO-d₆ para disolverlos. Asimismo, se obtuvieron los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC Y HMBC, siendo sólo los últimos dos los que nos arrojaron información valiosa para elucidar completamente las moléculas. Los espectros de masas y sus patrones de fragmentación se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas Xevo G2-XS QTOF (Waters, Milford, MA, USA) y el estándar comercial de la estefimicina B de Enzo Life Sciences ALX-380-220-M001 (Ann Arbor, MI, USA) fue evaluado para compararlo con uno de los compuestos aislados. Los espectros de absorción se obtuvieron en un espectrofotómetro de UV-Vis GENESYS™ 10S de 190 a 700 nm. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27 con los compuestos en solución en CHCl₃ y esperando a que seicara el disolvente por completo, utilizando una celda de NaCl.

6.8. Evaluación de la actividad biológica en células MCF-7

6.8.1. Determinación de la actividad de la StefB por citometría de flujo

Un millón de células MCF-7 fueron incubadas en monocapa en cajas de petri por 24 horas y posteriormente fueron tratadas con el compuesto **3** a la concentración del valor de CI₅₀. Se

evaluaron tratamientos a 12, 24 y 48 horas. La doxorubicina, a su valor de CI_{50} , fue utilizada como control positivo de apoptosis a 48 horas de tratamiento. Como control del vehículo se utilizó DMSO a la mayor concentración utilizada a 48 horas y como control negativo se usaron células sin tratamiento al mismo tiempo de incubación. Para los otros compuestos evaluados, los tratamientos se hicieron a 48 horas a una concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Después de transcurrir el tiempo de tratamiento, las células se recolectaron de las cajas petri sin lavado previo, colectando tanto el medio de cultivo presente en la caja y posteriormente utilizando 3 mL de la solución de verseno e incubándolo por 5 minutos para despegar las células adheridas. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y fueron lavadas con PBS a 4°C y centrifugadas nuevamente. El botón de células fue tratado con el kit para detección de apoptosis APC Annexin V con 7-AAD Cat 640930 (BioLegend, San Diego, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas en un Citómetro de flujo Attune acoustic focusing evaluando 10,000 células, las cuales fueron analizadas en el Attune cytometric software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

6.8.2. Ensayo de proliferación celular por western blot

Las células MCF-7 fueron incubadas y tratadas como en el análisis de citometría de flujo. Posteriormente, el botón celular fue resuspendido en 75 μL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 1mM EDTA; 1 mM Na_3VO_4), conteniendo 40 $\mu\text{L/mL}$ de coctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) y 10 $\mu\text{L/mL}$ de inhibidores de fosfatasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se mantuvieron en agitación durante 20 minutos a 4°C y fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se calculó utilizando el kit comercial DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las proteínas (30 $\mu\text{g/pozo}$) fueron separadas en un gel de 12% SDS-PAGE y electro-transferidas a una membrana Immobilon-PSQ (fluoruro de polivinideno) PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA). La membrana fue bloqueada con 3% de leche descremada en polvo en buffer tris salino (TBS) por 30 minutos e incubada por 24 horas con el anticuerpo primario Anti-PCNA [EPR3821] ab92552 (Abcam, Cambridge, UK) diluido 1:1000 a 4°C. Como control interno, el anticuerpo rabbit anti-GAPDH GTX100118 (Genetex Inc., Irving, CA, USA) fue utilizado. Pasado el tiempo de incubación, la membrana fue lavada tres veces con TBS-Tween 5% e incubada por 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a una dilución 1:15,000. Las bandas quimioluminiscentes fueron detectadas utilizando el

kit Trident ECL plus GTX400006 (Genetex Inc., Irving, CA, USA) y las imágenes fueron obtenidas en una película Carestream Kodak BIOMAX Light Film CAT 178 8207 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

6.8.3. Evaluación de senescencia y cambios morfológicos

Se utilizaron placas de 24 pozos conteniendo 10,000 células MCF7 por pozo tratadas de igual forma que en el ensayo de citometría de flujo. Para conocer si las células vivas se encontraban en buen estado o en estado de senescencia, se utilizó el kit de tinción con β -Galactosidasa (Cell Signaling Technology, INC., Danvers, MA, USA) a pH 6.0 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas fueron observadas en un microscopio invertido Olympus IX-71 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) adaptado con un objetivo Olympus LUCPlanFL N 20x (N.A. 0.45). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Evolution VF (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

6.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos realizados para las pruebas de citotoxicidad se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0. Se realizaron los análisis de varianza (ANOVA) de una vía para encontrar diferencias significativas entre los diferentes experimentos con un nivel de significancia de $\sigma=0.05$, cuando se encontraron diferencias se aplicó una prueba de Tukey.

7. Resultados

7.1. Identificación de la planta hospedera

Las muestras de hojas y semillas fueron identificadas como *Amphipterygium adstringens* por la Biol. Rosalinda Medina y los especímenes se depositaron en el Herbario Nacional de la UNAM con los números de folio 1365484 (árbol masculino) y 1365483 (árbol femenino) (Figura 6).



Figura 6.
Ejemplares de *Amphipterygium adstringens* depositados en el Herbario Nacional de la UNAM. a) Árbol masculino, b) Árbol femenino

7.2. Aislamiento de microorganismos endófitos

La presencia de endófitos en la planta *A. adstringens* fue evaluada por primera vez en este trabajo. El porcentaje de microorganismos aislados en la primera y segunda colecta, dependiendo del medio de cultivo utilizado y el tejido de la planta se muestran en la Figura 7.

En la primera colecta (temporada de lluvias) 79 morfotipos bacterianos y 20 morfotipos de hongos fueron obtenidos. El tejido vascular del tronco del árbol femenino proporcionó el mayor número de microorganismos, seguido de las semillas, mientras que el tejido vascular del tronco masculino proporcionó solamente el 7% de las bacterias y ningún hongo.

El uso del medio ISP-2 resultó en el mejor medio para aislar bacterias y hongos, seguido del agar nutritivo.

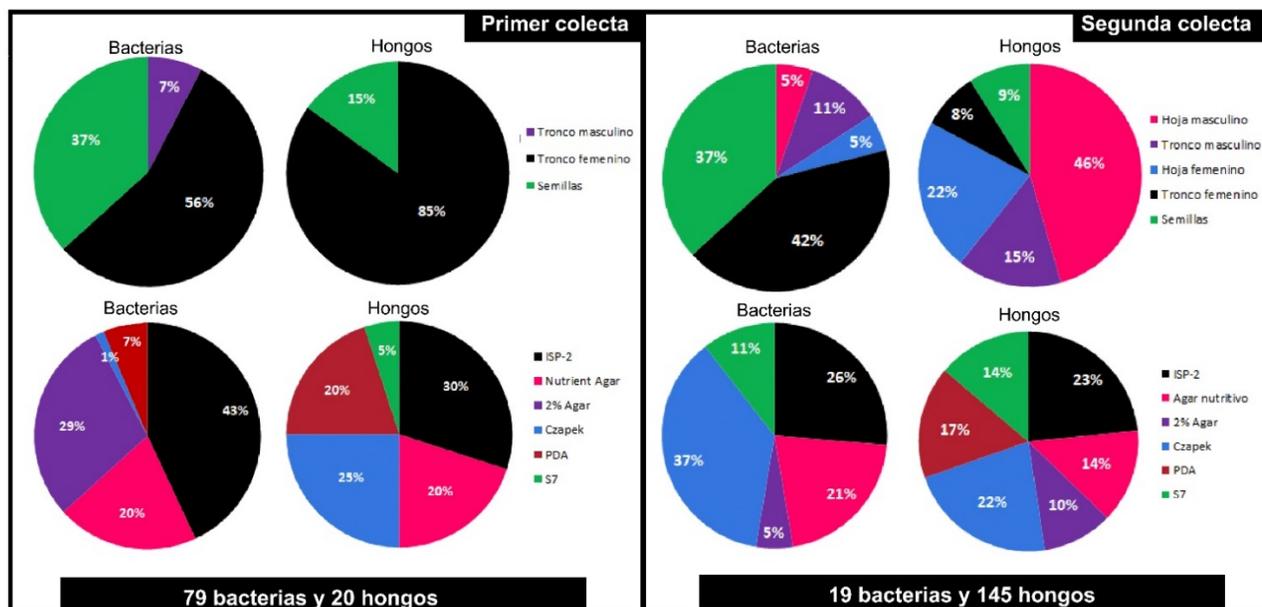


Figura 7. Distribución por porcentaje de los microorganismos aislados de *A. adstringens* por área muestreada, el medio de cultivo del cual se aisló y la colecta en la que se encontró.

En la segunda colecta (temporada de lluvias), 19 morfotipos bacterianos y 145 morfotipos de hongos fueron aislados. En esta ocasión, las hojas tanto del árbol masculino como del femenino fueron evaluadas. La mayor cantidad de bacterias se obtuvo del tejido vascular del tronco femenino, seguido de las hojas del árbol masculino. La siembra en medio Czapek y el ISP-2, resultaron en la mayor cantidad de bacterias y hongos.

De un total de 263 microorganismos aislados, cuatro cepas bacterias presentaron características micro y macroscópicas de las actinobacterias, como micelio pequeño observado a microscopio óptico a un aumento de X1000 y formación de colonias irregulares observadas mediante microscopio estereoscópico a X250. Dos de esos microorganismos fueron aislados del tronco femenino en la primera colecta, uno en agar nutritivo (cepa NF3) y otro en medio ISP-2 (cepa YF4). Las otras actinobacterias (cepas TMC5 y TFC3) se obtuvieron en la segunda colecta en medio Czapek de tronco masculino y femenino respectivamente. Considerando la relevancia histórica de las actinobacterias como fuentes de compuestos bioactivos, estos microorganismos fueron seleccionados para su caracterización y evaluación de actividad biológica.

7.3. Caracterización molecular de las actinobacterias endófitas

La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA es ampliamente utilizada para la identificación y taxonomía molecular como un indicador de la relación entre los organismos. Debido a que las bases de datos son actualizadas constantemente por la aparición de nuevas cepas y secuencias, la última actualización del BLAST se realizó en junio del 2020. La secuenciación de 1272 pares de bases (pb) de la cepa NF3, mostró un 99.8 % de identidad con diversas cepas de *Streptomyces scabrisporus*, recientemente clasificado como *Embleya scabrispora* (Nouioui *et al.*, 2018) y con una especie de *Streptomyces hyalinus* NBRC 13850, recientemente clasificado como *Embleya hyalina* (Komaki *et al.*, 2020). Por su parte las cepas YF4 con 1458 pb, TFC3 con 1232 pb y TMC5 con 1427 pb, presentaron alta identidad entre ellas (98-99%) y con varios otros microorganismos, entre ellos *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus*, *Wangella harbinensis*, *Actinoplanes* sp., *Pseudosporangium ferrugineum*, *Krasilnikovia cinnamomea*, diversas especies de *Phytohabitans*, entre otros. Cuando las tres secuencias fueron comparadas entre sí, YF4 y TFC3 tuvieron 98.37% de identidad, YF4 y TMC5 98.53% y TFC3 y TMC5 99.27%. Las secuencias obtenidas se muestran en el Anexo 2.

El árbol filogenético de NF3 (Figura 8) incluye a esta cepa en un clado que contiene solamente a todas las cepas de *E. scabrispora* reportadas a la fecha, así como una cepa de *E. hyalina* la cual mostró una similitud con el genoma de *E. scabrispora* NBRC 13850 de 99.7%. El clado obtenido en este árbol filogenético tiene un 96% de bootstrap, lo que coloca claramente a nuestra cepa dentro de este grupo de microorganismos.

Con respecto al árbol filogenético obtenido para las otras actinobacterias donde se encuentran las cepas YF4, TFC3 y TMC5, se observa lo cercanos que son evolutivamente todo este grupo de actinobacterias y las pequeñas diferencias que existen entre ellos, al menos en el gen 16S rRNA aquí estudiado (Figura 9) mostrando valores de bootstrap bajos en varios clados. Las cepas TFC3 y TMC5 que se había encontrado que tenían una mayor similitud entre ellas, se mostraron en un clado definido con un valor de 94% de bootstrap, el cual no comparten con ninguna otra especie reportada hasta ahora, y la cepa YF4 se encontró situada fuera de algún clado definido. Debido a la reclasificación genómica reportada recientemente para las actinobacterias (Nouioui *et al.*, 2018) donde los géneros de *Actinoplanes*, *Pseudosporangium*, *Couchioplanes* y *Krasilnikovia* son considerados como *Actinoplanes* por las pocas diferencias que existen entre ellos, se decidió en lo subsecuente de este trabajo, denominar a las cepas aisladas como *Actinoplanes* sp. YF4, TFC3 y TMC5.

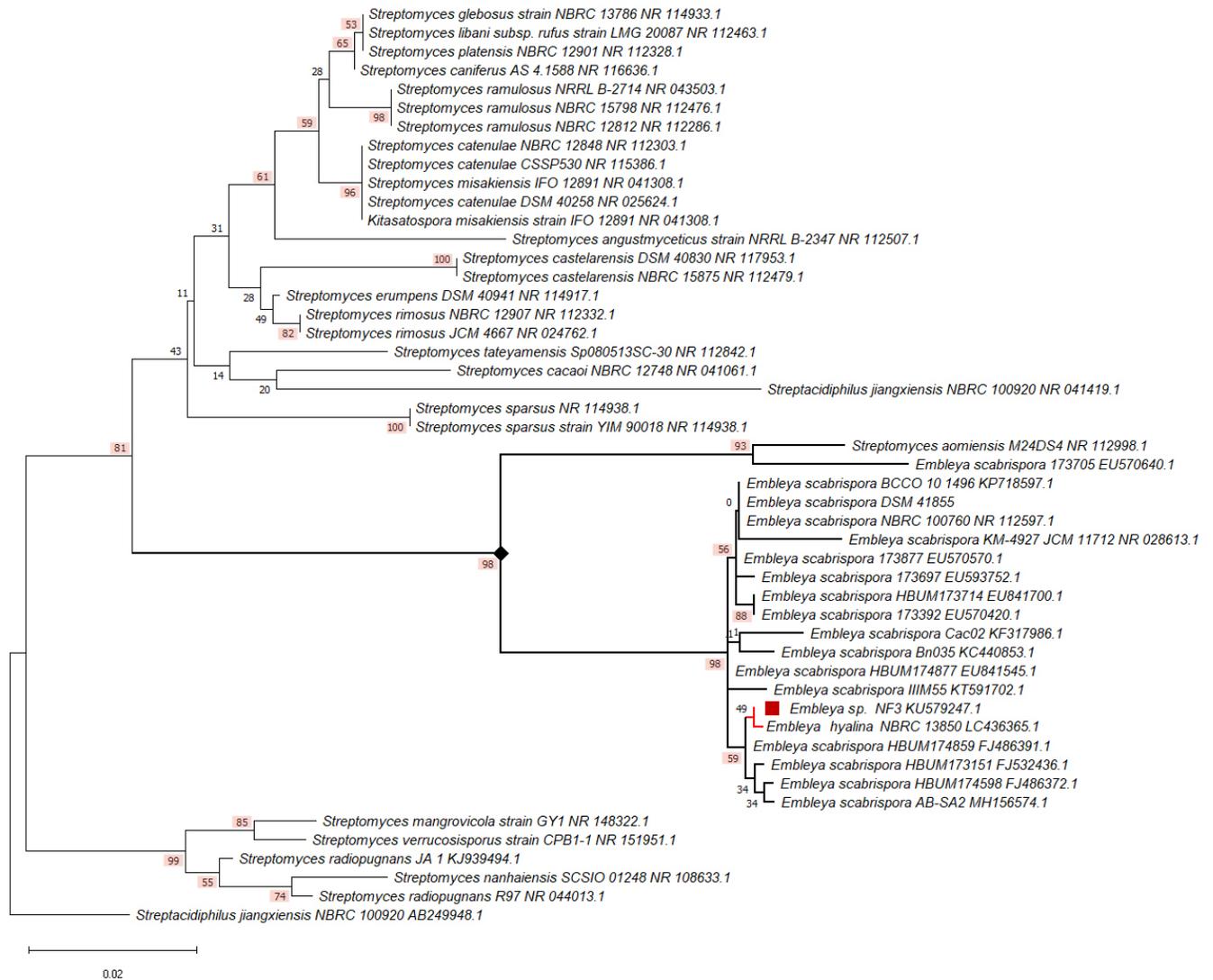


Figura 8. Árbol filogenético de la cepa *Embleya* sp. NF3 utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei. Los valores de bootstrap fueron calculados de 1,000 remuestreos y los valores arriba del 50% se muestran con un recuadro naranja. *J. jiangxiensis* representa al grupo externo.

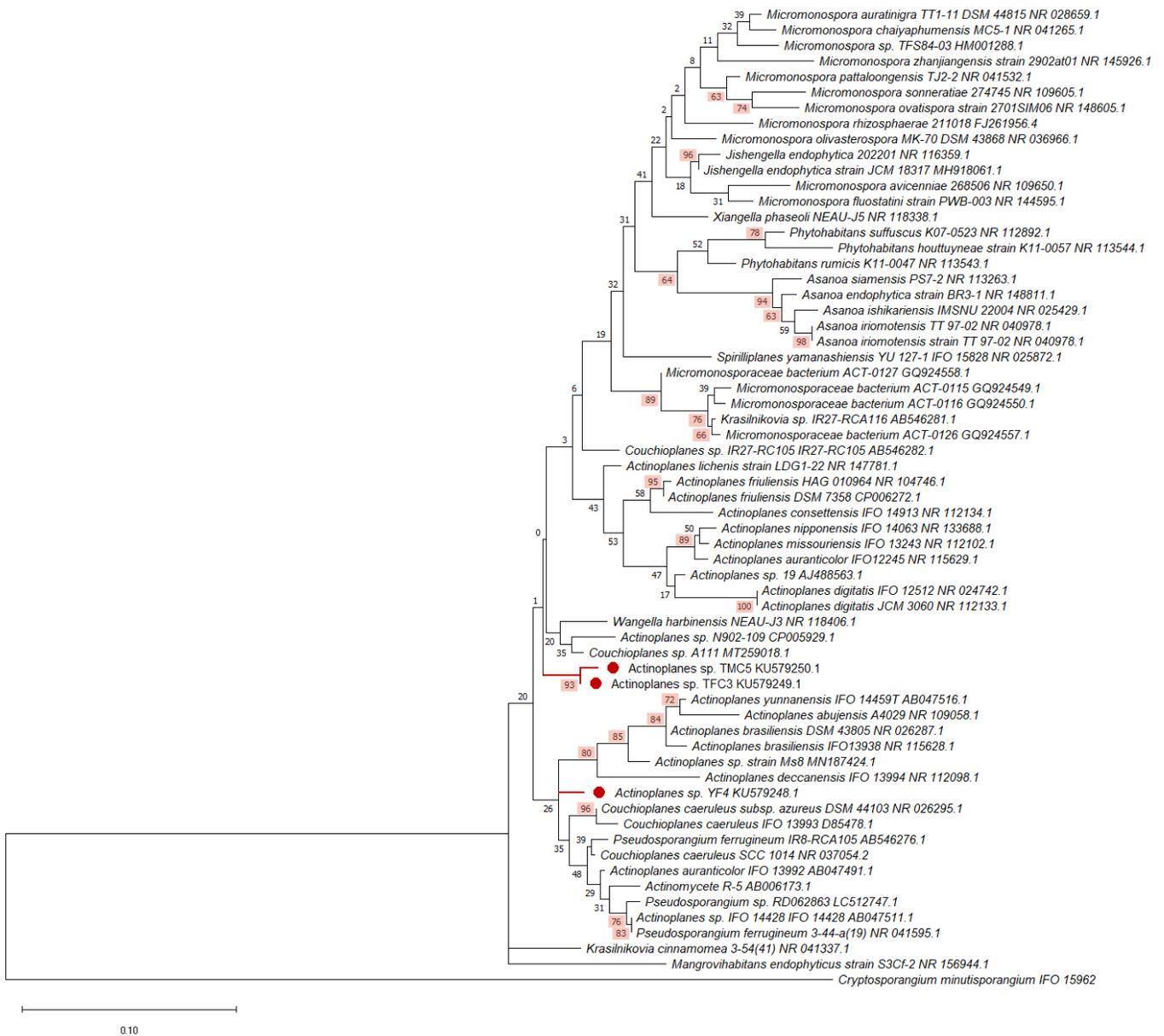


Figura 9. Árbol filogenético de las cepas de *Actinoplanes* sp. YF4, TFC3 y TMC5 utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei. Los valores de bootstrap fueron calculados de 1,000 remuestreos y los valores arriba del 50% se muestran con un recuadro naranja. *C. minutisporangium* representa al grupo externo.

7.4. Caracterización microscópica de las actinobacterias endófitas, su crecimiento y actividad antibiótica en diferentes medios de cultivo

Con la finalidad de conocer a las actinobacterias aisladas, se realizaron observaciones macroscópicas evaluando su crecimiento, color, difusión de color al medio de cultivo, esporulación y morfología de las colonias en diferentes medios de cultivo: medios específicos para esporular (GAE, MS y TYG-3), medios mínimos (NMMP, MM, NDMY y NDMV) y medios ricos (ISP-2, LB, R5 y Seino) (Cuadro 1).

Para la cepa *Embleya* sp. NF3 se observó en general buen crecimiento, cambios de coloración y las formas de las colonias en los distintos medios de cultivo, esporulación, difusión de algún metabolito al agar y presencia de micelio aéreo en algunos de ellos. Con respecto a su actividad antibiótica se observó sobre todo actividad contra *M. luteus* en casi todos los medios y variaciones en cuanto a inhibición de *B. subtilis*, y *S. cerevisiae*, sin embargo, nunca se observó actividad contra la bacteria Gram-negativa *E. coli*. En el estudio microscópico (Figura 10a), la cepa crecida en medio ISP-2 mostró colonias que fueron cambiando de rosa claro, como agregados rugosos, hasta colonias oscuras por la formación de micelio aéreo y pigmentación color guinda difundida en el agar. En campo claro fue evidente la presencia de micelio Gram-positivo y mediante MEB se observó micelio y esporas en forma lineal y en algunas zonas esporas libres.

La cepa *Actinoplanes* sp. YF4 no esporuló, ni mostró presencia de micelio aéreo o difusión de algún compuesto al agar en ninguno de los medios probados. Se observó buen crecimiento en todos los medios de cultivo, siendo un poco menor en LB, NMMP y MM. En cuanto a su perfil de antibiosis no se encontró actividad de inhibición total de crecimiento en ninguna de las cepas probadas; sin embargo, en los medios mínimos NDMY y NDMV si se presentó un decremento mínimo de crecimiento de *M. luteus* para el primer medio, y de *M. luteus* y *B. subtilis* para el segundo. En microscopía estereoscópica se observaron colonias naranja brillantes e irregulares, confirmando mediante microscopía de campo claro el micelio Gram-positivo y en MEB se observó una malla cubriendo el micelio, el cual fue más evidente un aumento de X 10,000 y sin formación de esporas (Figura 10b).

Cuadro 1. Caracterización de las actinobacterias en diferentes medios de cultivo y su antibiosis por el método de estría.

Embleya sp. NF3										
Medio de cultivo	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS						ANTIBIOSIS POR EL MÉTODO DE ESTRÍA			
	Crecimiento	Color	Difusión al medio	Esporulación	Morfología colonial	Micelio aereo	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
GAE	bueno	rosa	amarillo	si	M-I-CO-M	si	++++	+	-	-
MS	moderado	blanco	no	no	P-C-P-B	no	ne	ne	ne	ne
TYGmod	moderado	amarillo	guinda	no	M-I-CO-M	si	ne	ne	ne	ne
NMMP	moderado	blanco	no	no	P-C-P-B	no	+++	-	-	-
MM	moderado	rosa claro	rosa claro	si	P-I-CO-M	si	++++	++	-	-
NDMY	bueno	amarillo intenso	guinda	si	M-I-CO-M	si	-	*	-	-
NDMV	moderado	amarillo	guinda	si	M-I-CO-M	si	-	+	-	-
ISP-2	bueno	rosa	guinda	si	M-I-CO-M	si	++++	++	-	-
LB	moderado	amarillo	no	no	P-I-CO-M	no	++++	++	-	++
R5	bueno	rosa	guinda	si	M-I-CO-M	si	-	-	-	-
Seino	bueno	rosa	guinda	no	M-I-CO-M	no	++++	++	-	++++

Actinoplanes sp. YF4										
Medio de cultivo	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS						ANTIBIOSIS POR EL MÉTODO DE ESTRÍA			
	Crecimiento	Color	Difusión al medio	Esporulación	Morfología colonial	Micelio aereo	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
GAE	bueno	naranja	no	no	P-C-P-B	no	-	-	-	-
MS	bueno	naranja	no	no	P-I-CO-M	no	ne	ne	ne	ne
TYGmod	bueno	naranja claro	no	no	P-C-P-B	no	ne	ne	ne	ne
NMMP	moderado	transparente	no	no	P-I-CO-B	no	-	-	-	-
MM	moderado	naranja claro	no	no	P-C-P-B	no	-	-	-	-
NDMY	bueno	naranja	no	no	M-C-P-B	no	*	-	-	-
NDMV	bueno	naranja claro	no	no	M-C-P-B	no	*	*	-	-
ISP-2	bueno	naranja brillante	no	no	M-I-CO-B	no	-	-	-	-
LB	moderado	transparente	no	no	P-I-CO-B	no	-	-	-	-
R5	bueno	naranja	no	no	M-I-CO-B	no	-	-	-	-
Seino	bueno	rosa claro	no	no	P-C-P-B	no	-	-	-	-

Actinoplanes sp. TFC3										
Medio de cultivo	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS						ANTIBIOSIS POR EL MÉTODO DE ESTRÍA			
	Crecimiento	Color	Difusión al medio	Esporulación	Morfología colonial	Micelio aereo	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
GAE	bueno	amarillo claro	no	no	M-I-CO-M	no	*	-	-	-
MS	bueno	rosa transparen	no	no	M-I-CO-M	no	ne	ne	ne	ne
TYGmod	moderado	rosa transparente	no	no	M-I-CO-B	no	ne	ne	ne	ne
NMMP	bueno	naranja claro	no	no	M-I-CO-B	no	+++	-	-	-
MM	bueno	rosa claro	no	no	M-I-CO-B	no	++++	-	-	-
NDMY	bueno	crema	no	no	M-I-CO-B	no	*	-	-	-
NDMV	moderado	rosa claro	no	no	P-C-P-B	no	*	*	-	-
ISP-2	bueno	rosa claro	no	no	M-I-CO-B	no	+++	-	-	-
LB	moderado	rosa-naranja	no	no	M-I-CO-B	no	+++	-	-	-
R5	bueno	naranja claro	no	no	G-I-CO-B	no	++	-	-	-
Seino	bueno	rosa claro	no	no	P-I-CO-B	no	+++	-	-	+++

Continuación del Cuadro 1. Caracterización de las actinobacterias en diferentes medios de cultivo y su antibiosis por el método de estría.

Actinoplanes sp. TMC5										
Medio de cultivo	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS						ANTIBIOSIS POR EL MÉTODO DE ESTRÍA			
	Crecimiento	Color	Difusión al medio	Esporulación	Morfología colonial	Micelio aéreo	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
GAE	bueno	amarillo	no	no	P-I-CO-M	no	+	-	-	-
MS	moderado	rosa	no	no	P-I-CO-M	no	ne	ne	ne	ne
TYGmod	moderado	rosa	no	no	P-I-CO-M	no	ne	ne	ne	ne
NMMP	bueno	naranja	no	no	G-I-CO-M	no	-	-	-	-
MM	moderado	rosa	no	no	M-I-CO-M	no	-	-	-	-
NDMY	bueno	negro	no	si	G-I-CO-M	si	*	-	-	-
NDMV	bueno	negro	café oscuro	si	G-I-CO-M	si	*	*	*	*
ISP-2	bueno	naranja	no	no	M-I-CO-M	no	-	-	-	-
LB	bueno	rosa-naranja	no	no	P-I-CO-M	no	-	-	-	-
R5	bueno	amarillo	no	si	M-I-CO-B	no	-	-	-	-
Seino	bueno	rosa	no	no	P-I-CO-M	no	-	-	-	-

En la columna de morfología colonial, la descripción es la siguiente: La primera letra describe el tamaño (P=pequeña, M=mediana, G=grande); la segunda letra describe forma (C=circular, I=irregular); la tercera letra describe la superficie (P=plana, CO=convexa); y la cuarta letra describe el brillo superficial (M=mate, B=brillante). El tamaño promedio de una colonia fue aproximadamente de 2 mm, y pequeño o grande se refieren con base a esa medida. En la columna de antibiosis la actividad se define como: (++++)=*inhibición complete de crecimiento*; (+++)=*inhibición parcial*; (++)=*baja inhibición*; (+)=*inhibición mínima de crecimiento*, (-)=*sin inhibición*; (ne)=*no evaluado*; (*)=*no se observó área de inhibición pero si una disminución de crecimiento a lo largo de toda la estría*.

Al igual que la cepa *Actinoplanes* sp. YF4, *Actinoplanes* sp. TFC3 no esporuló ni mostró presencia de micelio aéreo o difusión de algún compuesto al agar en ninguno de los medios probados, presentó poco crecimiento en los medios TYG-3, LB y NDMV. El mejor crecimiento se observó en el medio ISP-2 y en cuanto a las pruebas de antibiosis la mayor actividad se presentó en el medio Seino con una inhibición de crecimiento del 75% para *S. cerevisiae* y *M. luteus*. Esta cepa se observó como colonias rosas, brillantes y circulares en el microscopio estereoscópico, micelio Gram-positivo, y a los mayores aumentos se observó con una ligera malla recubriendo el micelio en las zonas más viejas de las colonias (Figura 10c).

La cepa *Actinoplanes* sp. TMC5, en comparación con los otros *Actinoplanes*, esporuló en los medios mínimos NDMV, NDMY y R5. En el medio NDMV fue en el único medio que se observó difusión color café al agar, alta esporulación, presencia de exudados y un poco de inhibición de crecimiento de las cuatro cepas prueba en las antibiosis. En microscopía estereoscópica, se observaron colonias color naranja claro y particularmente se observó una tinción Gram-negativa. En MEB se observaron a un aumento de x2,500 agregados esféricos que, al ser observados a mayor aumento (x10,000) se distinguió que el micelio que formaba

esos agregados se encontraba recubierto de una película, probablemente la causante que la tinción no se llevara a cabo correctamente (Figura 10d).

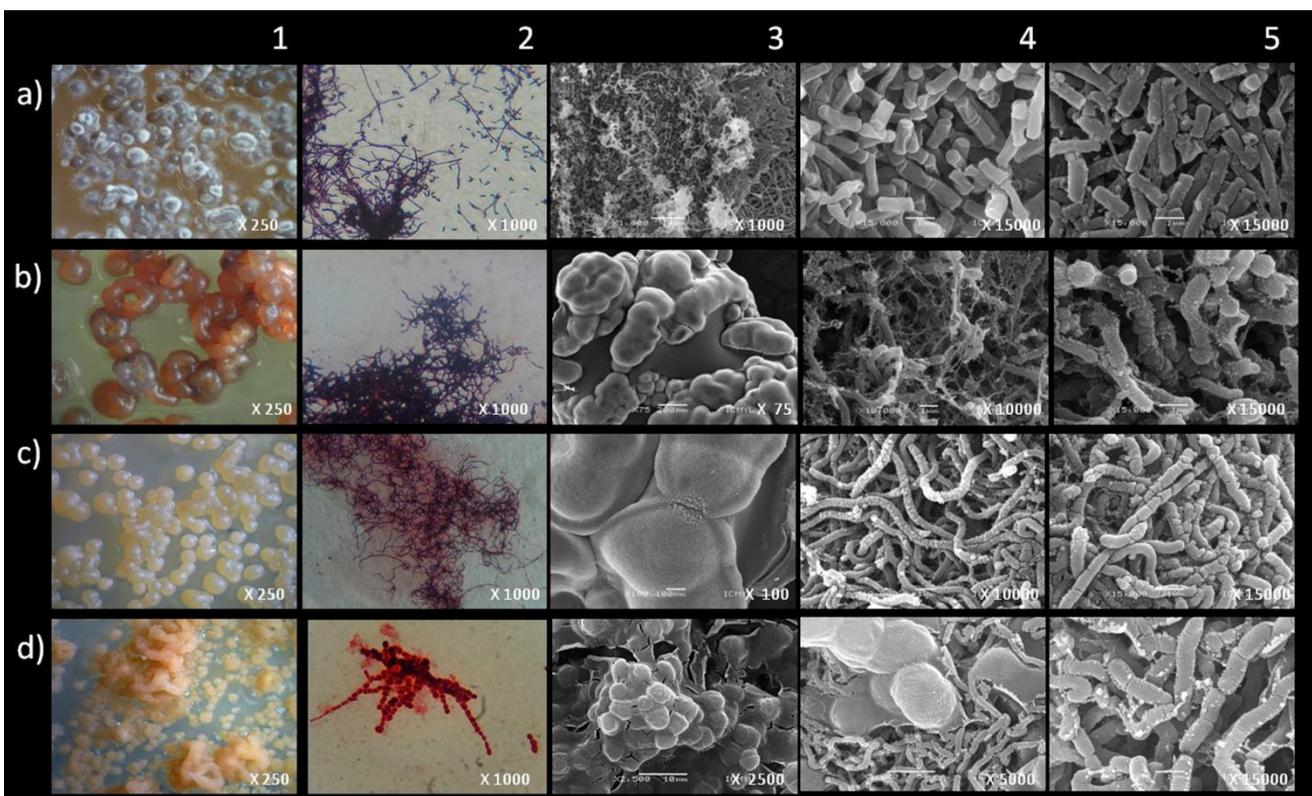


Figura 10. Micrografías de endófitos. a) *Embleya* sp. NF3, b) *Actinoplanes* sp. YF4, c) *Actinoplanes* sp. TFC3 y d) *Actinoplanes* sp. TMC5. La columna 1 contiene micrografías tomadas en microscopio estereoscópico (X250), la columna 2 muestra imágenes adquiridas en un microscopio óptico (X1000) y las columnas 3, 4 y 5 son micrografías obtenidas en un microscopio electrónico de barrido cuyos aumentos se muestran en cada imagen.

7.5. Efecto en la proliferación o muerte celular de los sobrenadantes de las actinobacterias aisladas.

Con los resultados de crecimiento y actividad biológica del Cuadro 1, se decidió realizar una prueba preliminar para saber si las actinobacterias aisladas tenían un efecto en la proliferación celular o la muerte en células MCF-7. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos.

Es importante tomar en cuenta que la evaluación de los sobrenadantes incurre en problemas técnicos al momento de realizar el análisis debido a la viscosidad del producto de la fermentación que probablemente se deba a la secreción de polisacáridos (*Actinoplanes* sp. TMC5 en ISP-2 y *Actinoplanes* sp. TFC3 en ISP-2) o la liberación de pigmentos de este (*Embleya* sp. NF3-ISP-2), por lo que en algunos casos las desviaciones estándar son más

altas. Se probaron también los medios de cultivo sin inóculo para observar si estos por si solos causaba un efecto en las células; como controles positivos se utilizaron el cisplatino, el etopósido y la doxorubicina, fármacos empleados actualmente en el tratamiento de diversos tipos de cáncer; el vehículo de los controles positivos (DMSO) en su mayor concentración utilizada; y como control negativo se colocaron las células sin tratamiento alguno.

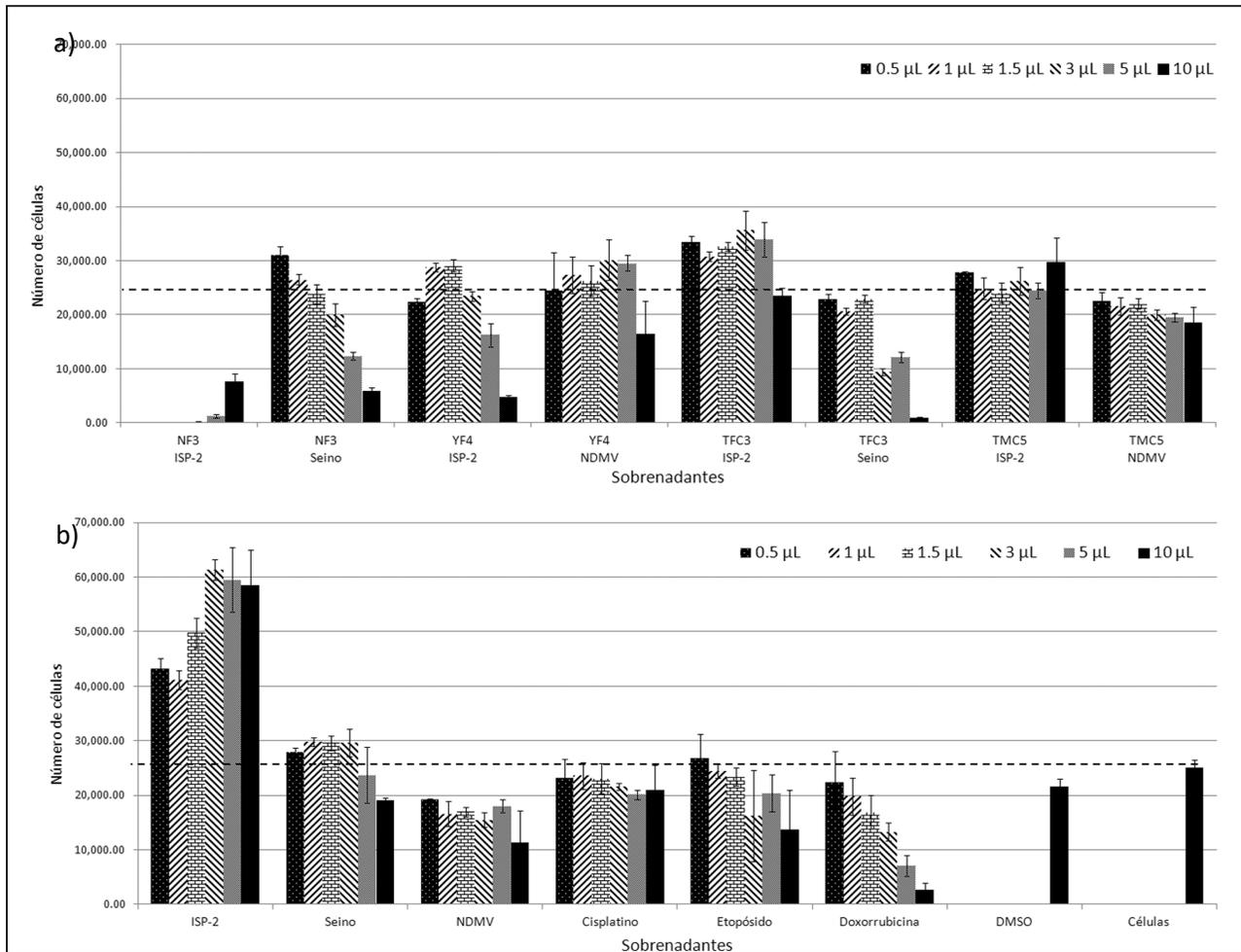


Figura 11. Efecto en la proliferación de células MFC-7 de: a) Los sobrenadantes de las actinobacterias fermentadas por 8 días en diferentes medios de cultivo; b) Controles utilizados: medios del cultivo sin inóculo, fármacos citotóxicos como controles positivo, DMSO como vehículo de los fármacos y como control negativo las células sin ningún tratamiento. Las líneas punteadas indican el crecimiento de las células sin tratamiento.

La cepa *Embleya* sp. NF3 en medio ISP-2 fue la que presentó una mayor actividad, logrando disminuir notablemente el número de células, seguida de la cepa *Actinoplanes* sp. TFC3 en medio Seino. Las cepas *Actinoplanes* sp. YF4 y *Actinoplanes* sp. TMC5 presentaron una mínima actividad. El medio ISP-2 mostró una mayor proliferación celular, mientras que el

medio NDMV presentó por sí solo una ligera disminución en el número de células del medio. Finalmente, de los controles positivos evaluados se decidió trabajar en adelante con la doxorubicina debido a los datos obtenidos de relación concentración-actividad.

7.6. Cinética de crecimiento de las actinobacterias

Las cinéticas de crecimiento de las cuatro actinobacterias fueron obtenidas (Figura 12), con la finalidad de conocer el comportamiento de los microorganismos. Con respecto a la biomasa se observaron fluctuaciones, lo que ocurre normalmente en cultivos en medio líquido de las actinobacterias, debido a que estas continúan con su ciclo de diferenciación de micelio primario y posteriormente secundario, formando pellets o agregados del microorganismo suspendido en el medio de cultivo, y al momento de tomar las alícuotas, la cantidad y tamaños de los agregados era variable, así como su composición interna. El medio de cultivo utilizado fue el ISP-2 el cual contiene extracto de levadura, extracto de malta y glucosa. Para la cepa NF3 su cinética comienza en una fase lag hasta su crecimiento a partir del tercer día, siendo el día 15 donde comienza la muerte celular. Los valores de pH obtenidos sugieren que la cepa desde el inicio utiliza el extracto de levadura como fuente de nutrientes, lo cual alcaliniza el medio de cultivo hasta el final de la cinética. La cepa TFC3 no presenta una fase lag de crecimiento, sino que su fase exponencial termina hasta el día 12, el seguimiento del pH nos indica que también esta actinobacteria consume primero el extracto de levadura y a partir del día 6 su pH disminuye, probablemente por el consumo de la glucosa, lo que acidifica el medio por la liberación de ácidos orgánicos. La cepa TMC5 por su parte, tiene una fase lag de 2 días y una fase exponencial hasta el día 10, el pH del medio de cultivo disminuye desde un inicio, probablemente debido al consumo de glucosa como primera fuente de nutrientes, a partir del día 5, el pH aumenta por el uso de el extracto de levadura, el cual libera principalmente aminoácidos, los cuales alcalinizan el medio. Finalmente, la cepa YF4 muestra un crecimiento muy lento en comparación con las otras cepas, teniendo una fase lag de 1 día y una exponencial hasta el día 5, seguido inmediatamente de muerte celular o diferenciación de los pellets presentes en el medio. A diferencia de las otras tres actinobacterias, el pH del medio no sube de manera contundente, por lo que probablemente la fuente de nutrientes que esta cepa utiliza es el extracto de malta.

Con los resultados obtenidos de estas cinéticas se decidió para todos los casos, detener la fermentación en el día 8 de cultivo en matraz agitado, donde en todos los casos la fase exponencial terminó o estaba terminando, para evaluar la presencia de metabolitos secundarios activos.

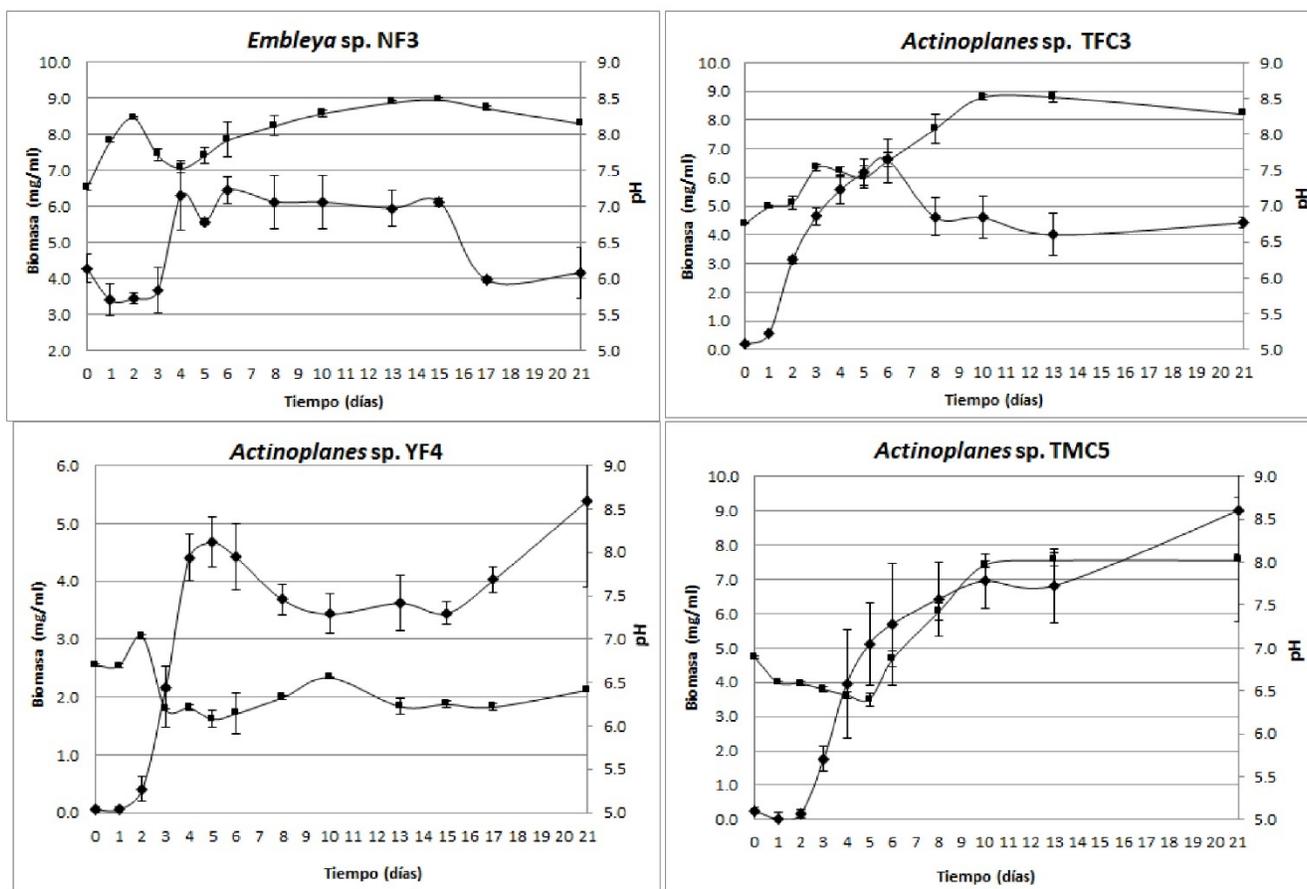


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de las actinobacterias aisladas en medio ISP-2, mostrando resultados de biomasa \blacklozenge y pH \blacksquare .

A partir de los resultados obtenidos del crecimiento y actividad biológica (Cuadro 1 y Figura 11), se decidió obtener los extractos orgánicos de las cuatro cepas crecidas en medio ISP-2.

7.7. Análisis por cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos

Los extractos orgánicos derivados del cultivo de las actinobacterias *Embleya* sp. NF3, *Actinoplanes* sp. YF4, *Actinoplanes* sp. TFC3 y *Actinoplanes* sp. TMC5 en medio ISP-2, así como del medio de cultivo sin inocular, fueron analizados por CCF para conocer su complejidad metabólica y la presencia de compuestos mayoritarios que posiblemente sean los causantes de la actividad biológica observada a nivel de sobrenadantes. En la Figura 13 se observa la CCF de los extractos, eluída con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (80:20) y observada a λ 365 nm y λ 254 nm.

Con respecto a *Embleya* sp. NF3 se observó la presencia de un compuesto o grupo de compuestos fluorescentes en color amarillo a λ 365 nm, y aparentemente los constituyentes mayoritarios y presentes en los extractos de CH₂Cl₂ y AcOEt, así como otros compuestos. Los tres *Actinoplanes* sp. (YF4, TFC3 y TMC5) mostraron perfiles químicos más complejos.

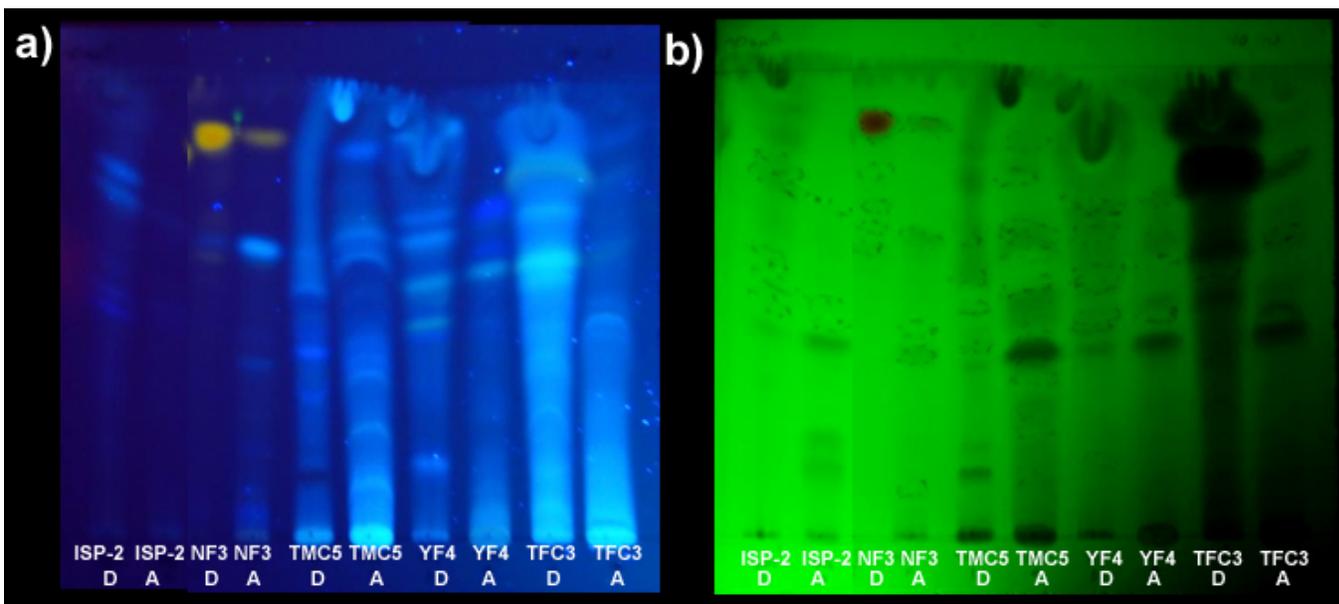


Figura 13. CCF de los extractos orgánicos de diclorometano (D) y acetato de etilo (A) de las actinobacterias aisladas y del medio de cultivo sin microorganismo (ISP-2), eluída con CH₂Cl₂:MeOH (80:20) y observada a a) λ 365 nm y b) λ 254 nm.

7.8 Actividad antibiótica por concentración mínima inhibitoria de los extractos orgánicos de las actinobacterias

La MIC de los extractos orgánicos obtenidos con CH₂Cl₂ y AcOEt de las actinobacterias se muestran en el Cuadro 2. Se observó que *Embleya* sp. NF3 mostró actividad contra las bacterias Gram-positivas, siendo mayor para *M. luteus*, sobre todo con el extracto de CH₂Cl₂. Para la cepa de *Actinoplanes* sp. TFC3, sólo presentó baja actividad contra *B. subtilis* con ambos extractos. *Actinoplanes* sp. YF4 y *Actinoplanes* sp. TMC5 no presentaron actividad a ninguna de las concentraciones probadas.

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria de los extractos orgánicos de las actinobacterias crecidas en medio ISP-2.

	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µg/mL)			
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NF3 CH ₂ Cl ₂	0.1 o menos	>800	6.3	>800
NF3 AcOEt	6.3	>800	200	>800
YF4 CH ₂ Cl ₂	>200	>800	>200	>800
YF4 AcOEt	>200	>800	>200	>800
TFC3 CH ₂ Cl ₂	>200	>800	200	>800
TFC3 AcOEt	>200	>800	200	>800
TMC5 CH ₂ Cl ₂	>200	>800	>200	>800
TMC5 AcOEt	>200	>800	>200	>800
Control	0.1 o menos	0.87 o menos	0.1 o menos	0.87 o menos
positivo	Estreptomicina	Estreptomicina	Ácido Nalidíxico	Cicloheximida

7.9. Evaluación citotóxica de extractos orgánicos de las actinobacterias endófitas

Los mismos extractos orgánicos fueron evaluados para determinar su actividad citotóxica. En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos.

De igual forma que en la actividad antibiótica, los extractos orgánicos de la cepa *Embleya* sp. NF3 resultaron ser los más activos para las tres líneas celulares probadas, con valores de CI₅₀ prometedores, siendo los valores de la línea celular no cancerosa (HaCaT) mayores que para las líneas cancerosas. La cepa *Actinoplanes* sp. TFC3 también presentó actividad en su extracto con CH₂Cl₂ a la más alta concentración probada, sin embargo, el valor de CI₅₀ es mayor a 100 µg/mL, lo que hace a este extracto poco atractivo para posteriores estudios.

Al obtener una mayor actividad biológica en ambos extractos de *Embleya* sp. NF3 (CH₂Cl₂ y AcOEt) se seleccionó esta cepa para seguir siendo evaluada en la búsqueda de compuestos bioactivos.

Cuadro 3. Efecto citotóxico de los extractos orgánicos de las actinobacterias crecidas en medio ISP-2.

EXTRACTOS	% Mortalidad (a 100 µg/mL)			CI ₅₀ (µg/mL)		
	MCF-7	HeLa	HaCaT	MCF-7	HeLa	HaCaT
NF3 CH ₂ Cl ₂	80	78	80	0.29	0.51	0.96
NF3 AcOEt	80	78	80	0.96	1.98	2.7
YF4 CH ₂ Cl ₂	0	0	0	>100	>100	>100
YF4 AcOEt	0	0	0	>100	>100	>100
TFC3 CH ₂ Cl ₂	6.3	9.2	0	>100	>100	>100
TFC3 AcOEt	0	0	0	>100	>100	>100
TMC5 CH ₂ Cl ₂	0	0	0	>100	>100	>100
TMC5 AcOEt	0	0	0	>100	>100	>100
Doxorrubicina	65.2	80	80	0.72	2.4	2.5

Los extractos orgánicos fueron diluidos en DMSO y la actividad del diluyente fue sustraída del resultado final.

7.10. Bioprospección del extracto de *Embleya* sp. NF3

7.10.1. Evaluación preliminar de la actividad citotóxica de los compuestos mayoritarios

En primer lugar, para llevar a cabo la determinación cualitativa de la actividad citotóxica, se realizó una CCFP de los extractos obtenidos con CH₂Cl₂ y AcOEt. En la Figura 14 se observa el resultado obtenido. En los recuadros se marcan diferentes zonas donde se observó la presencia de diversos compuestos químicos. Estas zonas fueron recuperadas de manera habitual de la cromatoplaca y se evaluó cualitativamente su actividad biológica, utilizando el método de citotoxicidad con células MCF-7, HeLa y HaCaT. Al no poder cuantificar el o los compuestos evaluados, sólo se registraron los cambios de coloración obtenidos por el cambio de la sal de formazán del kit de citotoxicidad, esto con la finalidad de saber si sólo un compuesto era el responsable de la actividad biológica o si eran varios de ellos.

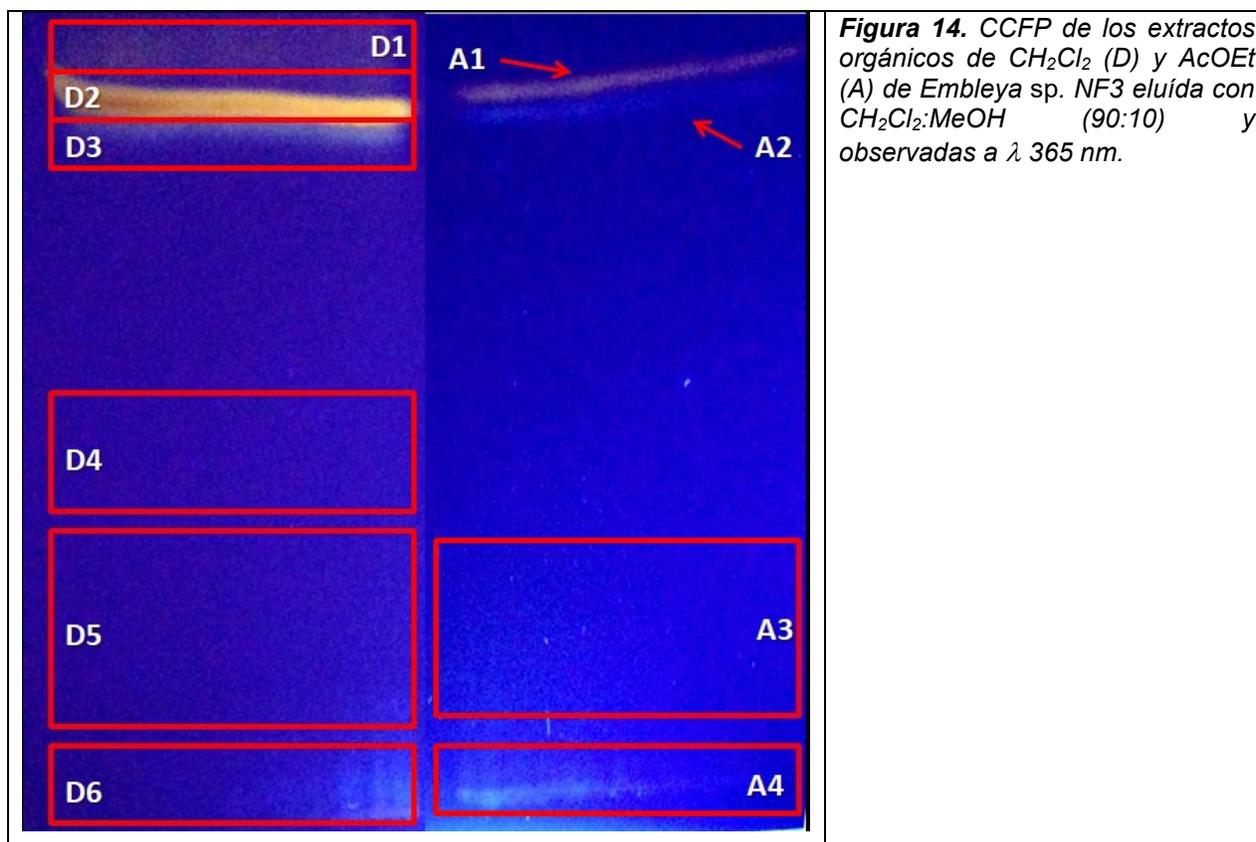


Figura 14. CCFP de los extractos orgánicos de CH_2Cl_2 (D) y AcOEt (A) de *Embleya* sp. NF3 eluída con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (90:10) y observadas a λ 365 nm.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que la más alta actividad citotóxica contra las líneas celulares evaluadas se localiza en la zona de los compuestos más polares de ambos extractos. Los compuestos obtenidos con CH_2Cl_2 en las áreas D4 y D5 no mostraron actividad; sin embargo, los compuestos menos polares tuvieron actividad baja. Con respecto a los compuestos del extracto obtenido con AcOEt, todos presentaron actividad, siendo de nueva cuenta los más polares los más activos (A1 y A2) y los menos polares menos activos e interesantemente sin actividad en la línea celular no cancerosa.

Cuadro 4. Ensayo preliminar para evaluar cualitativamente la citotoxicidad de diferentes fracciones de los extractos orgánicos de la cepa *Embleya* sp. NF3.

LÍNEA CELULAR	D1	D2	D3	D4	D5	D6	A1	A2	A3	A4	DMSO	Control +	Células
MCF-7	++	++	+	-	-	+	++	++	+	+	-	++	-
HeLa	+	++	-	-	-	+	++	++	+	+	-	++	-
HaCaT	++	++	+	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-

(++) muy activo con color rosa pálido, (+) poco activo con color naranja pálido, (-) sin actividad con color naranja intenso. Cómo control positivo se utilizó doxorubicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Estos resultados pusieron en evidencia que *Embleya* sp. NF3 produce metabolitos secundarios polares y no polares con actividad citotóxica.

7.10.2. Evaluación del método de extracción en la fermentación a gran escala

A continuación, se determinó el mejor disolvente de extracción tanto de la biomasa (B) como del sobrenadante (S). En la Figura 15 se observa la TLC de los extractos de B, S y la unión de ambos (C) obtenidos con CH_2Cl_2 (D), con AcOEt (A), así como el S extraído primero con CH_2Cl_2 y posteriormente con AcOEt. En esta determinación se observó que el compuesto o grupo de compuestos fluorescentes en color amarillo a λ 365 nm y que posiblemente corresponden a los mayoritarios, son los menos polares del extracto y que se obtienen con los dos disolventes de extracción empleados. Por otra parte, se realizó una determinación de la actividad citotóxica cualitativa todos los extractos y se encontró actividad en S, B y C independientemente del disolvente utilizado para su obtención. Con base en estos resultados, se decidió realizar la obtención de los extractos orgánicos de las fermentaciones de posteriores de *Embleya* sp. NF3 con AcOEt, obteniendo los extractos de la B y el S por separado, para facilitar su manejo, sin embargo, al tener perfiles químicos semejantes se reunieron.

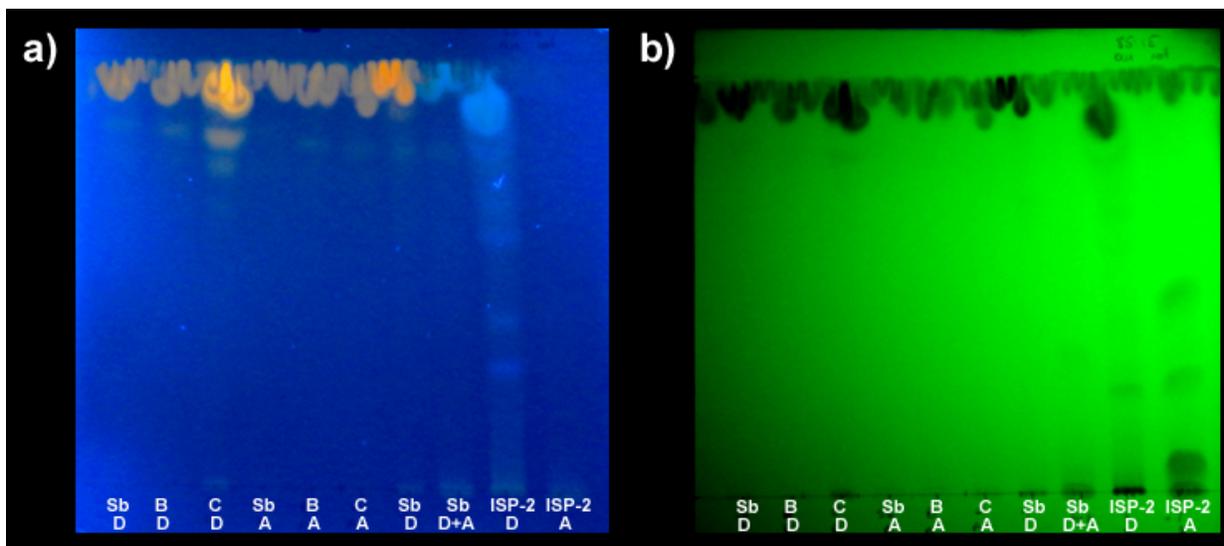


Figura 15. CCF eluida con 85:15 CH_2Cl_2 :MeOH de los extractos obtenidos a partir de la biomasa (B), sobrenadante (S) y la mezcla de ambos (C) utilizando solo diclorometano (D), sólo acetato de etilo (A), S primero con D y posteriormente con A (D+A) y el control del medio utilizado ISP-2 observados a) λ 365 nm y b) λ 254nm.

7.10.3. Fermentación y evaluación del extracto orgánico

La fermentación de *Embleya* sp. NF3 a mayor escala, se realizó en un biorreactor conteniendo 10 L de medio ISP-2. En la Figura 16 se muestra la cinética de crecimiento obtenida a partir de esta fermentación, la cual fue detenida al día 8, con base en su perfil químico monitoreado por CCF mostrándose en la Figura 17 a, b y c, donde se emplearon diferentes sistemas de elución, observándose que los compuestos de menor polaridad y de color amarillo en λ 365 nm y así como los compuestos rojizos en la zona polar de la cromatoplaaca (Figura 17c), corresponden a los constituyentes mayoritarios del extracto. Se obtuvo 1 g de extracto orgánico total de color café rojizo soluble en AcEtO.

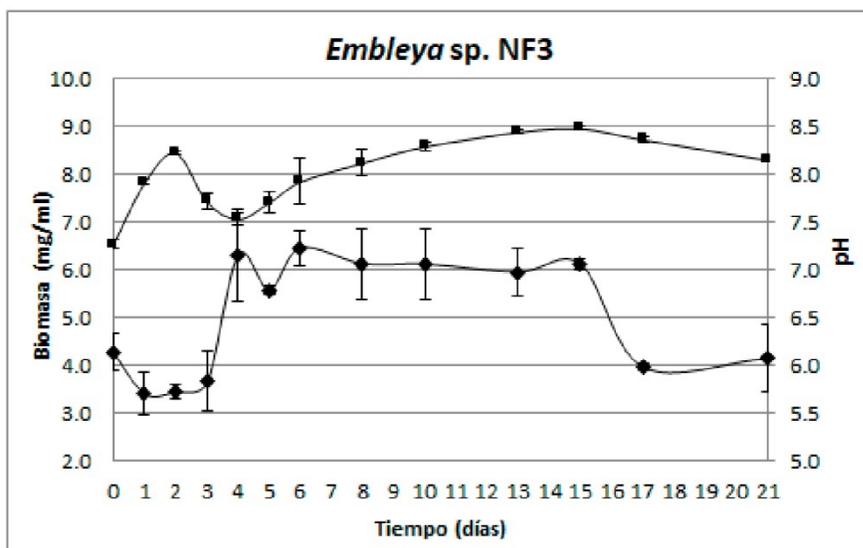


Figura 16. Cinética de crecimiento de la fermentación en biorreactor de la cepa *Embleya* sp. NF3 en medio ISP-2, mostrando resultados de biomasa \blacklozenge y pH \blacksquare .

El extracto orgánico obtenido se evaluó en las líneas celulares MCF-7, HeLa y HaCaT (Cuadro 5) encontrando alta actividad citotóxica al compararla con el control positivo doxorubicina.

Cuadro 5. Efecto citotóxico del extracto orgánico obtenido de la fermentación en biorreactor de *Embleya* sp. NF3.

EXTRACTOS	CI ₅₀ (µg/mL)		
	MC-F7	HeLa	HaCaT
<i>Embleya</i> sp. NF3 AcOEt	0.96	1.98	2.7
Doxorrubicina	0.72	2.4	2.5

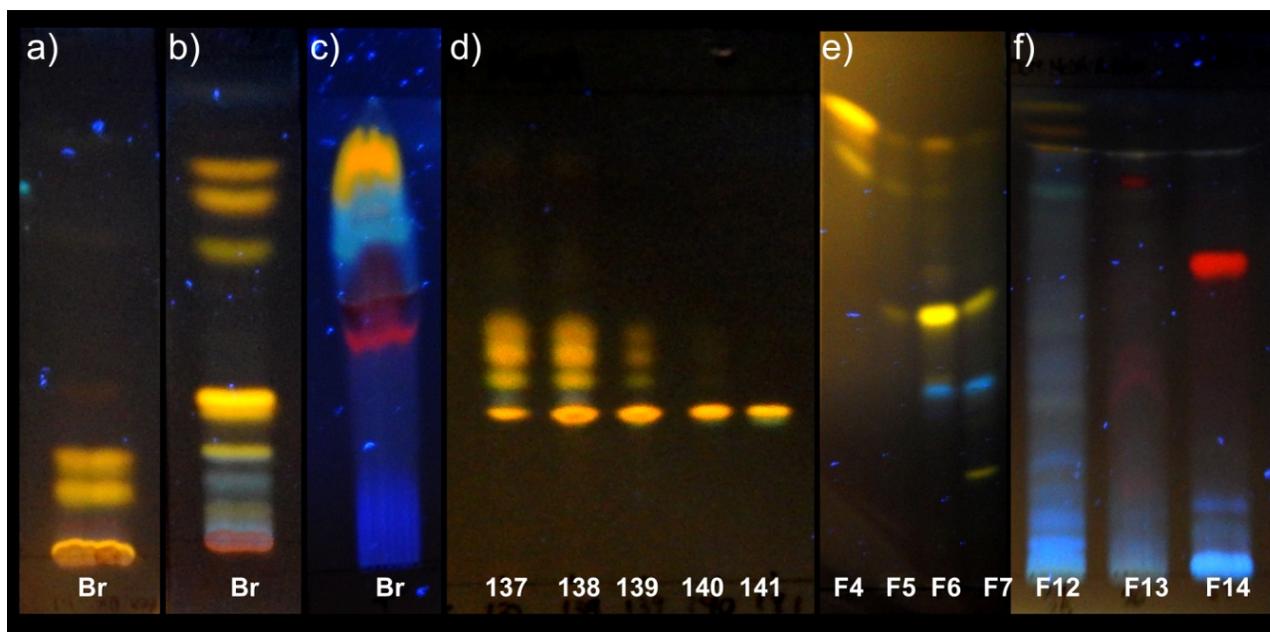


Figura 17. Perfil químico mediante CCF del extracto orgánico total (Br) de la fermentación de *Embleya* sp. NF3 empleando distintas fases móviles: a) Hex:CH₂Cl₂ (1:1); b) CH₂Cl₂:MeOH (98:2); c) CH₂Cl₂:MeOH (1:1); d) Monitoreo de las fracciones obtenidas del fraccionamiento en cromatografía en columna abierta; e) Grupos de fracciones primarias 4, 5, 6 y 7 en CH₂Cl₂:MeOH (96:4); f) Grupos de fracciones primarias 12, 13 y 14 en CH₂Cl₂:MeOH:Ac Acético (85:5:10). Placas observadas a λ 365 nm.

7.10.4. Fraccionamiento químico biodirigido

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo total de *Embleya* sp. NF3, permitió la obtención de 14 fracciones primarias reunidas de acuerdo con su perfil químico. En el Cuadro 6 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas. A manera de ejemplo en las Figuras 17 d-f, se presenta el monitoreo por CCF de las fracciones primarias 137-141 y los grupos de fracciones 4-7 (Figuras 17e) y 12-14 (Figuras 17f).

Las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna abierta fueron evaluadas en las líneas celulares de prueba, encontrando que actividad citotóxica en 9 de 14 fracciones (Cuadro 7).

Cuadro 6. Fraccionamiento primario del extracto orgánico de la fermentación en biorreactor de *Embleya* sp. NF3.

Fracción primaria	Fracciones de la columna	Sistema de elución	Proporción	Peso (mg)
1	1-19	Hex	100	16
2	20-106	Hex-CH ₂ Cl ₂	9:1	58.5
		Hex-CH ₂ Cl ₂	8:2	
		Hex-CH ₂ Cl ₂	7:3	
		Hex-CH ₂ Cl ₂	6:4	
		Hex-CH ₂ Cl ₂	5:5	
		Hex-CH ₂ Cl ₂	4:6	
		Hex-CH ₂ Cl ₂	3:7	
		Hex-CH ₂ Cl ₂	2:8	
3	107-135	CH ₂ Cl ₂	100	25.1
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	
4	136-142	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	97:3	197.6
5	143-149	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	96:4	20.7
6	150-151	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	96:4	148.7
7	152-163	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	132.1
8	164-176	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	116.7
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	94:6	
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	93:7	
9	177-192	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	93:7	59
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	
10	193-203	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	46.9
11	204-214	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	7:3	55.6
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	
12	215-230	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	109.1
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	5:5	
13	231-255	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	5:5	19.8
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	4:6	
		CH ₂ Cl ₂ -MeOH	2:8	
14	256	MeOH	100	60.7

Cuadro 7. Efecto citotóxico de las fracciones primarias del extracto orgánico de *Embleya* sp. NF3.

FRACCIONES	% Mortalidad (at 100 µg/mL)		
	MCF-7	HeLa	HaCaT
F1	0	8.9 ± 1.7	45.7 ± 0.9
F2	0	0.7 ± 1.0	34.8 ± 1.3
F3	0	7.1 ± 2.0	35.1 ± 2.8
F4	69.4 ± 0.2	66.9 ± 1.2	44.5 ± 0.9
F5	80.8 ± 0.4	78.3 ± 0.6	61.4 ± 0.4
F6	77.5 ± 1.3	78.8 ± 0.1	61.6 ± 0.2
F7	79.1 ± 0.6	78.7 ± 0.5	60.0 ± 0.5
F8	79.1 ± 0.8	79.0 ± 0.5	60.9 ± 0.6
F9	80.0 ± 0.2	100.0 ± 0.3	61.3 ± 0.7
F10	0	32.9 ± 4.9	3.5 ± 1.0
F11	0	9.1 ± 1.3	0
F12	97.6 ± 0.3	94.2 ± 2.2	58.6 ± 0.3
F13	97.0 ± 0.4	98.3 ± 0.1	58.3 ± 0.4
F14	89.4 ± 1.1	69.9 ± 2.3	55.3 ± 0.3
Doxorrubicina	65.2 ± 2.0	80 ± 1.9	80 ± 3.0

Las fracciones 1 a 8 fueron diluidas en DMSO, y la actividad generada por el DMSO fue restada del resultado final. De las fracciones 9 a 14, estas fueron diluidas en agua.

Con base en la actividad biológica demostrada por las fracciones primarias sobre las líneas celulares cancerosas y su menor actividad con la línea de queratinocitos, así como su complejidad metabólica y la cantidad obtenida para cada una de ellas, se seleccionaron las fracciones primarias 4-7 (Figura 17e) para aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica observada y que corresponden en su mayoría a los compuestos fluorescentes en amarillo a λ 365 nm. La fracción 14 (Figura 17f) también fue elegida para la separación del compuesto o grupo de compuestos mayoritarios fluorescentes en color rojo a λ 365 nm. Sin embargo, no fue posible la purificación en cantidad apropiada para su caracterización y evaluación biológica de algún compuesto de esta fracción.

7.10.4.1. Análisis de la fracción primaria activa 4 por CLAR/UV/ESI-MS

Debido a que la fracción 4 contenía diferentes compuestos con polaridad y color similares al mayoritario y posibles candidatos a ser bioactivos se analizó esta fracción empleando CLAR/UV/ESI-MS para conocer algunas propiedades de sus estructuras químicas. En la Figura 18 se presenta el perfil cromatográfico de esta fracción 4, en donde se observa la

presencia de 10 picos, siendo el pico 8 el compuesto mayoritario. Por otra parte, en el Cuadro 8 se resumen los resultados de este análisis

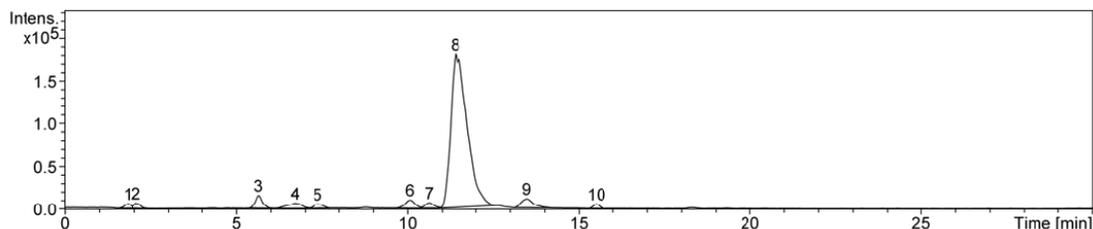


Figura 18. Perfil cromatográfico por CLAR de la fracción primaria activa 4.

Cuadro 8. Análisis CLAR-UV-MS-ESI de la fracción primaria activa 4.

CLAR-MS-ESI						CLAR-UV-Vis					
# de pico	T _{retención} (min)	Área	% Área	m/z	Intensidad	# de pico	T _{retención} (min)	Área	% Área	Lectura PDA λ (nm)	λ _{max}
1	1.8	67924	0.9	563.7	408	1	1.96	64930	6.98	254	nd
						2	2.403	3061	0.33	254	nd
2	2.1	77644	1.1	556.5	344	3	2.591	9448	1.02	254	nd
				738.3	368						
				813.9	287						
3	5.6	215396	2.9	243.3	929						
4	6.7	175687	2.4	294.6	397						
5	7.4	93409	1.3	310.8	365						
6 (1)	10.1	191653	2.6	574.5	552	4	9.931	49035	5.27	254	226.1 265.1
7 (2)	10.6	111003	1.5	558.8	403	5	10.357	41627	4.47	254	212 227.3 254.4 443
8 (3)	11.4	6125958	83	588.2	16666	6	11.291	747346	80.33	254	213.2 235.5 443
9	13.5	258491	3.5	604	701	7	13.296	14952	1.61	254	nd
10	15.5	64077	0.9	572.4	456						

7.10.4.2. Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en las fracciones primarias activas

El fraccionamiento químico de las fracciones primarias activas 4, 6 y 7 utilizando diversos procedimientos cromatográficos (CC y CCFP), permitió el aislamiento y purificación de seis antraciclina; la estefimicina C (1), la 8-demetoxi-estefimicina B (2), la estefimicina B (3), la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4), la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona (5), la 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona (6). También se logró la elucidación química de la 7-

deoxiestefimicinona (**7a**) y 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona (**7b**). En el Cuadro 9 se muestran las estructuras de las estefimicinas y estefimicinonas aisladas, las fracciones de las cuales fueron purificadas y su rendimiento.

En la Figura 19 se muestra un ejemplo de las CCFP llevadas a cabo para el aislamiento y purificación los compuestos mayoritarios producidos por *Embleya* sp. NF3 y presentes en la fracción activa 4. En la Figura 19a se observan cuatro bandas de compuestos o grupos de compuestos fluorescentes en color amarillo a λ 365 nm y en Figura 19b se distinguen 11 posibles compuestos, observando la cromatoplaaca a λ 254 nm. La CCF de la banda indicada como B2-B3 demostró que estaba constituida por una mezcla de compuestos, los cuales fueron separados por sucesivas CCFP obteniéndose los compuestos **1**, **2** y **3** (Figura 19c). Las bandas señaladas como B7, B8 y B9 también se purificaron mediante sucesivas CCFP, B7 y B9 corresponden a los compuestos **5** y **6**, y cabe mencionar que la banda identificada como B8, corresponde también a una mezcla de dos antraciclinas y otro compuesto, de los cuales no fue posible obtener en forma pura y en cantidades apropiadas para estudios subsecuentes, sin embargo, fueron caracterizadas en mezcla dos de ellos y corresponden a los compuestos **7a** y **7b**.

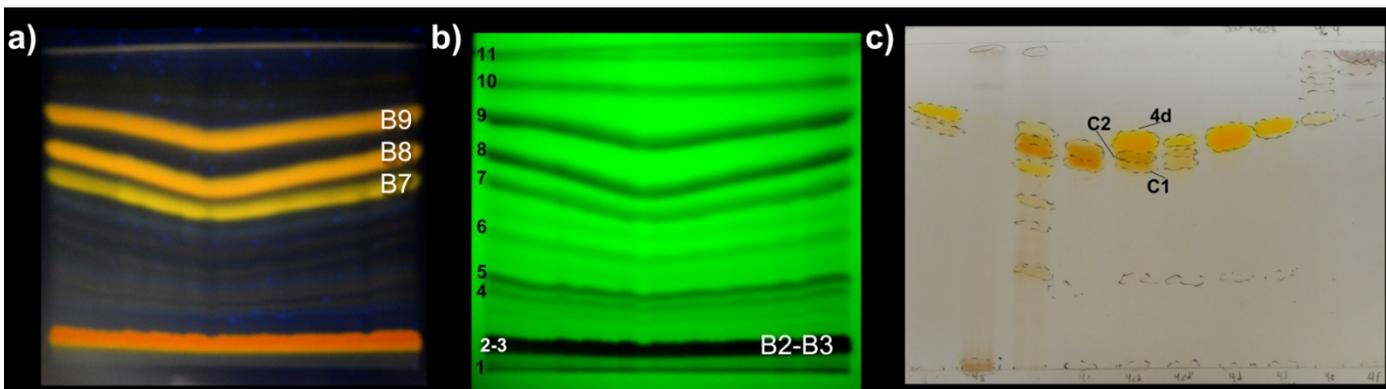
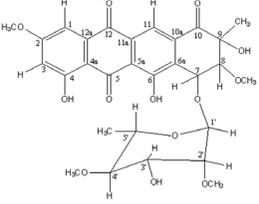
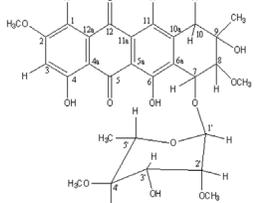
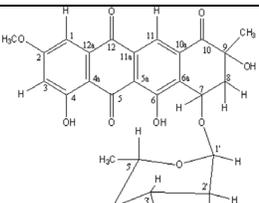
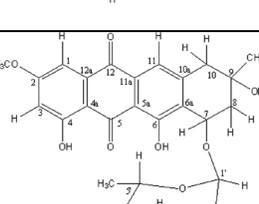
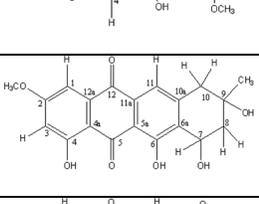
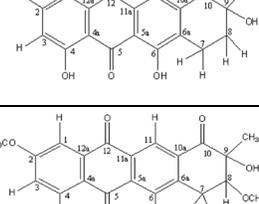
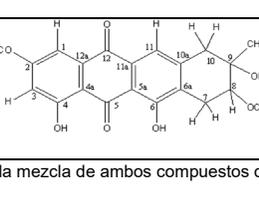


Figura 19. Placas de CCF del aislamiento de compuestos de la fracción primaria 4. a) CCF preparativa $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 99:1 observada a 365 nm, b) observada a 254 nm y c) CCF de la banda 2-3 eluida a $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 96:4 revelada con H_2SO_4 .

Cuadro 9. Metabolitos secundarios aislados a partir de la actinobacteria endófitra *Embleya* sp. NF3.

Metabolito secundario	Estructura química	Fracción	Banda	Rendimiento (µg/L)
Estefimicina B (1)		4	4d	1,800
Estefimicina C (2)		4	C1	220
8-Demetoxi-estefimicina B (3)		4	C2	150
8-Demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4)		6 y 7	7f	1180
8-Demetoxi-10-deoxiestefimicinona (5)		4	B7	900
7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona (6)		4	B9	800
7-Deoxiestefimicinona (7a)		4	B8	1000*
7-Deoxi-10-deoxiestefimicinona (7b)		4	B8	1000*

*El rendimiento de la banda 8 se reporta como la mezcla de ambos compuestos debido a que no se pudieron separar.

Por último, en la Figura 20 se muestra la CCFP de la unión de las fracciones primarias 6 y 7 (Figura 17e), donde se observó otro compuesto amarillo a λ 365 nm y que corresponde al compuesto 4.

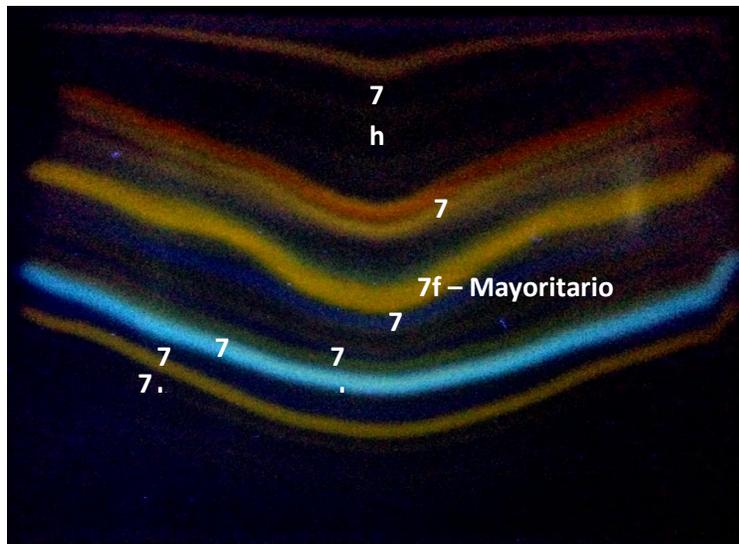


Figura 20. Cromatografía en capa fina de la unión de las fracciones 6 y 7, eluída con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (96:4) observada a λ 365 nm

7.11. Caracterización química de los compuestos aislados

Todos los metabolitos secundarios se aislaron como sólidos cristalinos de color amarillo, solubles en CH_2Cl_2 y/o DMSO. Su elucidación estructural se llevó a cabo utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros en el IR de los compuestos **1-7a** y **7b** presentan bandas de absorción asociadas a grupos hidroxilo ($-\text{OH}$ $\nu_{\text{max}} \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$), grupos metoxilo ($\text{R}-\text{OCH}_3$ $\nu_{\text{max}} \sim 2926 \text{ cm}^{-1}$), carbonilos de cetona ($\text{R}-\text{CO}-\text{R}'$ $\nu_{\text{max}} \sim 1728 \text{ cm}^{-1}$), enlaces $\text{C}=\text{C}$ conjugados ($\nu_{\text{max}} \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) y enlaces característicos de fenoles ($\nu_{\text{max}} \sim 1262 \text{ cm}^{-1}$). La fórmula molecular se determinó por espectrometría de masas de alta resolución (TOF-MS). En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos de cada compuesto en cuanto a las señales espectroscópicas, los iones moleculares en una relación masa carga (m/z), la fórmula molecular de cada compuesto. Se muestran también los resultados previamente reportados para la estefimicina (Bergy y Reusser, 1967) como referencia, mostrando señales muy similares a los compuestos aquí analizados.

Cuadro 10. Constantes espectroscópicas de UV-Vis, IR y espectrométricas TOF-MS de los compuestos aislados.

Metabolito Secundario	UV (Acetona) λ_{\max} (nm)	IR ν_{\max} (cm ⁻¹)	TOF-EM (m/z) Fórmula molecular
Estefimicina B (1)	213, 232, 439	3399.79 (-OH), 2930.16 (R-OCH ₃), 1726.69 (R-COR'), 1625.54 y 1676.14 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1602.3 (C=C conjugado), 1260.39 (C-OH fenol)	588.17 C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃
Estefimicina C (2)	224, 258, 435	3435.75 (-OH), 2928.67 (R-OCH ₃), 1727.94 (R-COR'), 1621 y 1677 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1606.51 (C=C conjugado), 1262.85 (C-OH fenol)	574.19 C ₂₉ H ₃₄ O ₁₂
8-Demetoxi-estefimicina B (3)	212, 227, 439	3428.28 (-OH), 2928.51 (R-OCH ₃), 1729.06 (R-COR'), 1632 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1601.17 (C=C conjugado), 1261.73 (C-OH fenol)	558.16 C ₂₈ H ₃₀ O ₁₂
8-Demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4)	205, 224, 264, 436	3432.16 (-OH), 2928.14 (R-OCH ₃), 1728.65 (R-COR'), 1622.16 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1601.78 (C=C conjugado), 1262.63 (C-OH fenol)	544.18 C ₂₈ H ₃₂ O ₁₁
8-Demetoxi-10-deoxiestefimicinona (5)	206, 220, 273, 439	3510.28 (-OH), 2927.02 (R-OCH ₃), 1728.51 (R-COR'), 1618.24 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1601.13 (C=C conjugado), 1263.29 (C-OH fenol)	354.1 C ₂₀ H ₁₈ O ₇
7-Deoxi-8-demetoxiestefimicinona (6)	214, 225, 283, 437	3488.82 (-OH), 2923.37 (R-OCH ₃), 1737.24 (R-COR'), 1676.84 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1602.72 (C=C conjugado), 1259.55 (C-OH fenol)	368.08 C ₂₀ H ₁₆ O ₇
7-Deoxiestefimicinona (7a)	226, 436	3494.85 (-OH), 2926.45 (R-OCH ₃), 1727.81 (R-COR'), 1620.49 y 1674.59 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1603.56 (C=C conjugado), 1261.81 (C-OH fenol)	398.09 C ₂₁ H ₁₈ O ₉
7-Deoxi-10-deoxiestefimicinona (7b)			384.03 C ₂₁ H ₂₀ O ₇
Estefimicina (Bergy y Reusser, 1967)	214, 236, 439 en metanol	3470 (-OH), 2940 (R-OCH ₃), 1710 (R-COR'), 1620 y 1672 (1,8-dihidroxi-antraquinona), 1605 (C=C conjugado), 1260 (C-OH fenol)	574 C ₂₈ H ₃₀ O ₁₃

Los espectros de RMN unidimensionales (¹H y ¹³C) y bidimensionales (HSQC y HMBC) permitieron asignar la estructura de los compuestos **1-6**, **7a** y **7b** y establecer que presentan un núcleo de antraciclina, específicamente de estefimicinas y estefimicinonas. A continuación, se detallan las características de los espectros:

7.11. 1. Esfefimicina B (1)

El compuesto mayoritario encontrado en la fracción primaria 4 de la columna abierta, fue identificado completamente como StefB.

El espectro de RMN-¹³C del compuesto 3 muestra señales para 29 átomos de carbono (C₂₉H₃₂O₁₃). A campo alto se aprecian dos señales en δ_c 17.9 y 22.9 que corresponden a dos carbonos de metilo (CH₃-5' y CH₃-9), la señales en δ_c 56.2, 58.8, 59.9 y 60.9 corresponden a metoxilos (CH₃O-2, CH₃O-4', CH₃O-8 y CH₃O-2'). En δ_c 69.0, 71.2, 71.9, 76.6, 80.4, 83.3, 85.6 y 100.6, se muestran ocho señales para carbonos alifáticos base de oxígeno (C-5', C-7, C-3', C-9, C-2', C-4,' C-8 y C-1), siendo la señal en δ_c 100.6 característica de un carbón anomérico. En la zona de los carbonos aromáticos en δ_c de 106.7, 109.2 y 117.5 se aprecian tres señales para metinos (C-3, C-1 y C-11) y en δ_c 110.4, 118.7, 133.5, 133.5, 135.0, 135.5 mostró seis señales para carbonos cuaternarios (C-4a, C-5a, C-12a, C-6a, C-11a y C-10a). Los carbonos aromáticos base de oxígeno se observaron en δ_c 162.1, 165.8 y 167.5 (C-6, C-4 y C-2). Finalmente, a campo bajo se observaron tres señales en δ_c 180.4, 190.6 y 198.9 que corresponde a carbonilo de cetona (C-12, C-5 y C-10) (Figura 21).

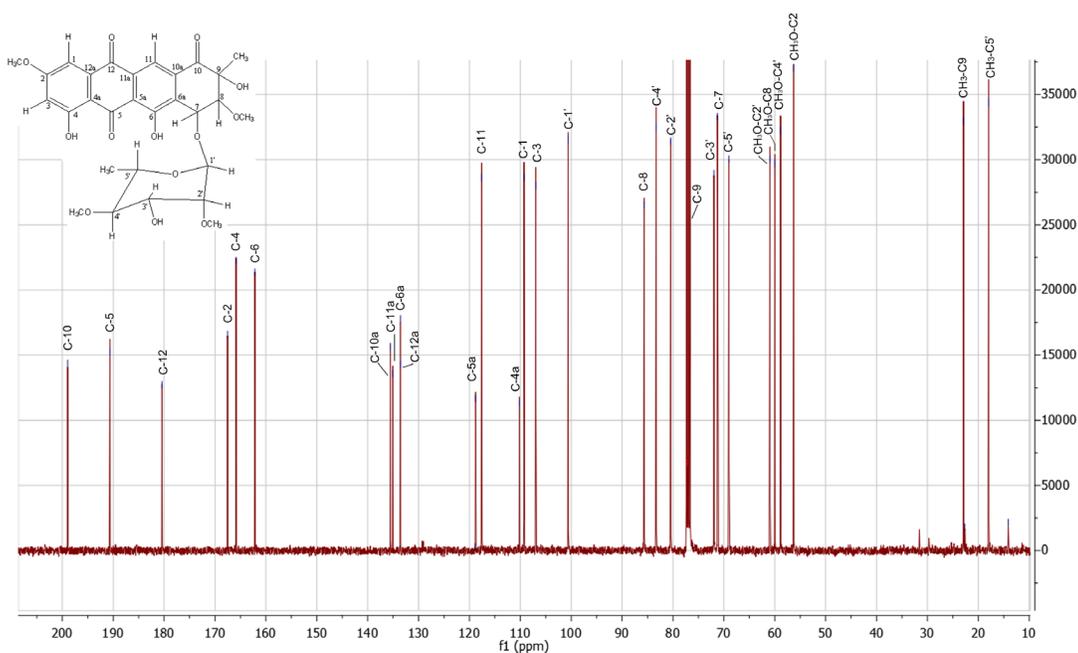


Figura 21. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) de la estefimicina B (1).

El espectro de RMN-¹H (Figura 22) muestra a campo alto dos señales simples que integran para tres hidrógenos de metilo en δ_H 1.3 (CH₃-5') y 1.4 (CH₃-9). También se aprecia dos señales para protones de hidroxilo unidos a carbón alifático en δ_H 2.3 (OH-3') y 3.5 (OH-9). En δ_H 3.0 (H-4'), 3.4 (H-2'), 3.6 (H-3') y 3.7 (H-5') se observa cuatro señales pertenecientes a los hidrógenos de una ramnosa. Por último, a campo alto se observan cuatro señales simples que integran cada una para tres hidrógenos en δ_H 3.4 (CH₃O-8), 3.5(CH₃O-2'), 3.5 (CH₃O-4') y 3.8 (CH₃O-2) y que corresponden a grupos metoxilos y tres señales simple en δ_H 3.6 (C-8), 5.1 (H-7), y 5.5 (H-1') asignable a hidrógenos de metino unidos a carbonos alifático base de oxígenos; la última señal corresponde al hidrógeno anomérico de la porción sacárida. En la región de los hidrógenos aromáticos se observan tres señales simples que integran para un hidrógeno en δ_H 6.6(H-3), 7.3 (H-1) y 8.2 (H-11). Finalmente, en campo bajo se observan dos señales simples pertenecientes a grupos hidroxilos en δ_H 12.0 (OH-6) y 12.91 (OH-4). La estructura del compuesto 3 se confirmó a través de las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC) (Figura 23 y Cuadro 14).

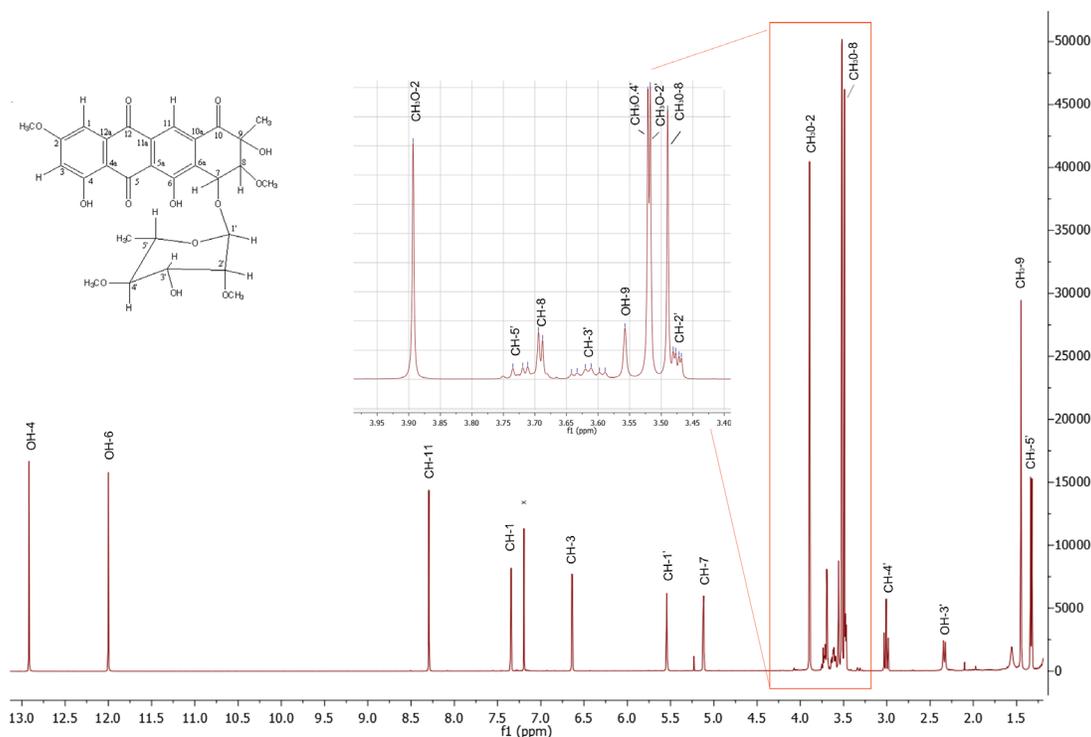


Figura 22. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) de la estefimicina B (1).

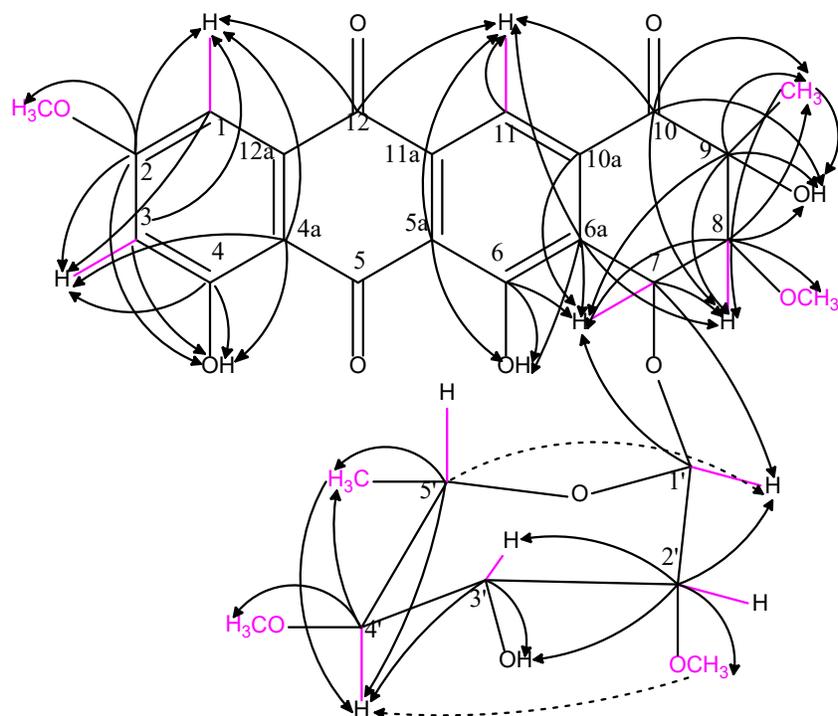


Figura 23. Estructura química de la estefimicina B (**1**) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

Finalmente, para corroborar la identidad de la StefB se realizó la espectrometría de masas (TOF-MS) del compuesto purificado en este trabajo (**1**) con respecto al estándar comercial. Los resultados se muestran en la Figura 24, donde se observó el mismo patrón de fragmentación entre ambas muestras.

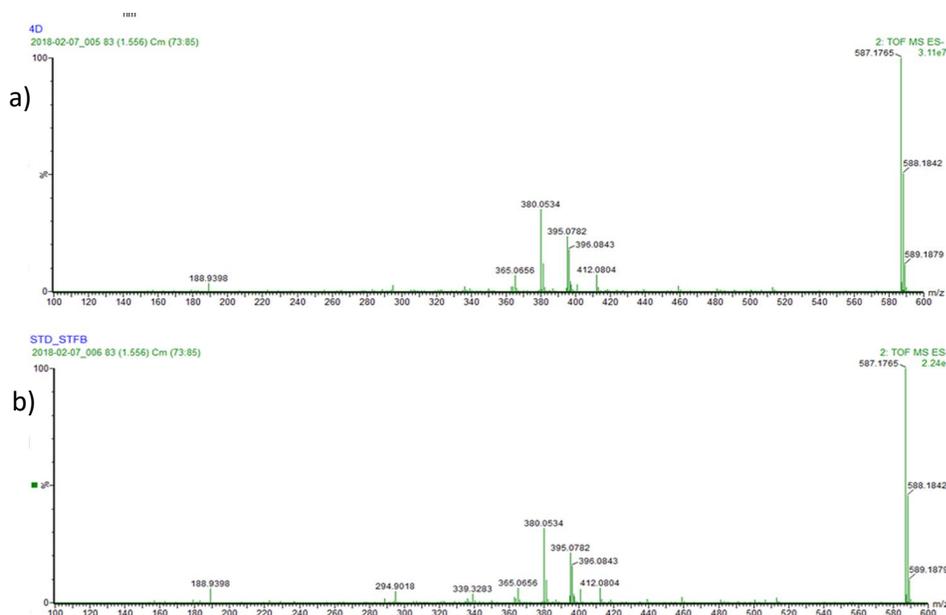


Figura 24. Estudio comparativo TOF-MS entre a) el compuesto **1** purificado en este trabajo y b) el estándar comercial de la estefimicina B.

Para realizar la elucidación química de los otros compuestos aislados, se detectaron problemas de solubilidad con cloroformo deuterado, así que se evaluó el uso de otros disolventes utilizados comúnmente en la RMN en búsqueda de un disolvente que pudiéramos utilizar para todos los compuestos y poder relacionar mejor los espectros encontrados. Se evaluó que la acetona, el diclorometano, el cloroformo y el DMSO.

En el Cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, el único disolvente que logró solubilizar al 100% todos los compuestos fue el DMSO, por lo que se repitió el espectro de StefB (1) ahora en DMSO-d₆ y se analizaron los demás compuestos con este disolvente.

Cuadro 11. Solubilidad de compuestos purificados en diversos solventes.

COMPUESTO	Acetona	Diclorometano	Cloroformo	DMSO
C1	✓	✓	✓	✓
C2	x	x	x	✓
4D	✓	✓	✓	✓
B7	x	x	x	✓
B8	✓	✓	✓	✓
B9	x	✓	x	✓

En los Cuadros 12 y 13 se observan mínimas diferencias entre los espectros de la StefB (1) en CDCl₃ y el DMSO-d₆, principalmente en los dos grupos hidroxilos pertenecientes a la estructura de la antraquinona, en los cuales no se observa relación con ningún átomo en los análisis heteronucleares y, esto sucede para el caso de todos los compuestos analizados.

7.11. 2. Esfefimicina C (2)

El espectro de la RMN-¹³C (Figura 25) del compuesto **2** muestra señales para 29 átomos de carbono (C₂₉H₃₃O₁₂), dónde la única diferencia con respecto al espectro de RMN-¹³C de la StefB (**1**) es la ausencia de la señal δ_c 198.9 asignada al carbonilo C-10, en su lugar se aprecia la presencia de una señal a campo alto en δ_c 40.18, señal muy evidente en el análisis HMBC y que se pierde en el pico de disolvente en el espectro de RMN-¹³C y que corresponde a un carbono de metileno.

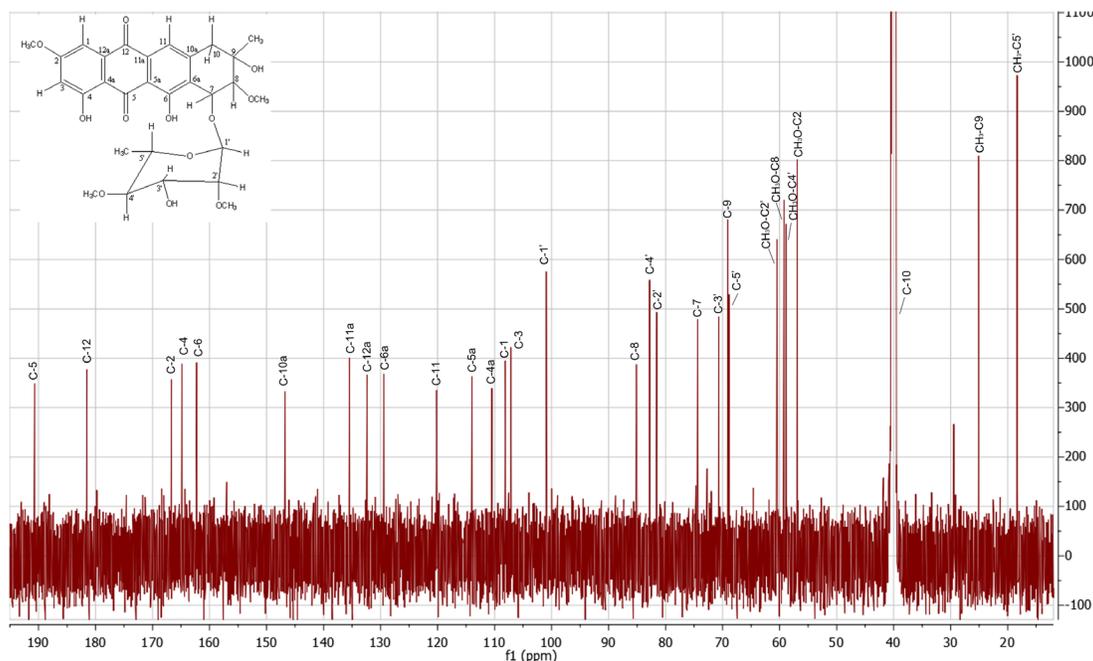


Figura 25. Espectro de RMN-¹³C (175 MHz, DMSO-d₆) de la estefimicina C (**2**).

En el espectro RMN-¹H (Figura 26) del compuesto **2** se observa la presencia adicional de dos protones, uno en δ_H 2.7 que integra para un hidrógeno y otro en δ_H 3.0 que también integra para un hidrógeno y que corresponden al metileno evidenciado en el espectro de RMN-¹³C (CH₂-C10). La estructura del compuesto **2** se confirmó a través de las correlaciones observadas en los espectros de correlación heteronuclear HSQC y HMBC (Figura 27 y Tabla 14).

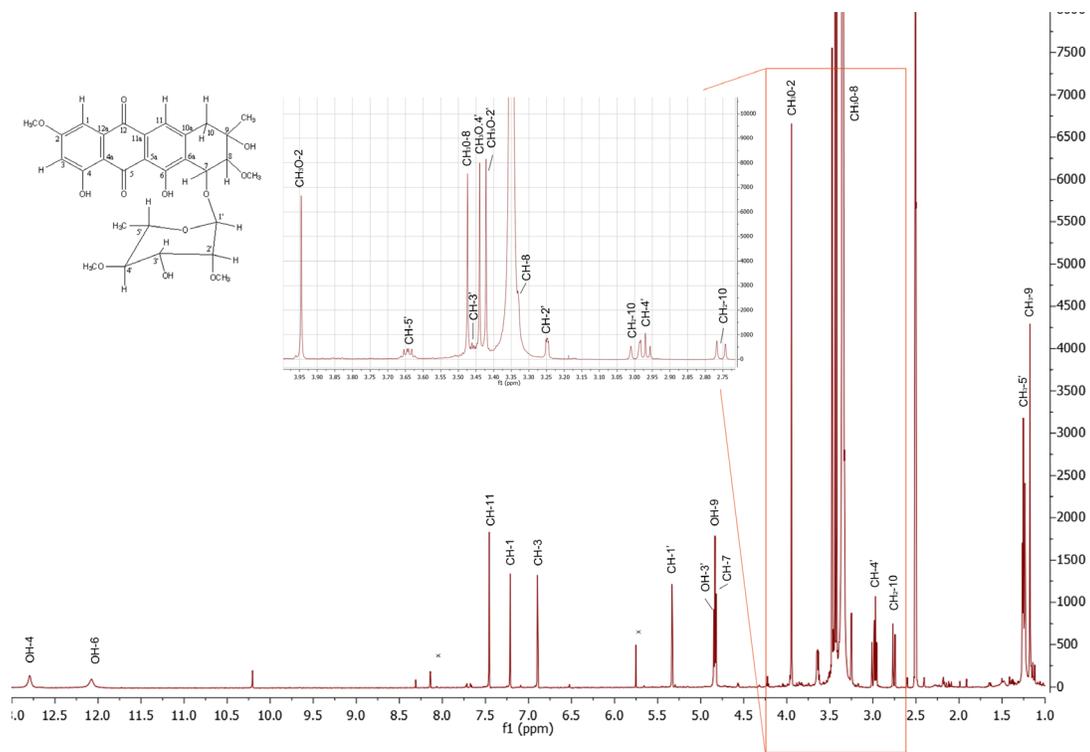


Figura 26. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz, DMSO-d_6) de la estefimicina C (2).

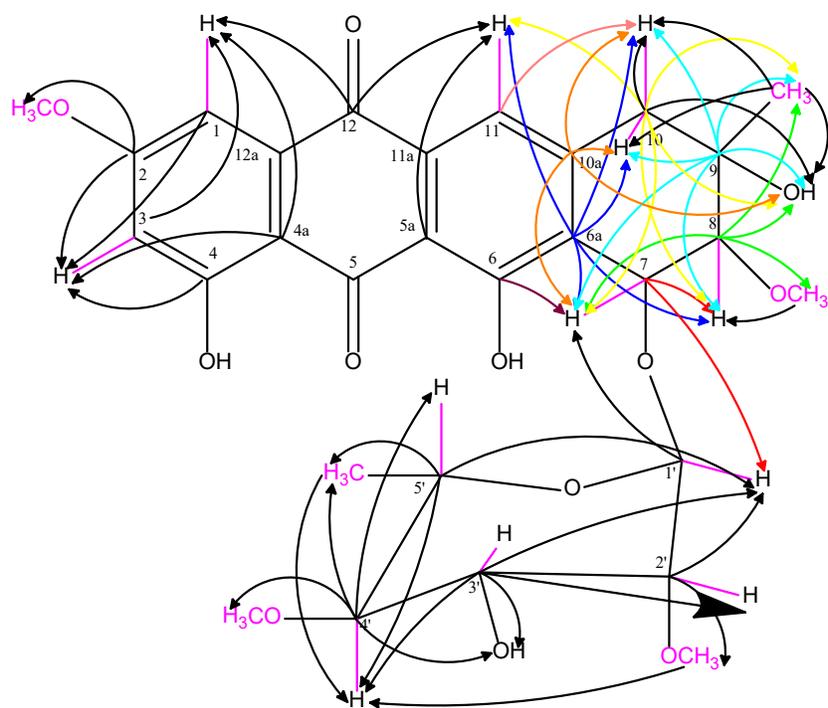


Figura 27. Estructura química de la estefimicina C (2) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

7.11. 3. 8-demetoxiestefimicina B (3)

El compuesto **3** (8-demetoxiestefimicina) se identificó como un nuevo producto natural de la familia de las estefimicinas. El espectro de RMN-¹³C (Figura 28) del compuesto **3**, muestra señales para 28 átomos de carbono (C₂₈H₃₀O₁₂), donde la principal diferencia con el de la estefimicina B (**1**) es la ausencia de la una señal cercana a δ_c 60, asignada al grupo metoxilo de la posición CH₃O-8 y la ausencia en el espectro de RMN-¹H (Figura 29) de una señal simple en aproximadamente δ_H 3.4 que integra para tres hidrógenos asignados a los protones del metoxilo antes mencionado (CH₃O-8). En su lugar, se aprecia en el espectro de RMN-¹H la presencia de dos señales dobles de dobles en δ_H 2.2 (H-8a, J=3 y 2.8 Hz) y δ_H 2.5 (H-8b), (J=2.8 y 2.8 Hz) que en el espectro HSQC correlaciona con una señal de metileno en δ_c 41.4. Es importante aclarar que los carbonos cuaternarios C-10, C-2, C-10a y C-6a no se observaron claramente en la RMN-¹³C debido a la cantidad de compuesto obtenido, no obstante, fueron identificados plenamente mediante el experimento bidimensional HMBC.

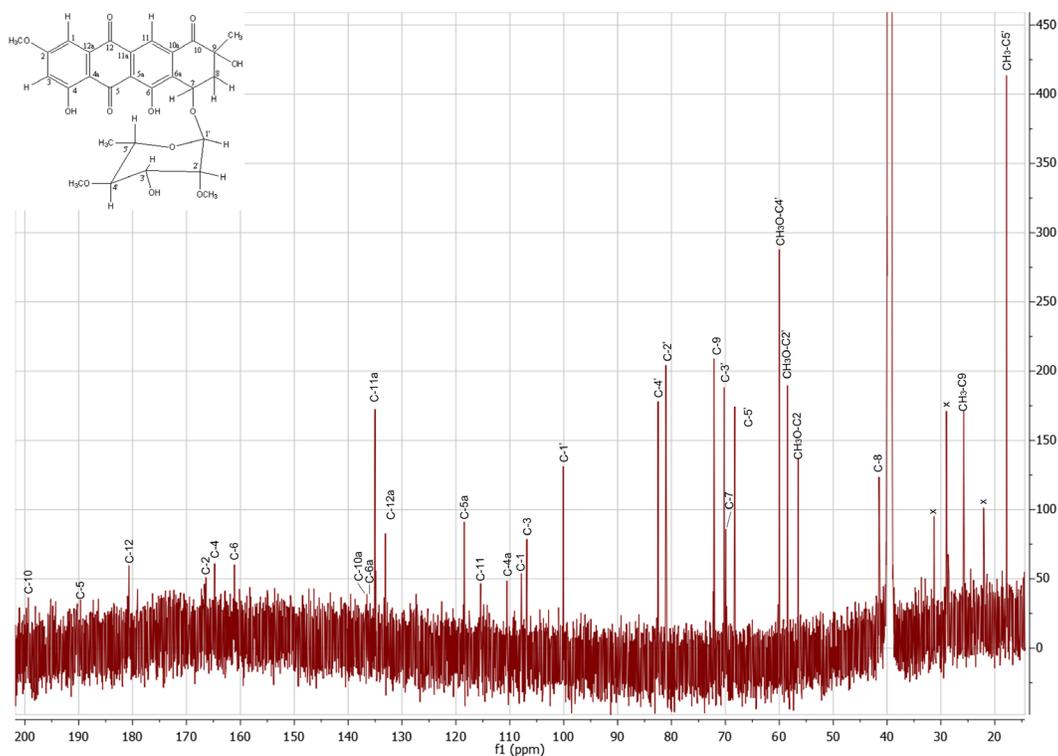


Figura 28. Espectro de RMN-¹³C (175 MHz, DMSO-d₆) de la 8-demetoxiestefimicina B (**3**).

En la Figura 30 y en la Tabla 14 se muestran las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear HSQC y HMBC de la 8-demetoxiestefimicina B.

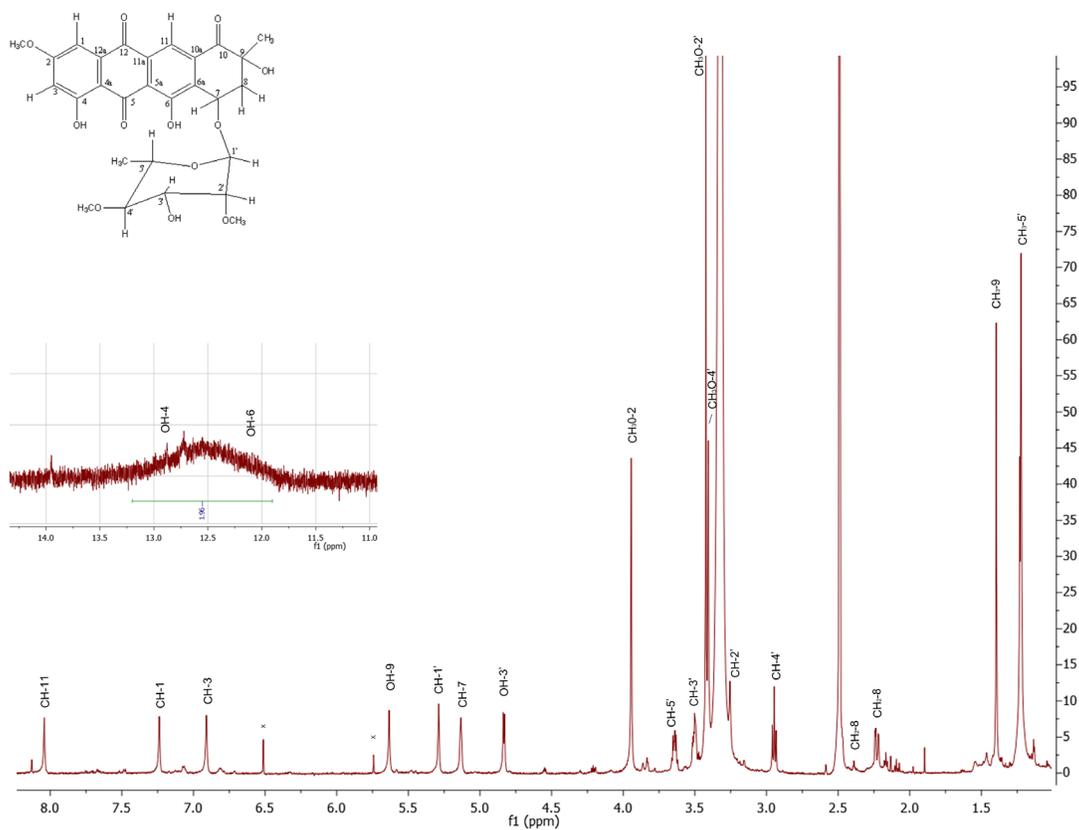


Figura 29. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz, DMSO-d_6) de la 8-demetoxiestefimicina B (3).

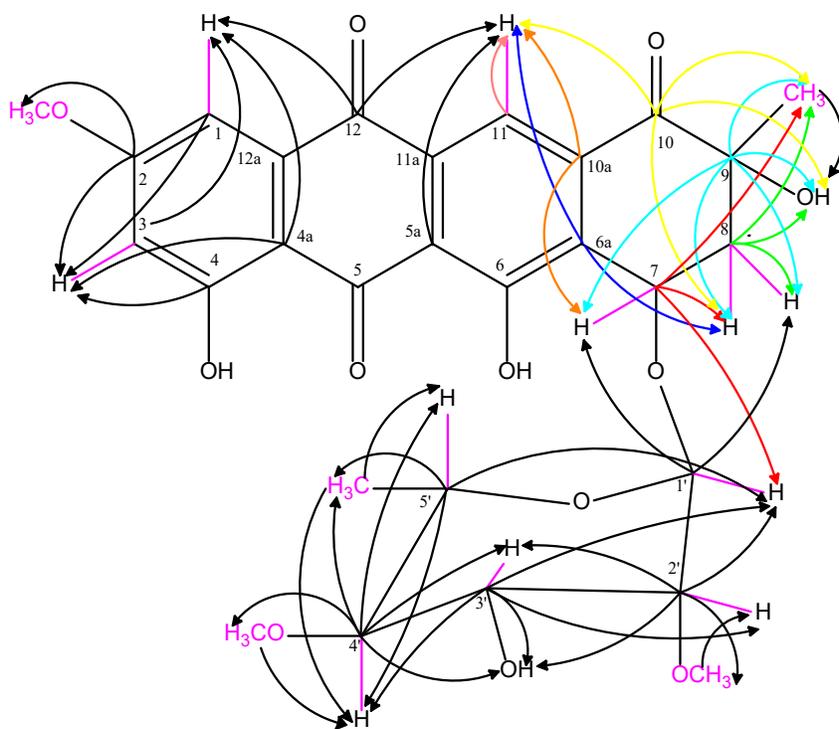


Figura 30. Estructura química de la 8-demetoxiestefimicina B (3) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

7.11.4. 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4)

El compuesto **4** (8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B) también se identificó como un nuevo producto natural de la familia de las estefimicinas. El espectro de la RMN-¹³C (Figura 31) del compuesto **4** muestra señales para 28 átomos de carbono (C₂₈H₃₂O₁₁), dónde la única diferencia con respecto al espectro de la estefimicina C (**2**) es la ausencia de una señal cercana a δ_c 60, asignada al grupo metoxilo de la posición CH₃O-8 y la ausencia en el espectro de RMN-¹H (Figura 32) de una señal simple en aproximadamente δ_H 3.4 que integra para tres hidrógenos asignados a los protones del metoxilo antes mencionado (CH₃O-8). En su lugar, se aprecia en el espectro de RMN-¹H la presencia de dos señales dobles de dobles en δ_H 1.9 (H-8a, J=4.8 y 4.4 Hz) y δ_H 2.5 (H-8b), (J=6 y 6 Hz) que en el espectro HSQC correlaciona con una señal de metileno en δ_c 43.6.

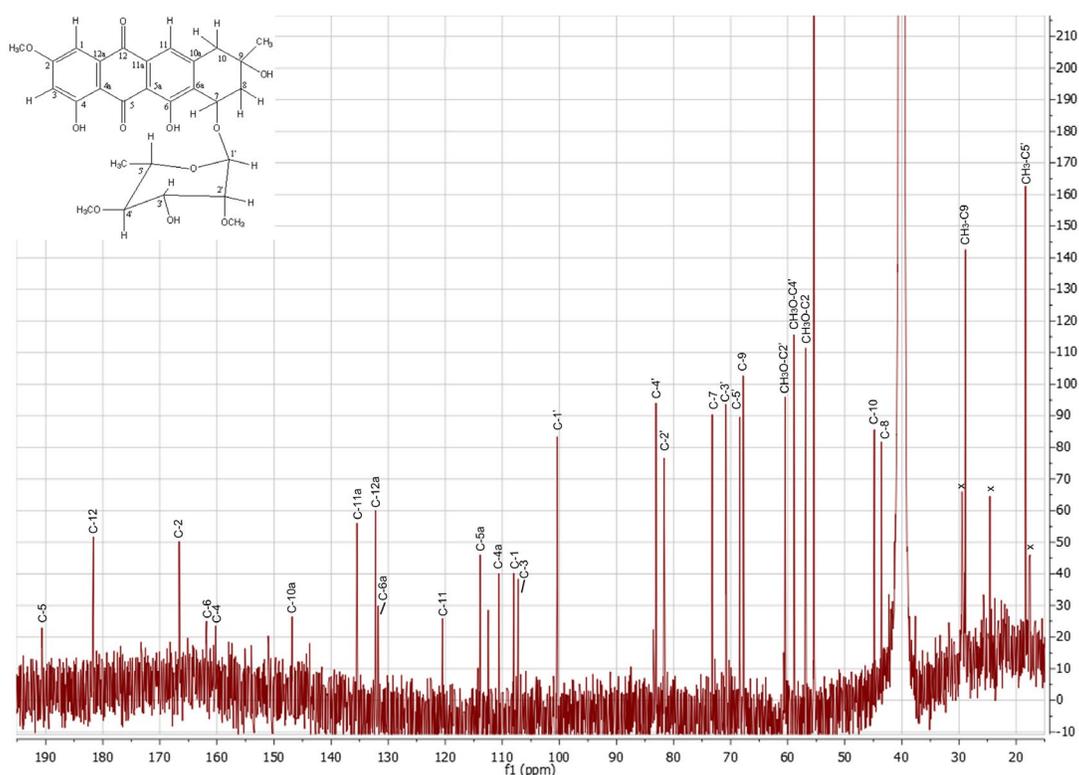


Figura 31. Espectro de RMN-¹³C (175 MHz, DMSO-d₆) de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (**4**).

Los espectros de RMN de correlación heteronuclear HSQC y HMBC permitieron corroborar la estructura del compuesto **4**. En la Figura 33 y Tabla 14 se muestran las interacciones observadas.

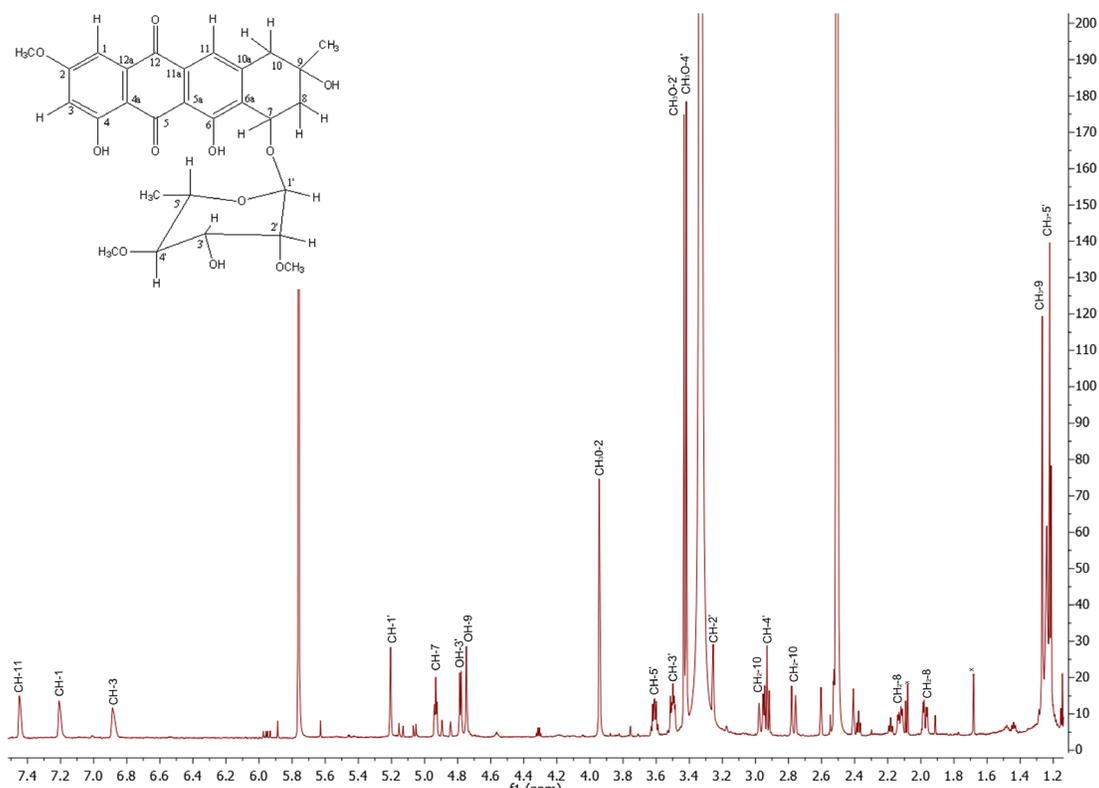


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz, DMSO-d_6) de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4).

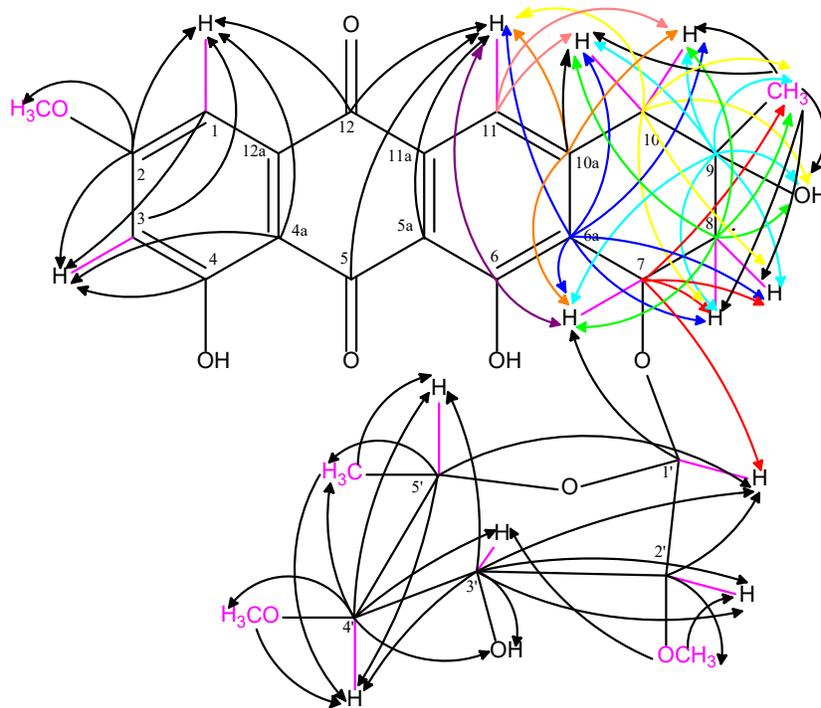


Figura 33. Estructura química de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (4) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

7.11. 5. 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona (5)

El espectro de la RMN-¹³C del compuesto **5** (Figura 34) muestra señales para 20 átomos de carbono (C₂₀H₁₈O₆) y corresponde a la aglicona de la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (**4**). Las principales diferencias con respecto a los espectros de RMN-¹³C y RMN-¹H del compuesto **4** son la ausencia de las señales asignadas a la ramnosa (Tablas 12 y 13). Además, en el espectro de RMN-¹H del compuesto **5** (Figura 35), se observa que el hidrógeno del metino asignado a la posición C-7 del núcleo base de la molécula, se desplaza a campo alto observándose como una señal doble en δ_H 3.5, así como la presencia de una señal múltiple que integra para un hidrógeno en δ_H 2.7 y que se asigna a un grupo hidroxilo en C-7. La estructura del compuesto **5** se confirmó a través de las correlaciones observadas en los espectros de correlación heteronuclear HSQC y HMBC (Figura 36 y Tabla 14).

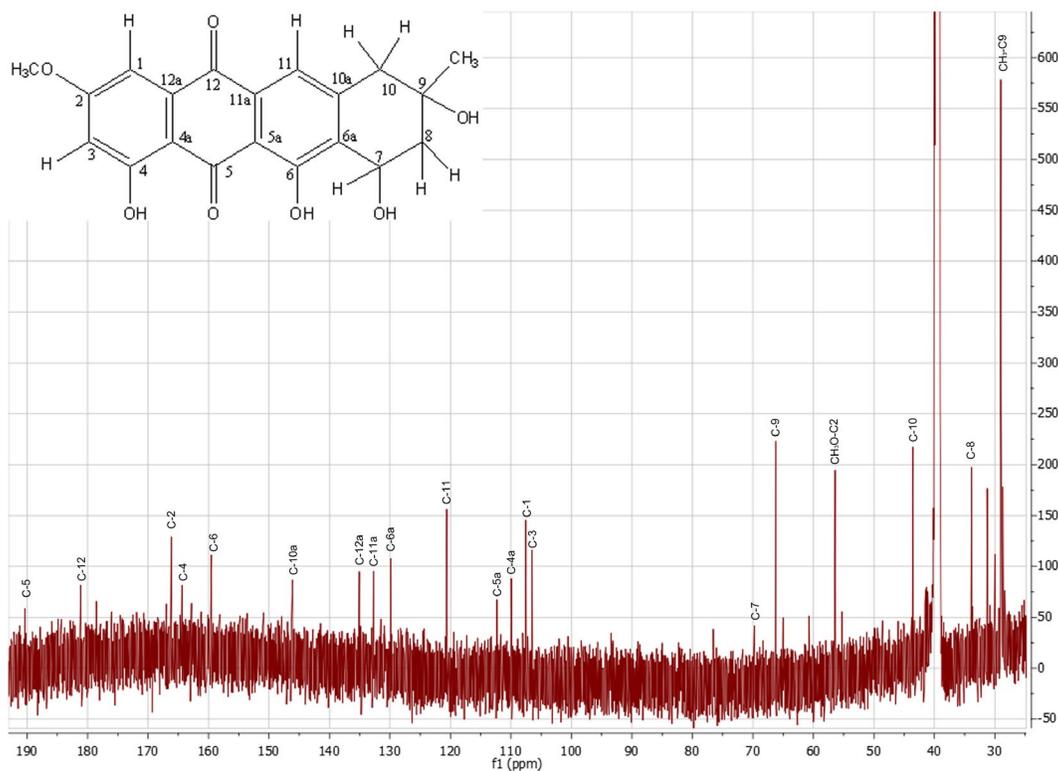


Figura 34. Espectro de RMN-¹³C (700 MHz, DMSO-d₆) de la 8-demetoxi-10-deoxi estefimicinona (**5**).

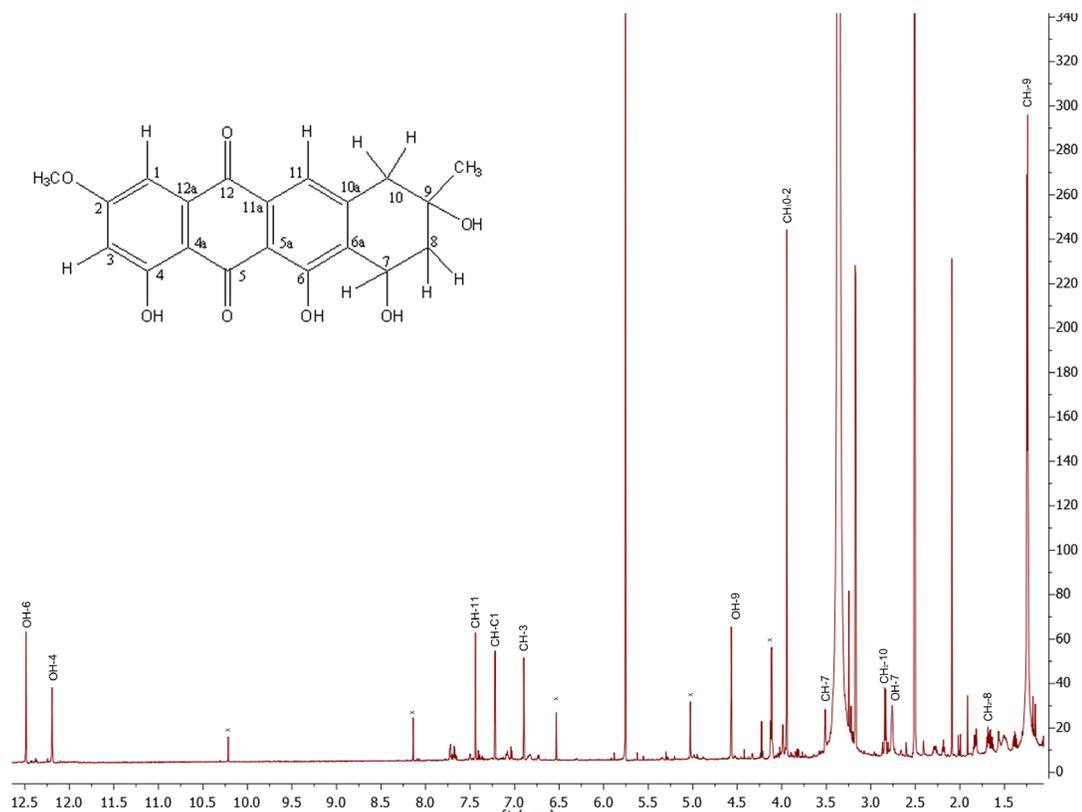


Figura 35. Espectro de RMN-¹H (700 MHz, DMSO-d₆) de la 8-demetoxi-10-deoxi estefimicinona (**5**).

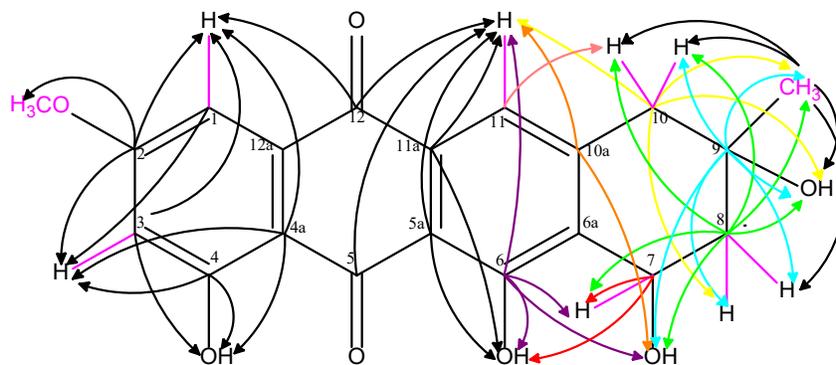


Figura 36. Estructura química de la 8-demetoxi-10-deoxi estefimicinona (**5**) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

7.11. 6. 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona (6)

El compuesto **6** (7-deoxi-8-deoxiestefimicinona) se identificó como la aglicona de la 8-demetoxiestefimicina B (**3**). El espectro de la RMN-¹³C (Figura 37) del compuesto, presenta señales para 20 átomos de carbono C₂₀H₁₆O₇. Las principales diferencias con respecto a los espectros de RMN (¹H y ¹³C) del compuesto **2** son la ausencia de las señales asignadas a la porción sacárida (Tablas 12 y 13). Al mismo tiempo, en el espectro de RMN-¹³C del compuesto **6** se observa que el C-7 se desplaza a campo alto en δ_C 20.5 y muestra correlación en el espectro HSQC con las señales para un metileno en δ_H 3.0 y δ_H 2.9, observado en el espectro de RMN-¹H como dos señales múltiples respectivamente, y que integran cada una para un hidrógeno (Figura 38). La estructura del compuesto **6** se confirmó a través de las correlaciones observadas en los espectros de correlación heteronuclear HSQC y HMBC (Figura 39 y Tabla 14).

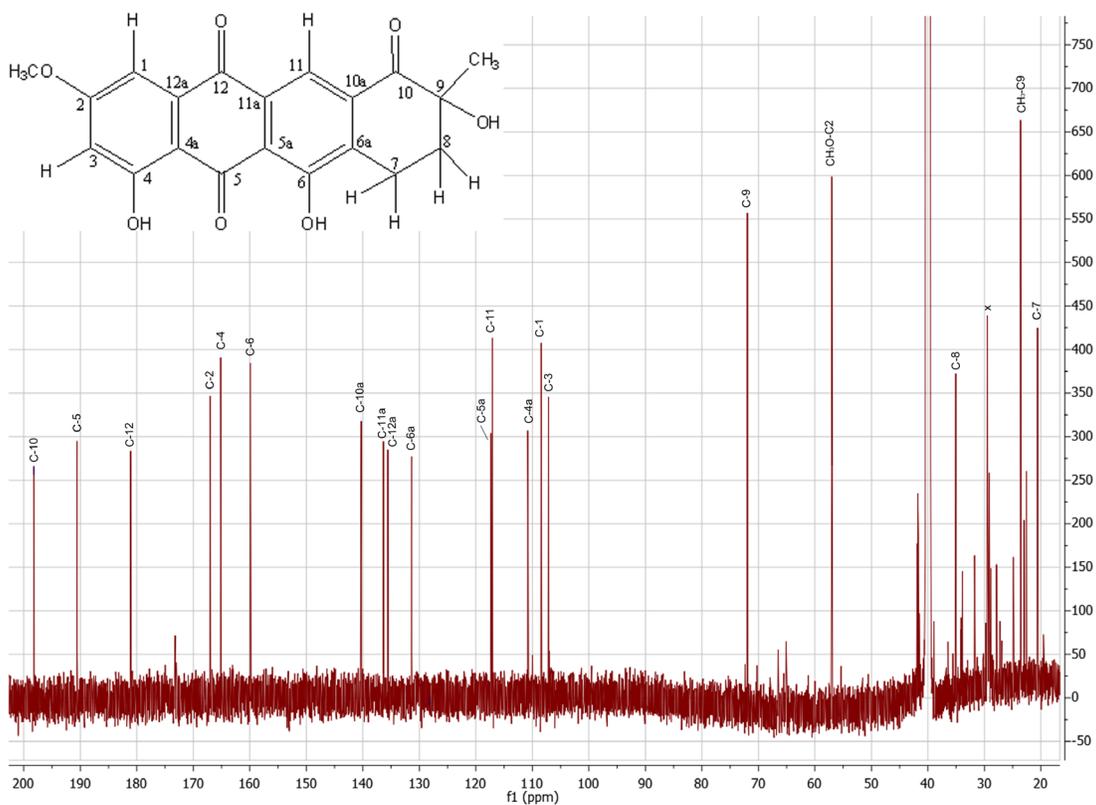


Figura 37. Espectro de RMN-¹³C (175 MHz, DMSO-*d*₆) de la 7-deoxi-8-deoxiestefimicinona (**6**).

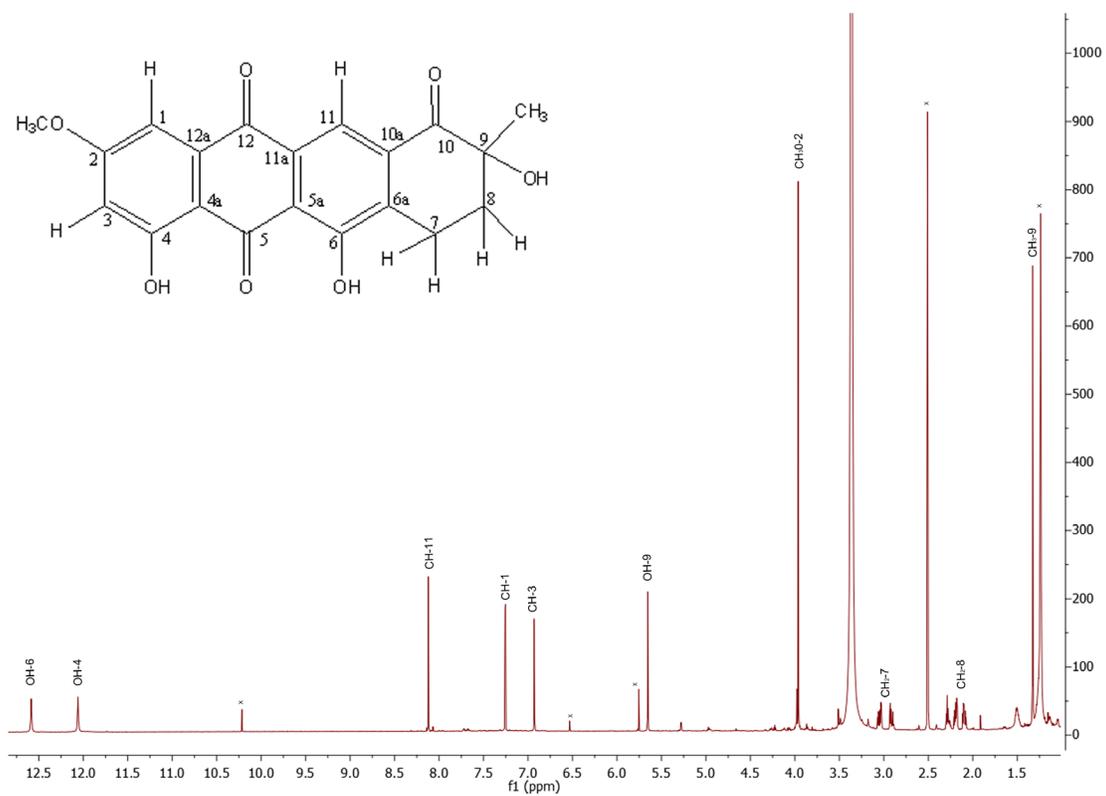


Figura 38. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz, DMSO-d_6) de la 7-deoxi-8-deoxiestefimicinona (**6**).

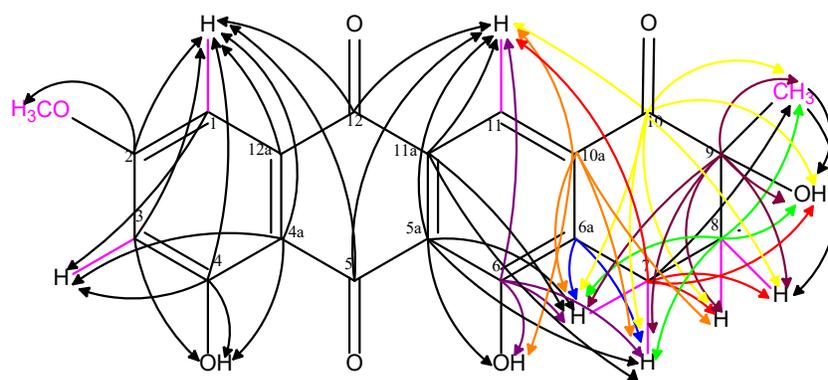


Figura 39. Estructura química de la 7-deoxi-8-deoxiestefimicinona (**6**) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

Por otra parte, el espectro de la RMN-¹³C (Figura 40) también muestra señales para 20 átomos de carbono (C₂₁H₂₀O₇), correspondientes al compuesto **7b**, donde las principales diferencias observadas con respecto a las señales de la estefimicina C (**2**), son la ausencia de las señales características del sacárido de la molécula en la posición C-7 (Tabla 12 y 13) desplazándose dicho carbono a campo alto en señal en δ_c 25.9 y muestra correlación en el espectro HSQC con las señales correspondientes a un doble de dobles que integra para un hidrógeno en δ_H 2.7 (H-7b, $J = 6.5$ y 6.7 Hz) y otra señal simple que integra también para un hidrógeno en δ_H 2.8. . (Figuras 41 y Tabla 13). La estructura del compuesto **7b** se confirmó a través de las correlaciones observadas en los espectros de correlación heteronuclear HSQC y HMBC (Figura 43 y Tabla 14).

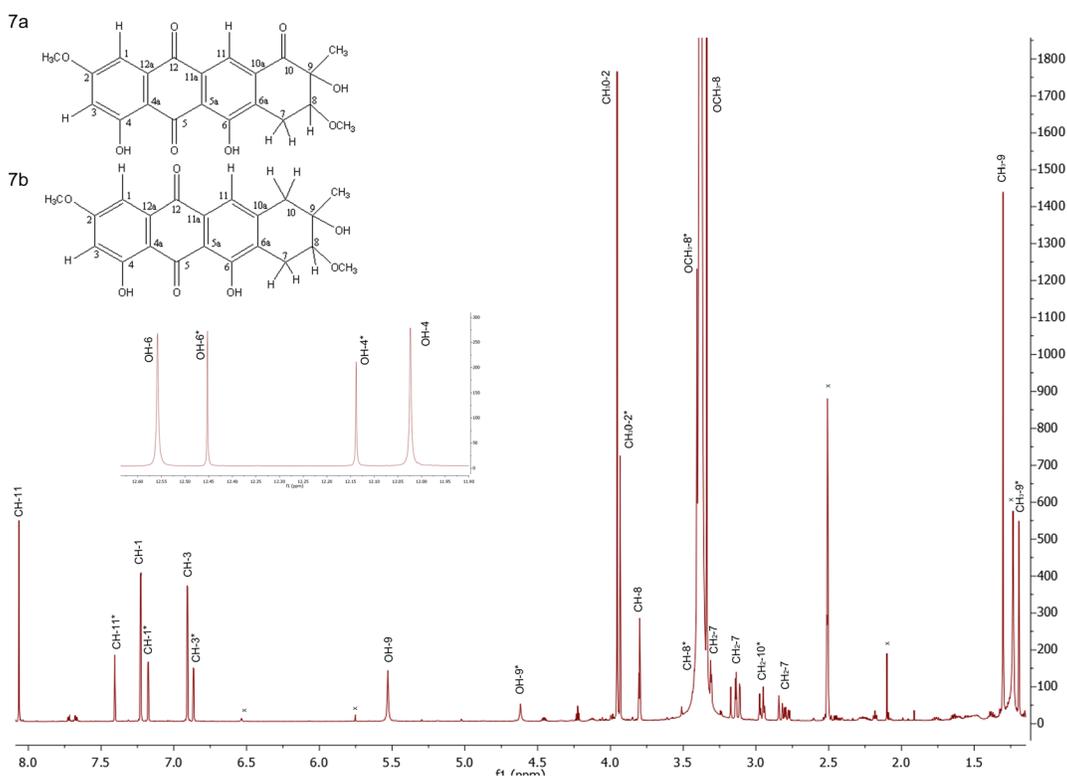


Figura 41. Espectro de RMN-¹H (700 MHz, DMSO-d₆) de la mezcla de compuestos 7-deoxiestefimicinona (**7a**) y la 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona (**7b**). Las señales sin asterisco representan a la molécula **7a** y las señales marcadas con un asterisco a la **7b**.

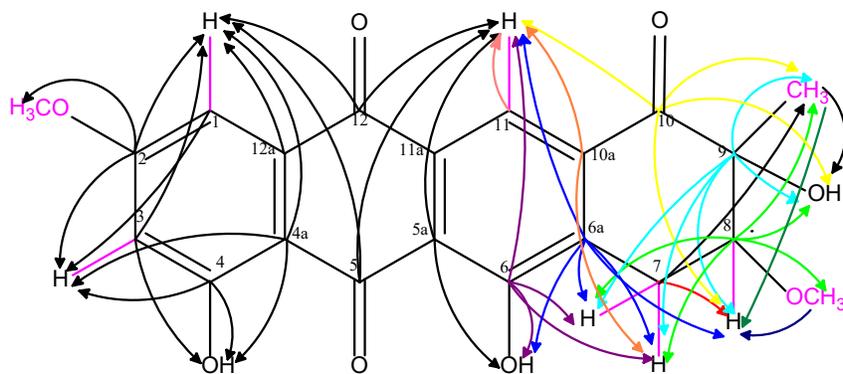


Figura 42. Estructura química de la 7-deoxiestefimicinona (**7a**) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

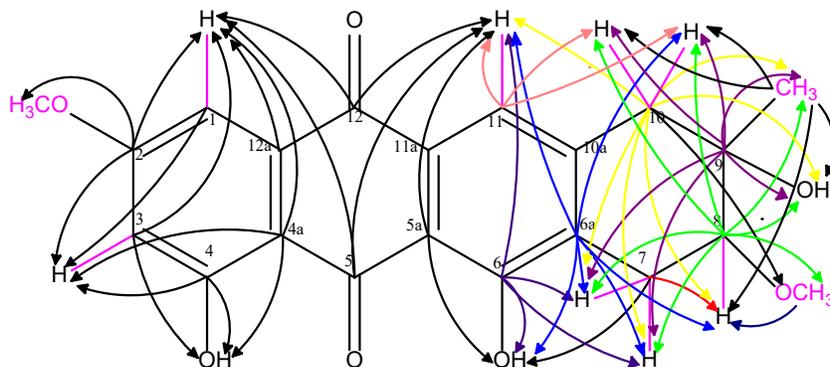


Figura 43. Estructura química de la 7-deoxi-10deoxiestefimicinona (**7b**) mostrando con flechas las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC y en color rosa las correlaciones mostradas en el espectro HSQC.

El análisis espectroscópico y espectrométrico anterior permitió establecer la estructura química de 8 compuestos: la estefimicina B (**1**), estefimicina C (**2**), 8-demetoxiestefimicina B (**3**), 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (**4**), 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona (**5**), 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona (**6**), 7-deoxiestefimicinona (**7a**) y 7-deoxi-10-deoxiestefimicinona (**7b**). En los Cuadros 12, 13 y 14 se muestran los datos espectroscópicos de los compuestos aislados (RMN-¹³C, RMN-¹H y HMBC).

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN-¹³C de los compuestos 1-7a y 7b.

Posición	CDCl ₃	DMSO-d ₆							
	(100 MHz)	1	2	3	4	5	6	7a	7b
1	109.2	108.5	108.1	107.8	108.0	108.0	108.4	107.9	107.5
2	167.5	167.5	166.6	166.3	166.5	166.6	167.0	166.5	166.1
2-OMe	56.2	57.0	56.9	56.4	56.8	56.8	57	56.5	56.3
3	106.7	107.2	107.1	106.8	107.2	106.9	107.1	106.6	106.4
4	165.8	165.1	164.8	164.7	160.2	164.8	166.1	164.6	164.3
4a	110.1	110.8	110.4	110.5	110.5	110.1	110.8	110.2	109.8
5	190.6	189.5	190.6	Nd	190.6	190.8	190.5	189.9	190.2
5a	118.7	119.3	113.9	118.4	113.9	112.7	117.3	117.4	112.3
6	162.1	161.6	162.2	161.7	161.8	159.9	159.9	159.9	159.6
6a	133.5	133.4	129.4	136.4	131.7	130.3	131.3	135.3	130.7
7	71.9	72.1	74.3	69.9	73.2	69.7	20.5	25.9	25.9
8	85.6	86.3	85.1	41.4	43.6	44.0	35.0	83.1	80.5
8-OMe	59.9	60.1	59.2	---	---	---	---	57.9	57.1
9	76.6	76.5	69.0	72.0	67.7	66.7	71.9	76.7	69.1
9-Me	22.9	23.7	25.1	25.7	28.8	29.3	23.6	21.6	25.1
10	198.9	199.0	40.1	199.2	44.8	44.0	198.2	198.6	42.0
10a	135.5	135.6	146.7	136.5	146.8	146.5	140.2	131.1	131.5
11	117.5	115.5	120.1	115.4	120.5	121.0	117.0	115.7	119.9
11a	135.0	133.3	135.4	135	135.2	133.2	136.3	135.8	131.6
12	180.4	180.9	181.5	180.6	181.6	181.5	181.0	180.5	180.9
12a	133.5	133.4	132.3	133.0	132.2	135.5	135.5	135.0	134.9
1'	100.6	101.1	100.9	100.0	100.3	---	---	---	---
2'	80.4	81.3	81.5	81.0	81.6	---	---	---	---
2'-OMe	60.9	60.4	60.4	58.4	60.4	---	---	---	---
3'	71.2	70.6	70.6	70.2	70.8	---	---	---	---
4'	83.3	82.7	82.8	82.4	83.0	---	---	---	---
4'-OMe	58.8	58.0	58.8	59.9	58.8	---	---	---	---
5'	69	69.2	68.8	68.2	68.3	---	---	---	---
5'-Me	17.9	18.3	18.3	17.8	18.3	---	---	---	---

Nd: no detectado, --- el compuesto no presenta esa señal

Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN-¹H de los compuestos 1-7a y 7b.

posición	Tipo	¹ H δ (multiplicidad, J en Hz)				
		CDCl ₃ (400 MHz)	DMSO-d ₆ (700 MHz)			
		1	1	2	3	4
1	CH	1H, 7.35 (d, J 2.8)	1H, 7.24 (d, J 2.5)	1H, 7.21 (d, J 2.8)	1H, 7.25 (s)	1H, 7.20 (s)
2	---	---	---	---	---	---
2-CH ₃ O	CH ₃	3H, 3.89 (s)	3H, 3.95 (s)	3H, 3.94 (s)	3H, 3.95 (s)	3H, 3.94 (s)
3	CH	1H, 6.64 (d, J 2.4)	1H, 6.91 (d, J 2.5)	1H, 6.89 (d, J 2.8)	1H, 6.91 (s)	1H, 6.88 (s)
4	---	---	---	---	---	---
4-OH	OH	1H, 12.00 (s)	1H, 12.80 (br. s)	1H, 12.79 (s)	2H, 12.57 (br. s)	Nd
4a	---	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---	---
5a	---	---	---	---	---	---
6	---	---	---	---	---	---
6-OH	OH	1H, 12.91 (s)	1H, 11.96 (br. s)	1H, 12.07 (s)	2H, 12.57 (br. s)	Nd
6a	---	---	---	---	---	---
7	CH	1H, 5.12 (d, J 2.4)	1H, 5.08 (d, J 2.1)	1H, 4.82 (d, J 2.1)	1H, 5.15 (t, J 3.1)	1H, 4.94 (t, J 5.3)
7-OH	OH	---	---	---	---	---
8	CH	1H, 3.69 (d, J 2.5)	1H, 3.59 (d, J 2.8)	1H, 3.32 (s)	1H, 2.22 (dd, J 3, 2.8) 1H, 2.5 (dd, J 2.8, 2.8)	1H, 1.97 (dd, J 4.4, 4.8) 1H, 2.12 (dd, J 6, 6)
8-CH ₃ O	CH ₃	3H, 3.49 (s)	3H, 3.44 (s)	3H, 3.47 (s)	---	---
9	---	---	---	---	---	---
9-CH ₃	CH ₃	3H, 1.45 (s)	3H, 1.35 (s)	3H, 1.16 (s)	3H, 1.39 (s)	3H, 1.26 (s)
9-OH	OH	1H, 3.56 (s)	1H, 5.67 (s)	1H, 4.83 (s)	1H, 5.63 (s)	1H, 4.74 (s)
10	CH ₂	---	---	1H, 2.7 (d, J 17.2) 1H, 3.0 (s)	---	1H, 2.77 (d, J 16.94) 1H, 2.96 (d, J 16.94)
10a	---	---	---	---	---	---
11	CH	1H, 8.29 (s)	1H, 8.04 (s)	1H, 7.45 (s)	1H, 8.04 (s)	1H, 7.45 (s)
11a	---	---	---	---	---	---
12	---	---	---	---	---	---
12a	---	---	---	---	---	---
1'	CH	1H, 5.54 (s)	1H, 5.44 (s)	1H, 5.33 (s)	1H, 5.28 (s)	1H, 5.20 (s)
2'	CH	1H, 3.47 (dd, J 3.6, 3.6)	1H, 3.31(m)	1H, 3.24 (m)	1H, 3.25 (s)	1H, 3.25 (d, J 1.33)
2'-CH ₃ O	CH ₃	3H, 3.51 (s)	3H, 3.44 (s)	3H, 3.42 (s)	3H, 3.43 (s)	3H, 3.43 (s)
3'	CH	1H, 3.61 (m)	1H, 3.51 (m)	1H, 3.45 (m)	1H, 3.52 (m)	1H, 3.49 (m)
3'-OH	OH	1H, 2.34 (d, J 8.8)	1H, 4.92 (d, J 6.3)	1H, 4.84 (d, J 6.3)	1H, 4.83 (d, J 6.3)	1H, 4.78 (d, J 6.44)
4'	CH	1H, 3.00 (t, J 9.4)	1H, 3.007 (t, J 9.3)	1H, 2.96 (s)	1H, 2.95 (t J 9.4)	1H, 2.93 (d, J 9.48)
4'-CH ₃ O	CH ₃	3H, 3.52 (s)	3H, 3.45 (s)	3H, 3.44 (s)	3H, 3.42 (s)	3H, 3.41 (s)
5'	CH	1H, 3.72 (m)	1H, 3.65 (m)	1H, 3.64 (m)	1H, 3.64 (m)	1H, 3.61 (m)
5'-CH ₃	CH ₃	3H, 1.33 (s)	3H, 1.28 (s)	1H, 1.25 (d)	3H, 1.23 (s)	3H, 1.22 (s)

Continuación del Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN-¹H de los compuestos 1-7a y 7b.

posición	Tipo	¹ H δ (multiplicidad, J en Hz)			
		DMSO-d ₆ (700 MHz)			
		5	6	7a	7b
1	CH	1H, 7.21 (d, J 2.5)	1H, 7.25 (d, J 2.5)	1H, 7.22 (s)	1H, 7.17 (s)
2	---	---	---	---	---
2-OMe	CH ₃	3H, 3.94 (s)	3H, 3.96 (s)	3H, 3.94 (s)	3H, 3.92 (s)
3	CH	1H, 6.89 (d, J 2.5)	1H, 6.93 (d, J 2.1)	1H, 6.90 (s)	1H, 6.86 (s)
4	---	---	---	---	---
4-OH	OH	1H, 12.48 (s)	1H, 12.06 (s)	1H, 12.00 (s)	1H, 12.12 (s)
4a	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---
5a	---	---	---	---	---
6	---	---	---	---	---
6-OH	OH	1H, 12.19 (s)	1H, 12.58 (s)	1H, 12.56 (s)	1H, 12.46 (s)
6a	---	---	---	---	---
7	CH* CH ₂	*1H, 3.50 (d, J 3.6)	1H, 3.04 (m) 1H, 2.91 (m)	1H, 3.29 (d, J 3.5) 1H, 3.12 (dd, J 3.5, 3.5)	1H, 2.81 (s) 1H, 2.76 (dd, J 6.5, 6.7)
7-OH	OH	1H, 2.76 (m)	---	---	---
8	CH* CH ₂	2H, 1.82 (m)	1H, 2.18 (m) 1H, 2.09 (m)	*1H, 3.79 (t, J 3.5)	*1H, 3.39 (s)
8-OMe	CH ₃	---	---	3H, 3.33 (s)	3H, 3.40 (s)
9	---	---	---	---	---
9-Me	CH ₃	3H, 1.24 (s)	3H, 1.32 (s)	3H, 1.29 (s)	3H, 1.18 (s)
9-OH	OH	1H, 4.56 (s)	1H, 5.65 (s)	1H, 5.51 (s)	1H, 4.60 (s)
10	CH ₂	1H, 2.84 (s) 1H, 2.83 (s)	---	---	1H, 2.97 (s) 1H, 2.84 (s)
10a	---	---	---	---	---
11	CH	1H, 7.43 (s)	1H, 8.12 (s)	1H, 8.05 (s)	1H, 7.40 (s)
11a	---	---	---	---	---
12	---	---	---	---	---
12a	---	---	---	---	---
1'	---	---	---	---	---
2'	---	---	---	---	---
2'-OMe	---	---	---	---	---
3'	---	---	---	---	---
3'-OH	---	---	---	---	---
4'	---	---	---	---	---
4'-OMe	---	---	---	---	---
5'	---	---	---	---	---
5'-Me	---	---	---	---	---

Cuadro 14. Datos espectroscópicos de las correlaciones heteronucleares HMBC de los compuestos **1-7a** y **7b**.

Posición	CDCl ₃	DMSO-d ₆			
	1	1	2	3	4
1	H-3	H-3	H-3	H-3	H-3
2	OCH ₃ -2, H-3, OH-4, H-1	OCH ₃ -2, H-3, H-1	OCH ₃ -2, H-3	OCH ₃ -2, H-3	H-1, OCH ₃ -2, H-3
2-Ome	---	---	---	---	---
3	H-1, OH-4	H-1	H-1	H-1	H-1
4	H-3, OH-4	H-3	H-3	H-3	---
4a	H-1, H-3, OH-4	H-1, H-3	H-1, H-3	H-1, H-3	H-1, H-3
5	---	---	---	---	H-11
5a	OH-6, H-11	H-11	H-11	H-11	H-11
6	OH-6, H-7	H-7	H-7	---	H-7, H-11
6a	OH-6, H-7, H-8, H-11	H-7, H-8, H-11	CH ₂ -10, H-7, H-8, H-11	CH ₂ -8, H-11	H-7, CH ₂ -8, CH ₂ -10, H-11
7	H-8, H-1'	H-8, H-1'	H-8, H-1'	H-8, H-1', CH ₃ -9	CH ₂ -8, CH ₃ -9, H-1'
8	H-7, OCH ₃ -8, OH-9, CH ₃ -9	H-7, OCH ₃ -8, OH-9, CH ₃ -9	H-7, OCH ₃ -8, OH-9, CH ₃ -9, CH ₂ -10	H-8, OH-9, CH ₃ -9	H-7, OH-9, CH ₂ -10, CH ₃ -9
8-Ome			H-8	---	---
9	H-7, H-8, OH-9, CH ₃ -9	H-7, H-8, OH-9, CH ₃ -9	H-7, H-8, OH-9, CH ₂ -C10, CH ₃ -9	H-7, CH ₂ -8, OH-9, CH ₃ -9	H-7, CH ₂ -8, OH-9, CH ₃ -9, CH ₂ -10
9-Me	H-8, OH-9	H-8, OH-9	OH-9, CH ₂ -10	OH-9, CH ₂ -8	CH ₂ -8, OH-9, CH ₂ -10
10	H-8, OH-9, CH ₃ -9, H-11	H-8, OH-9, CH ₃ -9, H-11	H-7, OH-9, H-8, CH ₃ -9, H-11	OH-9, CH ₂ -8, CH ₃ -9, H-11	CH ₂ -8, OH-9, CH ₃ -9, H-11
10a	H-7	H-7	H-7, CH ₂ -10, OH-9,	H-11, H-7	H-7, CH ₂ -10, H-11
11	H-11	---	CH ₂ -10	H-11	CH ₂ -10
11a	---	---	---	---	---
12	H-1, H-11	H-1, H-11	H-1, H-11	H-1, H-11	H-1, H-11
12a	---	H-11	---	---	---
1'	H-7	H-7	H-7	H-7, CH ₂ -8	H-7
2'	H-1', OCH ₃ -2', OH-3', H-3'	H-1', OCH ₃ -2', OH-3'	H-1', OCH ₃ -2'	H-1', OCH ₃ -2', OH-3', H-3'	H-1', OCH ₃ -2'
2'-Ome	H-4'	H-4'	H-4'	H-2', H-3'	H-2', H-3'
3'	OH-3', H-4'	H-1', H-2', OH-3', H-4'	H-1', H-2', OH-3', H-4'	H-1', H-2', OH-3', H-4'	H-1', H-2', OH-3', H-4', H-5'
4'	OCH ₃ -4', CH ₃ -5'	OH-3', OCH ₃ -4', CH ₃ -5', H-5'	OH-3', OCH ₃ -4', CH ₃ -5', H-5'	OH-3', H-3', OCH ₃ -4', CH ₃ -5', H-5'	OH-3', H-3', OCH ₃ -4', CH ₃ -5', H-5'
4'-Ome	---	---	---	H-4'	H-4'
5'	H-4', CH ₃ -5'-H-1'	H-4', CH ₃ -5', H-1'	H-1', CH ₃ -5', H-4'	H-1', CH ₃ -5', H-4'	H-1', CH ₃ -5', H-4'
5'-Me	H-4'	H-4'	H-4'	H-4'-H-5'	H-4'-H-5'

Continuación del Cuadro 14. Datos espectroscópicos de las correlaciones heteronucleares HMBC de los compuestos **1-7a** y **7b**. Correlaciones heteronucleares HMBC de los compuestos químicos.

Posición	DMSO-d ₆			
	5	6	7a	7b
1	H-3	H-3	H-3	H-3
2	OCH ₃ -2, H-3, H-1	OCH ₃ -2, H-1	OCH ₃ -2, H-3, H-1	OCH ₃ -2, H-3, H-1
2-OMe	---	---	---	---
3	H-1, OH-4	H-1, OH-4	H-1, OH-4	H-1, OH-4
4	H-3, OH-4	H-1, H-3, OH-4	H-3, OH-4	H-3, OH-4
4a	H-1, H-3, OH-4	H-1, H-3, OH-4	H-1, H-3, OH-4	H-1, H-3, OH-4
5	H-11	H-1, H-11	H-1, H-11	H-1, H-11
5a	OH-6, H-11	OH-6, CH ₂ -7, H-11	OH-6, H-11	OH-6, H-11
6	OH-6, H-7, OH-7, H-11	OH-6, CH ₂ -7, H-11	OH-6, CH ₂ -7, H-11	OH-6, CH ₂ -7, H-11
6a	---	CH ₂ -7	OH-6, CH ₂ -7, H-8, CH ₂ -10, H-11	---
7	OH-6, H-7	CH ₂ -8, OH-9, H-11	H-8	H-8
8	OH-7, H-7, OH-9, CH ₃ -9, CH ₂ -10	CH ₂ -7, OH-9, CH ₃ -9	CH ₂ -7, OCH ₃ -8, OH-9, CH ₃ -9, CH ₂ -10	CH ₂ -7, OCH ₃ -8, OH-9, CH ₃ -9
8-OMe	---	---	H-8	H-8
9	OH-7, OH-9, CH ₂ -8, CH ₃ -9, CH ₂ -10	CH ₂ -7, CH ₂ -8, CH ₃ -9, OH-9	CH ₂ -7, OH-9, CH ₃ -9, CH ₂ -10	CH ₂ -7, H-8, OH-9, CH ₃ -9
9-Me	CH ₂ -8, OH-9, CH ₂ -10	CH ₂ -8, OH-9	H-8, OH-9, CH ₂ -10	H-8, OH-9
10	CH ₂ -8, OH-9, CH ₃ -9, H-11	CH ₂ -7, CH ₂ -8, OH-9, CH ₃ -9, H-11	CH ₂ -7, H-8, OH-9, CH ₃ -9, H-11	H-8, OH-9, CH ₃ -9, H-11
10a	OH-7, H-11	OH-6, CH ₂ -7, CH ₂ -8, H-11	CH ₂ -7, H-11	---
11	CH ₂ -10	---	H-11	CH ₂ -10, H-11
11a	OH-6, H-11	CH ₂ -7, H-11	---	---
12	H-1, H-11	H-1, H-11	H-1, H-11	H-1, H-11
12a	---	H-1	H-1	H-1

7.12. Actividad citotóxica de compuestos aislados

La actividad citotóxica del compuesto mayoritario StefB (**1**) fue evaluado en distintas líneas celulares, incluyendo líneas celulares de cáncer de mama triple negativas, como la HCC1806, HCC1937 y DU4475 y el CI₅₀ de cada línea celular fue calculado. En el Cuadro 14 se observa que el compuesto **1** tuvo actividad principalmente en las líneas celulares HCC70, MCF-7, DU4475, HCC1806 y MBCD5, siendo las células HCC70 y MCF-7 las más afectadas. También

se puede observar que, aunque los valores de CI_{50} obtenidos fueron mayores que los presentados por el control positivo doxorubicina, el compuesto **1** es menos tóxico para la línea no cancerosa de queratinocitos.

Cuadro 15. CI_{50} de la actividad citotóxica de la *StefB* (**1**) en diferentes líneas celulares.

Línea Celular	CI_{50} μM	
	StefB (1)	Doxorrubicina
HeLa	71.90	4.34
MCF7	2.56	1.32
HaCaT	156.00	4.67
HCC1806*	18.20	0.07
HCC1937*	456.00	0.45
HCC70	0.79	0.04
MBCD5	25.70	1.59
DU4475	4.81	<0.09

* células triple negativas (RE-, RP-, HER2-) y proteína p53-

Debido al rendimiento obtenido para los demás compuestos caracterizados, no fue posible realizar las curvas de citotoxicidad y realizar el cálculo de la CI_{50} ; sin embargo, se realizó la evaluación del efecto que tenían las diferentes estefimicinas en células de cáncer de mama MCF-7 a 6.25 $\mu g/mL$. En la Figura 44 se muestran los resultados, mostrando el efecto citotóxico a través del número de células que se mantienen vivas después de los tratamientos, esto se hizo con la finalidad de poder compararlos con los resultados de la citometría de flujo. Se encontró que **1** es el compuesto más citotóxico encontrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al número de células sin tratamiento y también contra el control positivo, doxorubicina, a esta concentración. Las estefimicinas **2**, **3**, así como las estefimicinonas **5** y **6** tampoco presentaron actividad, sin embargo, la estefimicina **4** mostró diferencia significativa con respecto al número de células sin tratamiento.

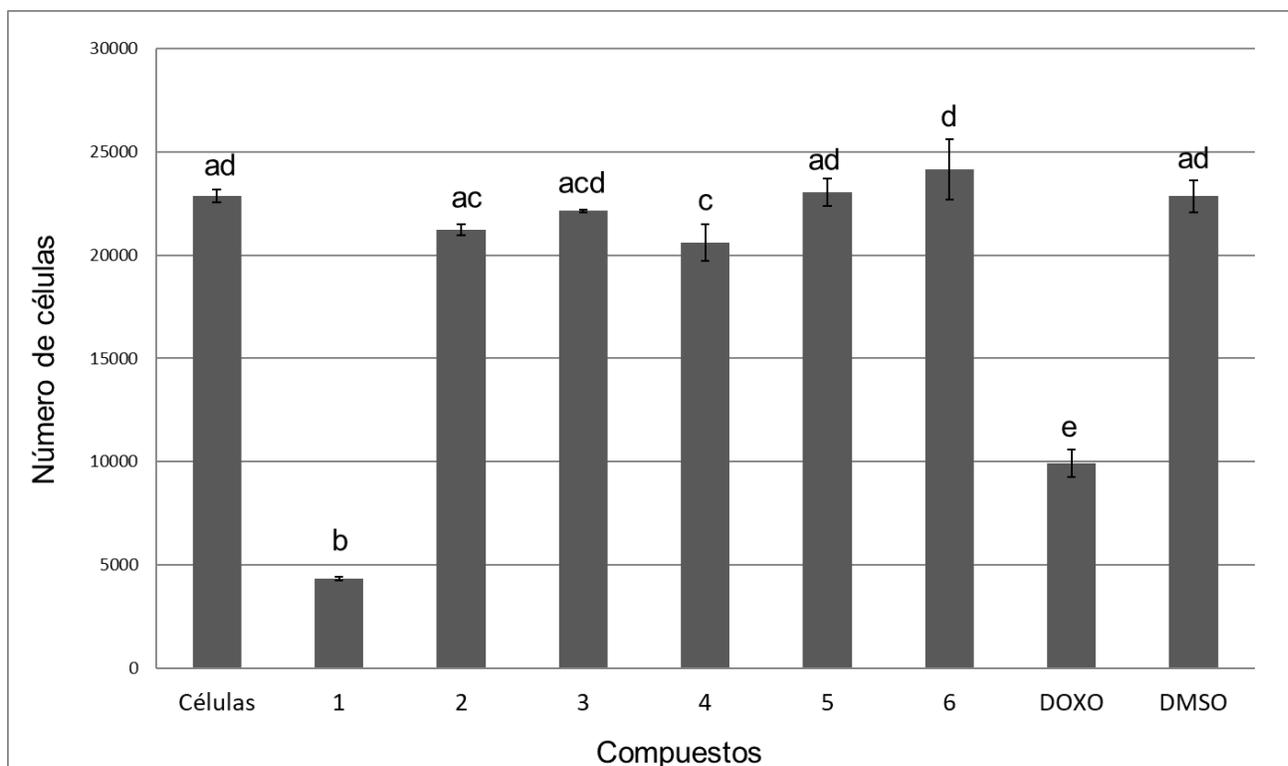


Figura 44. Número de células vivas después de los tratamientos con los compuestos aislados de *Embleya* sp. NF3, evaluados a 6.25 µg/mL en células MCF-7, así como células sin tratamiento. Las barras indican el error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey, las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, ANOVA $F_{(8,18)} = 285$, $P < 0.05$.

7.13. Evaluación de la actividad de la StefB por citometría de flujo

Para corroborar que el mecanismo de muerte celular que provoca la StefB (1) es similar a otras antraciclinas, es decir, mediante la apoptosis, se realizó un estudio de citometría de flujo utilizando anexina V, con la línea celular MCF-7 a la concentración de CI_{50} obtenida para el compuesto a 12, 24 y 48 horas de contacto. Los resultados se muestran en la Figura 45 donde se observa que en efecto el compuesto provoca apoptosis en las células evaluadas, aumentando el número de células apoptóticas al aumentar el tiempo de contacto del compuesto y disminuyendo el número de células vivas hasta las 48 horas.

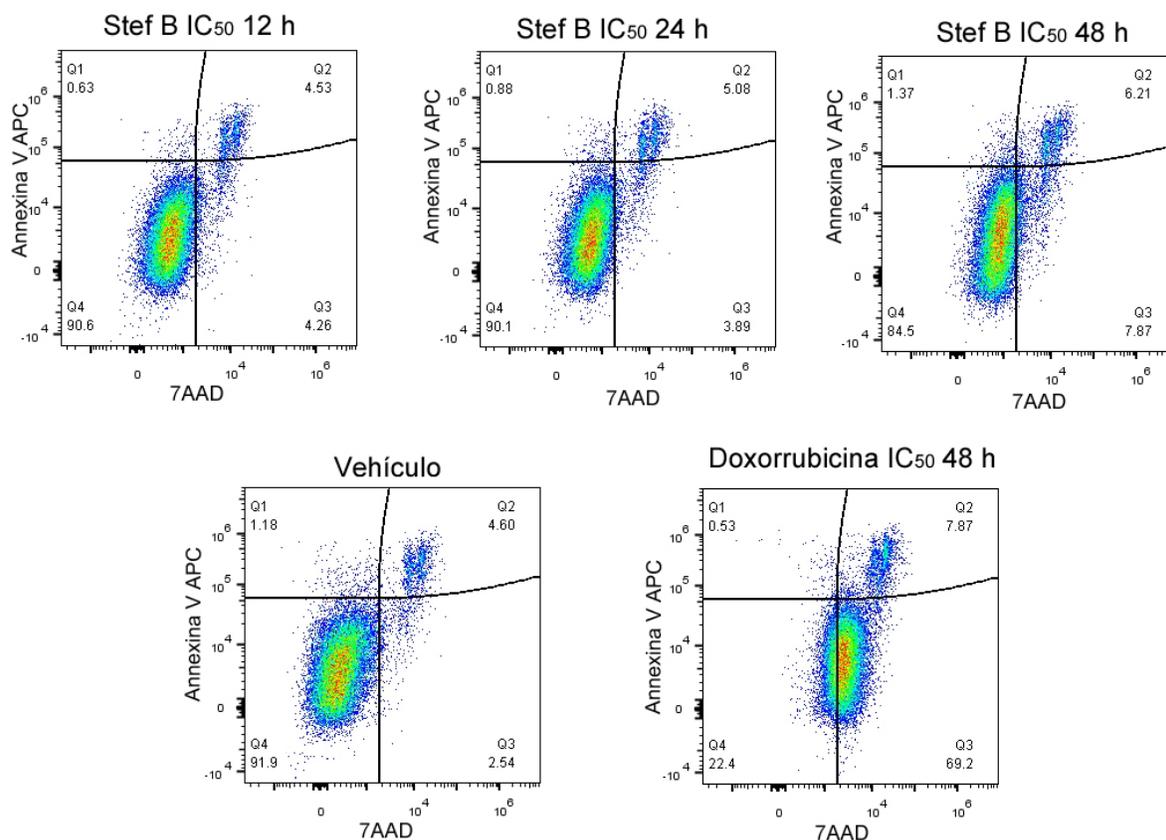


Figura 45. Determinación del efecto de la *StefB* (1) en células MCF-7 mediante citometría de flujo con Annexina V a diferentes tiempos de contacto. Cuadrantes Q1=apoptosis temprana, Q2=apoptosis tardía, Q3=necrosis, Q4=células vivas.

Los otros compuestos aislados de la familia de las estefimicinas también fueron evaluados mediante citometría de flujo para determinar su actividad citotóxica, conocer el estado metabólico de las células tratadas, así como corroborar si la apoptosis era el mecanismo de acción. Estas se llevaron a cabo a una concentración de 6.25 µg/mL de cada uno de los compuestos. En la Figura 46 se observa el gráfico con los resultados obtenidos de ese estudio, donde se encontraron células en apoptosis en todas las muestras evaluadas, incluso en el vehículo, sin embargo, las células en necrosis fueron mayores en la doxorubicina y en los compuestos 1 y 2.

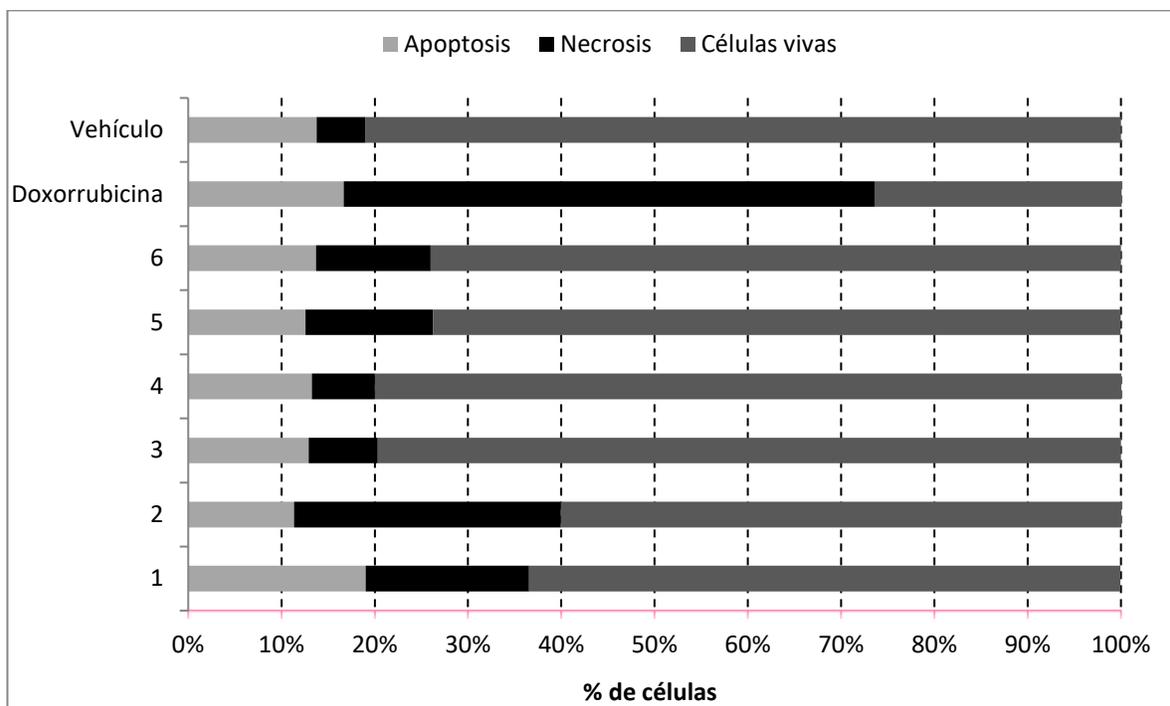


Figura 46. Efecto de los compuestos 1-6 a una concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en células MCF-7 evaluado mediante citometría de flujo con Anexina V y 7AAD a 48 horas de contacto.

7.14. Proliferación celular, senescencia y cambios morfológicos de StefB (1) en células MCF-7

Una característica de las células que se encuentran en proliferación es la expresión de la proteína del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). En ese sentido, se evaluó si la expresión de esta proteína se había visto afectada por la presencia de la StefB (1) a los diferentes tiempos de contacto con células MCF-7. Como se observa en la Figura 47 a un mayor tiempo de contacto del compuesto, la expresión del PCNA se vio disminuida.

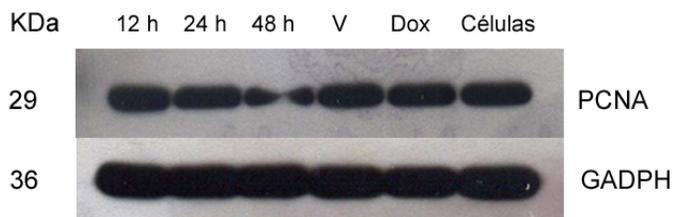


Figura 47. Análisis por western blot de la expresión del marcador de proliferación celular PCNA en células MCF-7 tratadas con StefB (1). Se incluye la detección de GADPH como un control interno.

Finalmente, se quiso observar si las células que se mantenían vivas en el medio de cultivo se encontraban en estado de senescencia a causa de la StefB (Figura 48). Se utilizó un método de tinción de la SA- β -galactosidasa; sin embargo, lo que encontramos fue que el compuesto provocaba que las células MCF-7 que tienen la característica de ser adherentes, se despegaran de la superficie de las cajas petri, haciendo que el conteo de las células

senescentes para los tratamientos con StefB no fuera posible. Con respecto a la morfología de las células, en el caso de la doxorubicina, se observó una morfología aplanada, con aumento de tamaño y apariencia vacuolada, sin embargo, para los tratamientos con StefB se observaron cambios drásticos de morfología, observando estructuras esféricas, más evidentes a las 48 horas de tratamiento.

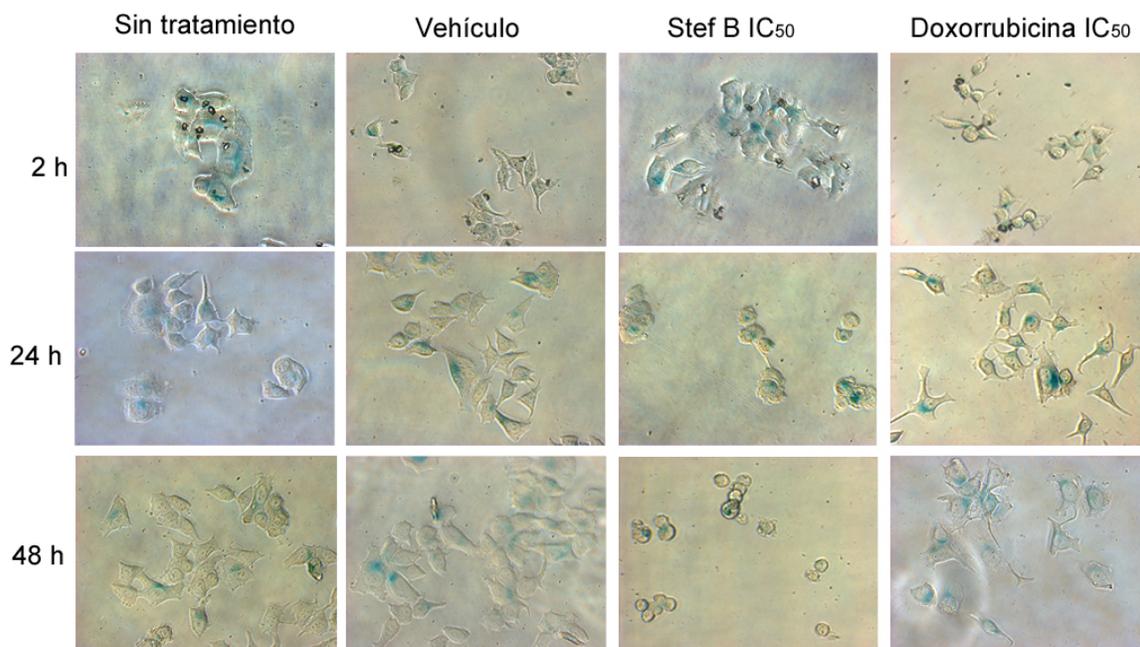


Figura 48. Micrografías obtenidas mediante microscopía óptica inversa X20 de células MCF-7 tratadas con StefB (1) mostrando cambios morfológicos y células teñidas con β -galactosidasa.

Otra característica importante de resaltar es que todos los compuestos tuvieron muy baja solubilidad en medios acuosos, y en las evaluaciones microscópicas de las células tratadas con StefB fue posible observar la formación de cristales del compuesto en el medio de cultivo (Figura 49) lo que puede indicarnos que al poco tiempo de contacto que tuvo el compuesto con las células antes de precipitarse fue el que provocó la actividad biológica aquí reportada.

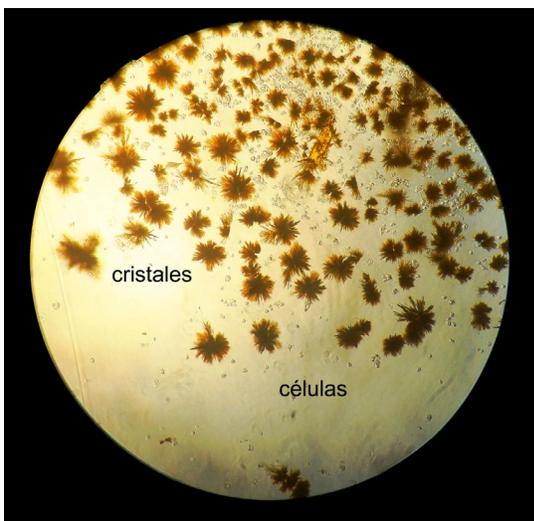


Figura 49. Micrografía de los cristales de la StefB (1) obtenida en microscopía inversa X20 a 2 horas de haber sido colocado en medio acuoso (RPMI) con células MCF-7.

8. Discusión

Durante muchos años, la producción de compuestos bioactivos obtenidos a partir de las plantas se había atribuido solamente a ellas. Sin embargo, ahora se sabe que la comunicación y las interacciones entre los endófitos y la planta huésped podrían promover o reducir la producción de metabolitos secundarios, o en ocasiones estar involucrados ambos organismos para la producción de un metabolito en particular (Ludwig-Müller 2015). Las interacciones ambientales y algunos otros factores bióticos y abióticos también son de importancia en la producción de metabolitos y la interrelación endófito-planta (Kusari *et al.*, 2012) y los microorganismos endófitos por si mismos se han descubierto como grandes productores de compuestos bioactivos, atribuido principalmente al ambiente único que encuentran en el interior de las plantas (Martinez-Klimova *et al.*, 2016).

A. adstringens se seleccionó para su estudio debido a la gran cantidad de usos tradicionales y propiedades medicinales que se le atribuyen, así como a los diversos estudios fitoquímicos que sustentan algunas de estas actividades. Adicionalmente, esta planta es endémica de nuestro país y está en riesgo por la colecta masiva de sus cortezas, misma que se realiza de manera inadecuada. Estudios fitoquímicos en esta planta han mostrado cambios en la composición de los metabolitos secundarios principales, dependiendo de la temporada del año y también al sexo del árbol estudiado (Olivera *et al.*, 1999). Partiendo de la premisa que los microorganismos endófitos pudieran participar de alguna manera en la producción de los compuestos bioactivos y que estos pudieran tener variaciones estacionales, se decidió realizar dos colectas con condiciones climáticas diferentes (lluvias y sequía), buscando encontrar poblaciones distintas de microorganismos tanto en el árbol masculino como en el femenino.

Desde un inicio se decidió realizar el aislamiento de todos los microorganismos posibles con la finalidad de no perder alguno que pudiera tener potencial en la producción de compuestos bioactivos. En la estación de lluvias se lograron aislar 7 veces más endófitos fúngicos que en la época de sequía, probablemente debido a la humedad del área y la temperatura óptima para su desarrollo. Por otro lado, se aislaron 4 veces más bacterias durante la estación de secas, probablemente por la menor cantidad de hongos que permitió el desarrollo de este tipo de microorganismos. Aunque no se recolectaron hojas durante la estación seca (debido a que no había presencia de hojas en los árboles), los tallos y semillas tuvieron un número mayor de endófitos (73) que el árbol masculino (6), lo que concuerda con

el trabajo de Olivera *et al.*, 1999, donde se destaca una diferencia entre la producción de metabolitos entre árboles masculinos y femeninos, y que ahora podríamos atribuir también a la diferente colonización de endófitos en su interior. Se sabe que las hojas son uno de los lugares más colonizados por endófitos (Azevedo *et al.*, 2000), principalmente a través de los estomas (Jordaan *et al.*, 2006), y en este estudio esto se corroboró en la colecta realizada en la época de lluvias, ya que fue en estos tejidos donde se aislaron un mayor número de endófitos, siendo el árbol masculino el que mayor cantidad de microorganismos presentó (67) a comparación del femenino (32). En este estudio el análisis de las raíces no fue realizado debido a lo invasivo que puede ser ese procedimiento, siendo el cuachalalate una especie en riesgo, así como el cuidado que se le tiene en la reserva natural donde fue muestreado.

Es importante notar que la colonización por endófitos puede ser inter o intracelular y especialmente localizada debido al lugar por donde el endófito se introdujo a la planta y si este fue capaz o no, de llegar al xilema (Arora y Ramawat, 2017; Schulz y Boyle 2005), por lo que la ocurrencia del aislamiento de estos microorganismos es muy variable en los diferentes medios de cultivo y en los diversos tejidos colectados. Desde la primera colecta, el medio ISP-2 fue el que aisló el mayor número de bacterias y hongos. Se esperaba este resultado, considerando la riqueza en su composición. Sin embargo, en la segunda colecta, la distribución microbiana entre los diferentes medios de cultivo fue más homogénea y podría ser el resultado de un mayor grado de colonización de los tejidos muestreados.

En este trabajo se realizó el aislamiento de bacterias y de hongos, con la finalidad de tener un mayor número de organismos aislados y así asegurar la ocurrencia de un microorganismo productor de compuestos bioactivos, siendo siempre nuestro objetivo principal el hallazgo de una actinobacteria por su capacidad biosintética (Janso *et al.*, 2010). En ese sentido se lograron aislar cuatro actinobacterias, uno en agar nutritivo, otro en medio ISP-2 y dos más en medio Czapek, este último medio se seleccionó para el aislamiento de endófitos fúngicos, lo que sugiere que el tipo de microorganismos encontrados se basan no solo en la composición del medio de crecimiento de recuperación, sino también en la ubicación del organismo en el tejido de la planta y en la ocurrencia no sistémica de los microorganismos. Además, esto destaca la eficiencia de supervivencia de estos microbios en diferentes condiciones ambientales que, debido a sus propias características metabólicas, pueden usar una amplia variedad de nutrientes complejos, escasos y/o únicos (Nett *et al.*, 2009; Doroghazi y Metcalf 2013).

La evaluación molecular por el gen 16S rRNA identificó a NF3 como una cepa perteneciente al género *Embleya* (Figura 8), descrito recientemente por Nouioui y colaboradores (2018), quienes realizaron una reclasificación taxonómica del filo *Actinobacteria* basada en los genomas completos obtenidos al momento. En ese análisis se encontró que *Streptomyces scabrisporus*, la cepa que parecía más cercana a NF3, pertenecía a la familia Streptomycetaceae y que formaba un clado independiente de los géneros *Kitasatospora* y *Streptacidiphilus* y también se distinguía de estos dos géneros y de *Streptomyces* por diversas características fenotípicas, por lo que se propuso ser clasificadas en un nuevo género del llamado *Embleya* (en honor al británico Martin Embley por su contribución a la sistemática de las actinobacterias) y *scabrispora* (del inglés: scabby, rough) por sus esporas rugosas. Actualmente, con la reclasificación de otra estreptomiceto, *Streptomyces hyalinum* NBRC 13850 la cual tenía 99.7 % de similitud con el gen 16S rRNA de la cepa *E. scabrispora* DSM 41855 se incluyó una segunda especie a este género, *Embleya hyalina* (Komaki *et al.*, 2020).

El primer informe encontrado de *S. scabrisporus* fue el de la cepa KM-4927^T (= JCM 11712^T = NRRL B-24202^T) donde se describió a este microorganismo con un crecimiento de colonias rugosas color grisáceas formadoras de esporas, que mediante MEB, se observaban formando cadenas en espiral (Ping *et al.*, 2004) y estos mismos resultados morfológicos fueron encontrados en otra cepa aislada recientemente (Charousava *et al.*, 2017). Ambas cepas fueron aisladas de suelo y no tuvieron producción de pigmentos solubles en medio ISP-2 ni en otros medios semisólidos evaluados. Por su parte, *E. hyalina* fue descrita con hifas largas en espirales abiertos y con esporas con vellosidades no rugosas, sin imágenes publicadas al momento. Esta especie tampoco reportó pigmentos solubles en medio ISP-2 (Naganawa *et al.*, 1970). En el estudio comparativo entre *E. hyalina* NBRC 13850 y *E. scabrispora* DSM 41855 realizado por Komaki y colaboradores (2020), se distinguieron diversas características morfológicas, quimiotaxonómicas, bioquímicas y fisiológicas que caracterizan a cada cepa, como la morfología de sus esporas, la longitud de sus menaquinonas y la producción de ciertos metabolitos secundarios. También se encontró mediante hibridación DNA-DNA digital de los genomas completos, que estas cepas tienen parentesco genético de 31.2%.

La cepa NF3 por su parte, produjo pigmentos en casi todos los medios evaluados, incluido el medio ISP-2, mostrando características metabólicas diferentes a las cepas previamente aisladas. Las micrografías observadas mediante MEB mostraron a NF3 con cadenas de esporas lineales, septadas y rugosas, diferentes a las características reportadas para las especies de este género. Respecto a estudios de minería genómica, un estudio comparativo entre las cepas de *S. scabrisporus* KM-4927^T y la DSM 41855 (ambas aisladas de suelo)

mostró algunas diferencias en los genes biosintéticos de policétidos (Kudo *et al.*, 2015) y recientemente en el estudio de minería genómica de nuestra cepa (Vazquez-Hernández *et al.*, 2017) detectó 50 clústeres de genes para la producción de metabolitos secundarios, de los cuales 17 son completamente novedosos si se comparan con el genoma de la cepa DMS 41855, lo que refleja importantes diferencias metabólicas entre las diversas cepas y que la cepa NF3 pudo haber obtenido un mayor potencial biosintético al estar albergado en un espacio tan único como lo es el interior de una planta y tener funciones ecológicas como endófito dentro de ella (Kusari *et al.*, 2012). Con el genoma completo de la cepa *Embleya* sp. NF3 y utilizando los genes housekeeping *gyrB*, *rpoB* y *recG* se había corroborado la identidad del microorganismo como *E. scabrispora* (Ceapa *et al.*, 2018), sin embargo, en la última actualización del árbol filogenético utilizando la base de datos de NCBI actualizada a junio del 2020, *E. hyalina* fue la que tuvo una mayor similitud con la cepa NF3 tanto en el BLAST como en el árbol filogenético aquí presentado (49 % de Bootstrap) tomando en cuenta sólo el gen 16S rRNA.

Con respecto a la producción de metabolitos secundarios bioactivos, estudios previos mostraron a *E. scabrispora* como productor del macrólido hitachimicina (Umezawa *et al.*, 1981, Kudo *et al.*, 2015) del policétido okilactomicina (Zhang *et al.*, 2009) y del ionóforo poliéter alborixina (Manzoor *et al.*, 2016), todos ellos compuestos incoloros con actividades antibióticas y citotóxicas. Por su parte, *E. hyalina* tiene reportes de producción de nibomicina y deoxinibomicina, compuestos con actividad antibiótica (Hiramatsu *et al.*, 2012) y particularmente, esta especie no produce hitachimicina. En este sentido, el estudio de minería genómica realizado a la cepa NF3 (Ceapa *et al.*, 2018) no reportaba alguno de estos compuestos, sin embargo, un estudio actualizado a Julio del 2020, en la base de datos de Antismash (Anexo 3) utilizando el genoma de NF3, se encontró el clúster para la producción de nibomicina, con un 55% de similitud con el reportado previamente y no se encontró la presencia del clúster para la producción de hitachimicina.

Con esta información, es necesario realizar un estudio más profundo con el genoma de NF3, así como con sus características morfológicas, quimiotaxonómicas, bioquímicas y fisiológicas para poder definir la especie de esta cepa. Se encontró que NF3 produce compuestos activos, principalmente de color amarillo y rojos, nunca reportados para este género y presentó actividad antibiótica evaluada mediante estría en diferentes medios de cultivo. Se observó una gran actividad en contra de *M. luteus*, menor contra *B. subtilis* y sólo en algunos medios también contra *S. cerevisiae*, lo que convirtió en esta cepa como muy atractiva para seguirla estudiando.

Mientras tanto, en el árbol filogenético de las cepas YF4, TFC3 y TMC5 se observó que el conjunto de actinobacterias cercanas a estas cepas son un grupo muy poco definido filogenéticamente, con distancias evolutivas cortas y con diferencias mínimas con respecto al gen 16S rRNA como se observa en la Figura 9, por una parte debido a las pocas cepas reportadas para cada especie y a la nomenclatura arbitraria que han tenido a lo largo de la historia (Tamura y Hatano 2001), sin embargo, en un estudio filogenético realizado con genomas completos de diversas actinobacterias se encontró que los géneros de *Actinoplanes*, *Pseudosporangium*, *Couchioplanes* y *Krasilnikovia* no tenían suficientes diferencias a nivel genómico para considerarlas diferentes géneros, siendo la longitud de sus menaquinonas y la composición de azúcares en la pared celular, las principales diferencias entre estos organismos, las cuales también pueden modificarse durante el tiempo y condiciones del cultivo, por lo tanto sugieren que estas características sólo producen apomorfías entre los diferentes microorganismos, por los que todas ellas se reagruparon como *Actinoplanes* (Nouioui *et al.*, 2018). En este árbol se confirma este hecho ya que los bootstraps obtenidos entre estos diferentes géneros de actinobacterias son muy bajos, siendo en casos muy particulares los que presentan bootstraps altos, como es el caso de *Asanoa*, *Jishengella*, *Phytohabitans*, algunas *Micromonosporas* y algunas especies de *Actinoplanes*, como *A. friulensis*, *A. digitatis* y las cepas TFC3 y TMC5 aisladas en este trabajo, encontrándose solas en un clado con 94% de bootstrap, lo que nos da indicios de que pueden ser nuevas especies de *Actinoplanes*. Con respecto a la cepa YF4, esta cepa se encuentra colocada en un clado no definido de alguna especie ya conocida, sin embargo, al encontrarse tan cercana a los otros géneros de actinobacterias se sugiere que pertenece al género *Actinoplanes*. Finalmente, es importante resaltar el hecho de que este estudio sólo fue realizado con el gen 16S rRNA y que, la filogenia realizada con los genomas completos, o con genes housekeeping, nos ayuda a distinguir mejor las diferentes especies de este grupo de actinobacterias.

Entre los tres *Actinoplanes* aislados en este trabajo, si fue posible observar diferencias entre ellas con respecto a su color, textura, tamaño, color de pigmentos difundidos al agar y perfil antibiótico, esto mostrado en la caracterización de las actinobacterias en diferentes medios de cultivo, y también se observaron diferencias importantes en su morfología en la MEB, mostrando en algunos casos una especie de biopelícula recubriendo el micelio.

Existen algunos informes sobre moléculas bioactivas producidas por diferentes cepas de *Actinoplanes* como la teicoplanina, un antibiótico glicopeptídico (Heydorn *et al.*, 1999), la acarbosa que es un inhibidor de la alfa-glucosidasa, utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Schwientek *et al.*, 2012), quitinasa y algunos compuestos antifúngicos (El-

Tarabily, 2003), entre otros. Con respecto a los *Actinoplanes* más cercanos filogenéticamente con las cepas aquí aisladas, se encontró que la cepa N902-109 era capaz de producir fluorometabolitos mediante un estudio *in silico* (Deng *et al.*, 2014) y rapamicina (He *et al.*, 2015 y He *et al.*, 2018). De las tres cepas la TFC3 fue la que tuvo una mayor actividad antibiótica, principalmente contra *M. luteus* y con el medio Seino contra *S. cerevisiae*, resultado atractivo por ser un microorganismo eucarionte. El análisis de minería genómica de esta cepa predijo la presencia de 16 clústeres de genes que codifican enzimas para la biosíntesis de metabolitos secundarios, incluyendo bacteriocinas, policétidos sintetasas tipo 1 y 3 y péptido sintetasas no ribosomales (Centeno-Leija *et al.*, 2016), lo que hace a esta cepa interesante en la búsqueda de compuestos bioactivos novedosos.

Con los resultados obtenidos en la evaluación de las actinobacterias con diferentes medios de cultivo, se realizó un ensayo preliminar de actividad citotóxica utilizando los sobrenadantes de la fermentación de las actinobacterias crecidas en los medios de cultivo en los cuales se observó actividad antibiótica en medio semisólido, recordando que en muchos casos la actividad antibiótica puede estar asociada también con actividad citotóxica, dependiendo de su mecanismo de acción (Takeuchi, 1995). Se encontró que tanto el medio Seino como el NDMV causaban interferencia en el ensayo citotóxico, pudiendo mostrar falsos positivos, mientras que en el medio ISP-2 todas las actinobacterias crecían bien y no había interferencia, incluso el medio por sí sólo provocaba una mayor proliferación en las células MCF-7, por lo que se decidió utilizar este medio para evaluar todos los sobrenadantes de las actinobacterias ahora extrayendo de forma química los metabolitos secundarios, prestando mayor atención a la cepa NF3 la cual mostró una alta actividad citotóxica en esta evaluación preliminar. Se realizaron las cinéticas de crecimiento de las cuatro cepas para conocer el comportamiento de los cultivos en medio líquido y elegir un día en la cinética en que las cuatro cepas se encontraran en fase estacionaria para asegurar la producción de metabolitos secundarios, eligiendo el día 8 para todas las cepas.

Los resultados mostraron la más alta actividad antibiótica mediante MIC y también la mayor citotoxicidad en los extractos orgánicos de la cepa *Embleya* sp. NF3, por lo que se eligió a esta como la candidata idónea para la búsqueda de metabolitos secundarios activos para ser evaluados en diversas líneas celulares. Aunado a esto, los perfiles químicos de los extractos orgánicos mostraron la presencia un compuesto mayoritario color amarillo poco polar no reportado anteriormente para esta actinobacteria. Los tres *Actinoplanes* presentaron perfiles químicos mucho más complejos, sin algún compuesto químico mayoritario aparente.

Mediante una CCF preparativa del extracto orgánico se corroboró la presencia de más de un compuesto químico activo y que estos eran de variada polaridad, así que en la fermentación en biorreactor se buscó en todo momento obtener el perfil químico observado anteriormente en el matraz agitado. Para encontrar las condiciones de operación en el biorreactor se buscó algún trabajo previo con esta cepa (Umezawa *et al.*, 1981); sin embargo, en evaluaciones del perfil químico por CCF no se encontraron los compuestos monitoreados. Se observó que la agitación y la aireación eran factores importantes para la generación de agregados celulares, que parecían tener correspondencia con la producción de los metabolitos buscados, por lo que se ajustaron estos parámetros hasta lograr obtener el perfil químico buscado (Figura 17).

Con el acetato de etilo fue posible extraer el perfil químico buscado, tanto en biomasa como en sobrenadante, corroborando su actividad citotóxica, y mediante el ensayo biodirigido fue posible seleccionar las fracciones primarias que fueran más activas, con un perfil químico sencillo y que tuvieran una cantidad razonable para lograr la purificación de al menos un compuesto.

Utilizando los diversos análisis espectroscópicos y espectrométricos fue posible la elucidación química de 8 compuestos químicos siendo 6 de estos completamente purificados y su actividad citotóxica fue evaluada. Las señales del espectro IR cercanas a la zona de 1672 y 1620 cm^{-1} y del espectro UV cercanas a 214 y 439 nm son muy características del sistema 1,8-dihidroxi-antraquinona (Kelly *et al.*, 1977) lo que ayudó a la aproximación del tipo de estructuras químicas, mismas que resultaron pertenecer a la familia de las antraciclina, específicamente de estefimicinas y estefimicinonas, compuestos de los cuales se tienen estudios desde 1967 como se describió previamente. Es importante recalcar que este grupo de compuestos no había sido descrito para el género *Embleya* con anterioridad, por lo que este trabajo es el primero en hacerlo, sin embargo, en el estudio comparativo del genoma de la cepa NF3 y la cepa de *E. scabrispora* DSM 41855 (Vazquez-Hernández *et al.*, 2017), se encontró presente el clúster biosintético para estos compuestos, lo que nos sugiere que el estatus de NF3 de endófito pudo provocar que este clúster estuviera activo.

Se identificó al compuesto químico mayoritario **1** como StefB, molécula previamente encontrada como producto natural y de la cual se tienen diversos estudios respecto a su actividad contra bacterias Gram-positivas (Brodsky y Reusser, 1974), incluyendo *M. tuberculosis* (Intaraudom *et al.*, 2015; Trenado-Uribe *et al.*, 2018), así como con actividades citotóxicas contra células de leucemia de ratón y otras líneas celulares descritas previamente

(Brodasky y Reusser, 1974; Intaraudom *et al.*, 2015). El compuesto **2** se identificó como StefC (Brodasky y Mízsak, 1985), que fue aislada de las aguas madres de la StefB y sus estudios de actividad antibiótica lo muestran con menor actividad que la StefB salvo contra *Streptococcus pneumoniae* UC[®]-41. Finalmente, las estefimicinas identificadas como 8-demetoxiestefimicina B (**3**) y la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicina B (**4**) resultaron ser nuevos productos naturales.

Con respecto a las estefimicinonas, el compuesto **5** se identificó como 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona, compuesto que había sido descrito por Gullón y colaboradores (2006) como parte de la ruta metabólica de la biosíntesis de la Stef, en donde a partir de la 2-O-demetil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona y mediante la O-metiltransferasa StfMI, se encontró la 8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona cuando se realizó la expresión heteróloga del clúster de la Stef en *S. albus*; sin embargo este es el primer trabajo en el que se encuentra este compuesto como producto natural. El compuesto **7a** que fue identificado como 7-deoxiestefimicinona, ha sido aislado previamente como producto natural (Intaraudom *et al.*, 2015) y también obtenido mediante modificaciones químicas de la Stef y la StefB (Kelly, 1976), así como mediante la participación de una enzima aislada de *Aeromonas hydrophila* dependiente de NADH para romper el enlace del glucosídico unido a la Stef (McCarville y Marshall, 1977). En estos trabajos se ha evaluado su actividad antibiótica y citotóxica, siendo ésta siempre menor que la que presenta la StefB, aun cuando se han realizado acilaciones en los C-4 y C-6 para mejorar la solubilidad de los compuestos. El compuesto **7b** identificado como 7-deoxi-10 deoxiestefimicinona es un producto natural nuevo, del cual no se encontraron trabajos previos al igual que el **6** identificado como la 7-deoxi-8-demetoxiestefimicinona, los cuales son aportaciones valiosas de este trabajo.

En la Figura 5 se muestra la fórmula química base de las estefimicinas, marcadas como “R” los radicales que cambian entre las diferentes moléculas, y en el Anexo 1 se muestra un resumen de las estefimicinas y estefimicinonas descritas a la fecha, incluyendo las moléculas nuevas encontradas en este trabajo.

La ocurrencia de estos compuestos en la fermentación de *Embleya* sp. NF3, comparada con la ruta de biosíntesis de la estefimicina expresada heterológamente en *S. albus* y propuesta por Gullón y colaboradores (2006), muestra que las enzimas StfMIII (metilesterasa), que se propuso adicionaba el metoxilo del C-8, la StfPI/E (monooxigenasa/deshidrogenasa), que adiciona el grupo carbonilo al C-10, y la StfG/PII (glicosiltransferasa/citocromo P450), que adiciona el residuo de ramnosa, participan de una forma no ordenada en la biosíntesis de la StefB, ya que son estas las modificaciones que se observan, tanto en los compuestos

conocidos, como en los nuevos productos naturales identificados; sin embargo, podríamos proponer que en esta cepa las metilaciones de la ramnosa en los carbonos C-2' y C-4' son generadas antes de unirse a la aglicona, ya que en todas las estefimicinas encontradas los grupos metoxilo de estas posiciones están presentes, y esta parte de la ruta de biosíntesis de la Stef, propuesta por Gullón, no fue encontrada dentro del clúster del compuesto. Otros estudios de biosíntesis de la StefB mostraron que la ramnosa provenía de glucosas metiladas a partir de metionina (Wiley *et al.*, 1978) y en un estudio de los clústeres de genes biosintéticos presentes en el genoma de NF3 (Ceapa *et al.*, 2018), se detectó el clúster biosintético de la estefimicina y mediante un análisis comparativo de estos en la base de datos de Antismash (Anexo 3), se detectó que el clúster presente en la cepa NF3 tiene 63% de similitud con el de la estefimicina D reportado por Gullón y colaboradores (2006), sin embargo las diferencias principales no parecen estar relacionadas a la síntesis del compuesto (datos no mostrados). En la Figura 50 se muestra una propuesta de la ruta de biosíntesis de la StefB en *Embleya sp.* NF3 basada únicamente en los compuestos químicos identificados en este trabajo, donde se puede inferir que el producto final de la ruta de biosíntesis es la StefB, debido a que es el compuesto mayoritario del extracto orgánico de la cepa y probablemente las moléculas que se encontraron como nuevos productos naturales en este trabajo, podrían estar presentes en otras cepas; sin embargo, su presencia es transitoria y en tan pocas cantidades, que es difícil localizarlas.

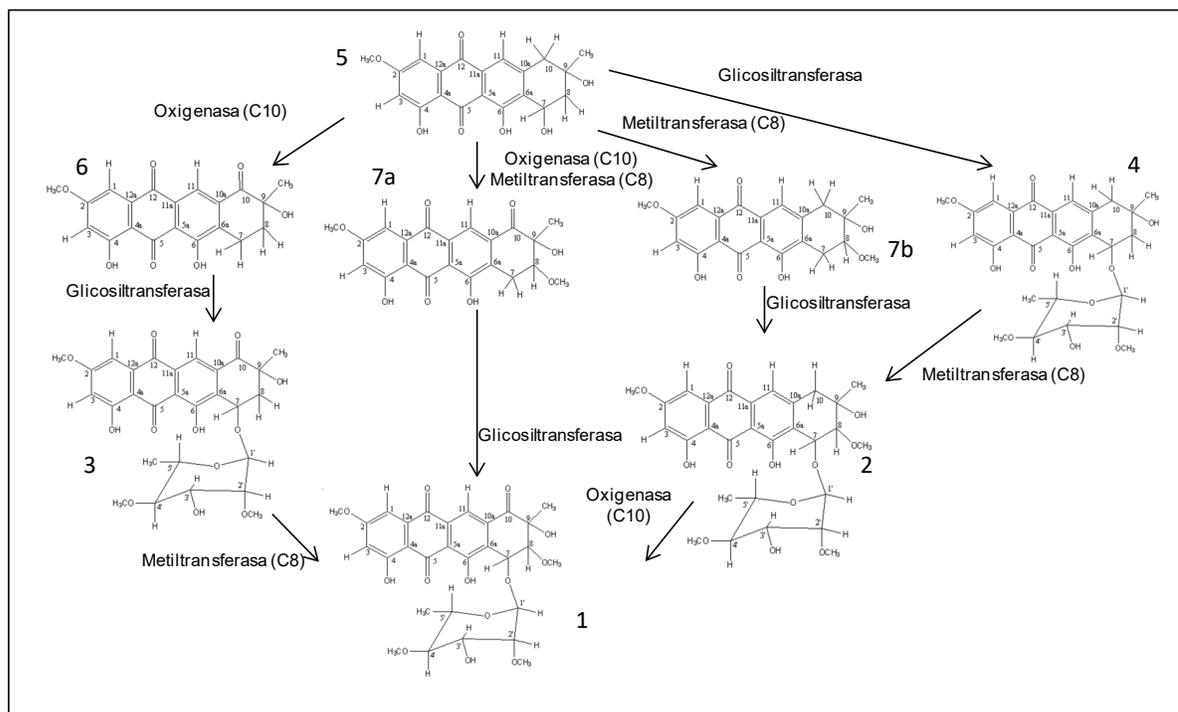


Figura 50. Propuesta de parte de la ruta metabólica de la *StefB* en *Embleya sp. NF3* basada en los compuestos químicos identificados.

Con respecto al mecanismo de acción de las antraciclinas, se conoce que estas mantienen su rigidez conformacional cuando están unidas al DNA; sin embargo, existen ciertas flexibilidades limitadas, sobre todo en el C7 del anillo A con la unión del glicósido, y entre los anillos B y D que se doblan suavemente. Se sabe que los cromóforos de las agliconas de las antraciclinas se intercalan entre el par de bases GC con el dinucleótido CpG y que el glicósido sale de entre los surcos de la doble hélice de DNA. Puentes de hidrógeno se encuentran en el complejo entre el compuesto y las bases de guanina para anclar la molécula en una orientación determinada.

Específicamente con la *Stef*, se encontró que esta inhibía la síntesis de DNA al unirse a la doble cadena (Reusser, 1967). Posteriormente, se realizó un modelado *in silico* de su unión al DNA donde se observó que la *Stef* tenía una mayor especificidad con CpG que con TpA, al igual que la daunorubicina y la nogalamicina (Sriram *et al.*, 1991). Se observaron 3 puentes de hidrógeno que unen a la *Stef* con el DNA: el oxígeno del metoxilo del C-8 de la *Stef* recibe un enlace de hidrógeno del grupo amino de un residuo de guanina, la guanina dona un puente de hidrógeno al oxígeno del C-7 y el oxígeno del C-3' del azúcar con una timina. En ese sentido y observando los resultados de actividad contra la línea celular MCF-7 evaluadas en este trabajo, mediante citometría de flujo (Figura 46), se observó que aquellas estefimicinas que no tienen el grupo metoxilo en el C-8 tuvieron una mayor cantidad de células vivas (Compuestos **3**, **4**, **5** y **6**), respecto a las moléculas que si lo presentan, la *Stef B* (**1**) y la *Stef C* (**2**), las cuales mostraron un mayor número de células apoptóticas y necróticas, teniendo como única diferencia entre estas dos moléculas, la posición C-10, donde la *StefB* tiene el grupo carboxilo y la *StefC* un grupo metileno. En ese sentido, el grupo carboxilo de la *StefB* podría estar proporcionando una mayor polaridad a la molécula, lo que probablemente provocaría que esta pudiera intercalarse mejor a la doble cadena de ADN.

Durante las diferentes determinaciones de citotoxicidad de las estefimicinas y estefimicinonas se tuvieron diversos retos principalmente por su poca solubilidad, ya que pasado un corto tiempo de contacto del compuesto en el medio de cultivo de las células evaluadas (media hora aproximadamente), se empezaban a detectar microcristales de los compuestos químicos, lo que provocó que la concentración y el tiempo de contacto de estas fuera menor, y como era de esperar, se encontró que todas las estefimicinonas evaluadas tuvieron baja actividad. Otro factor determinante es la ausencia del glicósido, esencial para el intercalamiento de la molécula en el DNA y para la solubilidad del compuesto. La

desagregación de células de la monocapa en las cajas de cultivo y la propia coloración de los compuestos fueron factores que también afectaron las determinaciones de citotoxicidad por el método colorimétrico establecido desde el inicio del trabajo. Por ese motivo y para conocer mejor el estado fisiológico de las células, así como el mecanismo de acción de los compuestos purificados, se decidió evaluarlos mediante dos métodos, el colorimétrico utilizando la sal de formazán WST-8 (Figura 44), que cuantifica la actividad metabólica de las células y a partir de la cual se calculó el número de células vivas, y la citometría de flujo, que determina el estado fisiológico de las células individualmente (Figura 46). Se utilizó una concentración a la cual no había proliferación de las células MCF-7 tratadas con StefB, es decir, el número de células obtenido después del tratamiento era el mismo que el que se había colocado al inicio del análisis (6.25 $\mu\text{g/mL}$), lo que indicaba una alteración en su ciclo celular, que podía ser provocado por una disminución en la actividad biológica de las células o arresto celular, o debido a la muerte de algunas de ellas y la multiplicación de otras, llegando a un número igual al colocado al inicio. Los resultados de ambos análisis mostraron algunas discrepancias sobre todo con respecto al compuesto **2** que parece tener mayor actividad en el estudio de citometría de flujo, y no tener diferencia significativa con el control, en la evaluación de viabilidad. Por su parte, el compuesto **4** presentó una ligera actividad en la evaluación de viabilidad, no observada en la citometría de flujo. Ambos resultados no se pueden correlacionar completamente debido a que la prueba con la sal de formazán evalúa actividad metabólica, la cual puede depender también del estado en el que se encuentren las células y no solo si están vivas o muertas, aunado a que la coloración de los compuestos podía interferir en los resultados obtenidos, y pensamos que la citometría de flujo nos puede dar datos más certeros con respecto al estado de las células tratadas. También se observaron valores bajos de apoptosis y un mayor número de células necróticas en algunos casos, por lo que en futuras evaluaciones sería importante disminuir el tiempo de contacto para así corroborar que estas células necróticas pasaron previamente por un estado de apoptosis, evaluación que no se realizó en este trabajo debido a la poca cantidad de compuestos puros.

Por su parte, la doxorrubicina mostró menor actividad que la StefB (**1**) en el ensayo colorimétrico (Figura 44), sin embargo, también se observó que la coloración de los compuestos interfería en este resultado, por lo que al evaluar la actividad mediante citometría de flujo (Figura 46), un ensayo mucho más certero, se encontró un menor número de células vivas con este compuesto. Esto es atribuido principalmente a su muy alta solubilidad en el medio acuoso, lo que genera un contacto constante del compuesto con las células a tratar, y a la presencia en su estructura de un residuo amino-deoxiazúcar, que se sabe juega un rol

importante en las actividades antitumorales, interactuando con el surco menor de DNA y la topoisomerasa II en un complejo ternario (Zunino *et al.*, 2001). De hecho, las interacciones del complejo ternario mediadas por el azúcar y por el cuarto anillo de la antraciclina son más determinantes para la potencia antitumoral que la porción de la antraquinona de la mayoría de las antraciclinas. En el estudio realizado por Olano y colaboradores (2008) realizaron modificaciones en el residuo del azúcar para modificar las propiedades de solubilidad y actividad de las estefimicinas, encontrando entre las diferentes moléculas que generaron, que la metilación del grupo hidroxilo en la posición C-3' de la 2'-O-metil-L-ramnosa aumentó en gran medida la actividad de la Stef (3'-O-metilestefimicina) y la presencia de la D-digitoxosa representó el cambio con mayor actividad, formando el compuesto D-digitoxosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina donde el aumento de la actividad se atribuyó principalmente a la ausencia del grupo metoxilo del C-8 y el grupo ceto del C-10, lo que es soportado por la observación de que otras antraciclinas altamente activas como la daunorubicina, la doxorubicina y la epirubicina no tienen el 8-metoxilo ni el grupo ceto en C-10 y que el azúcar D-digitoxosa tuvo gran responsabilidad en esa actividad, ya que al utilizar la L-digitoxosa su actividad fue mucho menor. En ese sentido, podríamos sugerir que los puentes de hidrógeno que se determinaron para la Stef donde el oxígeno del C-8 era necesario para la unión a DNA, en el caso de la D-digitoxosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina debiera intercalarse de distinta manera en el DNA, lo cual provoca el aumento en la actividad, como es el caso de las otras antraciclinas mencionadas.

Al evaluar el desempeño de la StefB en las diferentes líneas celulares (Cuadro 15), incluyendo las células de cáncer de mama triple negativas, se encontró que los valores de CI_{50} sobre todo en las líneas MCF-7, HCC1806, HCC70 y la DU4475 fue muy buena, aunque nunca mejor que la doxorubicina; sin embargo, un hallazgo importante fue el hecho de encontrar que contra la línea de queratinocitos no cancerosa HaCaT, la doxorubicina fue treinta veces más activa que la StefB, mostrando que la StefB puede llegar a ser menos dañina para las células no cancerosas. Importante resaltar la actividad que tuvo la StefB contra la línea HCC1806, que es triple negativa, y -p53, recordando que en estudios previos se había encontrado que la Stef era más activa con líneas que tuvieran como vía para llegar a la apoptosis la proteína p53 (Erdal *et al.*, 2004). Sin embargo, la StefB también presentó actividad con la línea -p53 HCC1806, lo que nos indicaría un mecanismo de acción diferente o complementario. Otra característica importante en la actividad de la StefB fue que provocaba cambios morfológicos en las células MCF-7 aun cuando su tiempo de contacto era menor que el de la doxorubicina. Las células tratadas con StefB perdían su capacidad de adherirse a la

superficie y a generar agregados celulares, esa diferencia, muy notoria entre el comportamiento de las dos antraciclinas, puede sugerir también que el mecanismo de acción de ambos compuestos es distinto. Cambios morfológicos también se habían observado previamente para la 2dm-StefD, modificando la morfología de las células rasNRK a concentraciones mayores del valor de CI_{50} , sin embargo, no modificaba la morfología de las células NRK (sin oncogen) incluso a concentraciones de inhibición completa de crecimiento. Estos cambios morfológicos no se observaron en las otras antraciclinas estudiadas (Suzukake-Tsuchiya *et al.*, 1990).

En la citometría de flujo de la StefB evaluada a la concentración del valor de CI_{50} en células MCF-7, el cual fue obtenido mediante el método colorimétrico, se observó que, al aumentar el tiempo de contacto del compuesto, la cantidad de células vivas disminuía de 90.6% a las 12h, hasta 84.5% a las 48 h, y los valores de apoptosis temprana, tardía y necrosis aumentaban con respecto al tiempo. Sin embargo, los valores no fueron tan altos como se esperaba, lo que pudo ser debido a los problemas de solubilidad del compuesto y a las diferencias entre los dos métodos ya mencionados. Mediante western blot se detectó que, efectivamente, la proliferación celular, medida por la expresión del gen PCNA, también disminuía con respecto al tiempo de contacto. Estos resultados concuerdan con un estudio que buscaba compuestos antitumorales que fueran independientes de la proteína p53 para provocar apoptosis, la cual se sabe que contribuye a la resistencia a algunos de los agentes terapéuticos más utilizados. Ahí se evaluó a la Stef, encontrando que este compuesto provocaba apoptosis y daño en el DNA, generando rompimiento de la doble hebra, esto en células de cáncer de colon HCT116, evaluando la apoptosis mediante la escisión de la citoqueratina 18 inducida por caspasas (Erdal *et al.*, 2004).

9. Conclusiones

La búsqueda de microorganismos endófitos bioactivos en la planta de uso medicinal *A. adstringens* permitió el aislamiento de diversos organismos, siendo cuatro de ellos actinobacterias, una clase de bacterias de las cuales se conoce un alto potencial para producción de compuestos bioactivos. Tres de ellos pertenecen al género *Actinoplanes* los cuales tienen una gran maquinaria metabólica para producir compuestos químicos novedosos que deben ser explorados por diversas herramientas biotecnológicas. En el caso de la cepa *Embleya* sp. NF3, esta resultó tener la más alta actividad citotóxica en el ensayo biodirigido realizado. De esta especie se aislaron 8 metabolitos, siendo 4 de ellos productos novedosos.

Todos los compuestos identificados pertenecieron a la familia de las estefimicinas y estefimicinonas, las cuales tuvieron diferente potencial citotóxico en células de cáncer de mama MCF-7, observando que el metoxilo del C-8 de las estefimicinas es importante para su actividad. Por su parte, las estefimicinonas tuvieron baja actividad debido a la ausencia del residuo del azúcar que no permite el intercalamiento de la molécula con el DNA aunado a que son compuestos muy poco polares que difícilmente tienen contacto con las células tratadas.

La StefB resultó ser el compuesto mayoritario y tuvo actividad con diversas líneas celulares, incluyendo células de cáncer de mama triple negativas y -p53, las cuales generalmente presentan resistencia a diferentes fármacos. Este metabolito provocó apoptosis en las células MCF-7 que aumentó con respecto al tiempo de contacto de las células con el fármaco, y mediante el seguimiento de la expresión del gen PCNA se observó que la StefB provocaba una disminución de la proliferación celular y que esta aumentaba con respecto al tiempo de contacto. Finalmente, se observaron cambios morfológicos en los cultivos celulares tratados con StefB, como la desagregación de las células, la pérdida de adherencia al soporte y su presencia en forma esférica, modificaciones que no se observaron con la doxorubicina, lo que nos indica que existe un mecanismo de acción diferente que debiera ser evaluado.

10. Perspectivas

Con los resultados obtenidos en este trabajo se dejan abiertas diferentes puertas para iniciar nuevas rutas de investigación.

Primeramente, se tiene el aislamiento de 165 hongos endófitos y 98 bacterias las cuales pueden tener un gran potencial biosintético debido a su cualidad de endófito y que en este trabajo no fueron evaluadas a fondo, debido a la ocurrencia de las cuatro actinobacterias.

Los tres *Actinoplanes* identificados parecen ser nuevas especies que, aunque en este trabajo no mostraron actividades citotóxicas importantes, se sabe del gran potencial biosintético que poseen y que puede ser explotado por diferentes herramientas biotecnológicas.

Estudios preliminares mostraron que en los sobrenadantes de los tres *Actinoplanes* podría haber polisacáridos con actividad citotóxica, lo cual merece nuestra atención para posibles estudios.

Con respecto al *Actinoplanes* TFC3, la secuenciación de su genoma ya fue realizada en nuestro grupo de trabajo y actualmente se encuentran realizando la expresión heteróloga de diversos clústeres de metabolitos secundarios.

El genoma de la cepa NF3 de *Embleya* sp. también fue secuenciado en nuestro grupo de trabajo, donde se ha encontrado una gran diferencia con respecto a las otras cepas reportadas para este género. La expresión heteróloga de diversos metabolitos secundarios está siendo realizada.

Es necesario realizar un estudio a profundidad para poder definir claramente la especie de *Embleya* sp. NF3.

También se han realizado estudios de interacción planta-microorganismo con la cepa NF3 para confirmar su papel como endófito y sus posibles beneficios.

Respecto a las estefimicinas, se siguen realizando pruebas de actividad contra diferentes organismos, como cepas de *M. tuberculosis* patógenas y en algunos casos resistentes a fármacos, pruebas contra virus, etc.

La falta de solubilidad de las estefimicinas es un foco de atención, ya que, al ser un compuesto con actividad potencial para su uso farmacéutico y menos tóxico en células no

cancerosas, sería importante trabajar en métodos que ayuden a tener más disponible y soluble el metabolito y facilitar su acción citotóxica. Se empezaron a realizar algunas pruebas para mejorar su solubilización con ciclodextrinas.

Aunque se pudo concluir que la StefB provoca apoptosis en las células, el mecanismo por el cual cambia su morfología, pierden la adherencia y la capacidad de formar agregados, queda inconclusa, por lo que su estudio resulta de interés.

Finalmente, debido a que ya se cuenta con el genoma completo de la cepa NF3, sería interesante comparar a detalle los clústeres biosintéticos de la StefB, con respecto al clúster previamente descrito de la Stef para distinguir diferencias en la ruta biosintética y proponer la ruta más completa.

11. Bibliografía

Akshatha V., Nalini M., D'Souza C., Prakash H. (2013). Streptomyces endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake. *Letters in Applied Microbiology* 58: 433–439.

Alcántara-Flores E., Brechú-Franco A., García-López P., Rocha-Zavaleta L., López-Marure R., Martínez-Vázquez M. (2015). Argentin B Inhibits proliferation of prostate and colon cancer cells by inducing cell senescence. *Molecules* 20(12): 21125-21137.

Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389–3402.

Ara I., Matsumoto A., Bakir M., Kudo T., Ömura S, Takahashi Y. (2008). *Pseudosporangium ferrugineum* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1644–1652.

Arora S. (1985). Molecular structure, stereochemistry and interactions of steffimycin B, and DNA binding anthracycline antibiotic. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 3(2): 377-385.

Arora J., Ramawat K. (2017). An Introduction of endophytes. En: *Endophytes: biology and biotechnology*, Volume 1. 1a Edición. Ed. Springer International Publishing. Eds. Maheshwari D. pags. 1-23.

Azevedo J., Maccheroni W., Pereira J., Luiz de Araujo W. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40–65.

Aziz R., Bartels D., Best A., DeJongh M., Disz T., Edward R., Formsma K., Gerdes S., *et al.* (2008). The RAST server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9(75) 1-15.

Bailly C. (2009). Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology* 77: 1447-1457.

Bergy M., Reusser F. (1967). A new antibacterial agent (U-20,661) isolated from a Streptomyces strain. *Experientia* 15(4): 254-255.

Bertheau P., Plassa F., Espié M., Turpin E., de Roquancourt A., Marty M., Lerebours F., Beuzard Y., Janin A., de Thé H. (2002). Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy. *The Lancet* 360: 852-854.

Bérdy J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics* 65(8): 385-395.

Beroud C., Soussi T. (1998). p53 gene mutation: Software and database. *Nucleic Acids Research* 26(1): 200–204.

Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293–300.

Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi C, Capranico G, Animati F. (2001). Anthracyclines: selected new developments. *Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents* 1(2): 113–130.

Bozzola J., Russell L. (1998). *Electron Microscopy, principles and techniques for biologists*, 2a Edición. Ed. Jones and Burtlett Publishers.

Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F., Sessitsch A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30–37.

Brodasky T., Reusser F. (1974). Steffimycin B, a new member of the steffimycin family: Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* 27(11): 809-813.

Brodasky T., Mizsak S. (1985). Steffimycin C, a new member of the steffimycin anthracyclines, Isolation and structural characterization. *The Journal of Antibiotics* 38(7): 849-855.

Cankar K., Kraigher H., Ravnikar M., Rupnik M. (2005). Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiology Letters* 244: 341–345.

Ceapa C., Vázquez-Hernández M., Rodríguez-Luna S., Cruz-Vázquez A., Jiménez-Suárez V., Rodríguez-Sanoja R., Alvarez-Buylla E., Sánchez S. (2018). Genome mining of *Streptomyces scabrisporus* NF3 reveals symbiotic features including genes related to plant interactions. *PLoS One*. 13(2): 1-27.

Centeno-Leija S., Vinuesa P., Rodríguez-Peña K., Trenado-Urbe M., Cárdenas-Conejo Y., Serrano-Posada H., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. (2016). Draft genome sequence of an endophytic *Actinoplanes* species, encoding uncommon *trans*-Acyltransferase polyketide synthases. *Genome Announcements* 4(2): 1-2.

Chandra S. (2012). Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 47-59.

Chen L., Zhang Q., Jia M., Ming Q., Yue W., Rahman K., Qin L., Han T. (2014). Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Critical Reviews in Microbiology* 7828: 1–20.

Chen Y., Yuan Q., Shan L., Lin M., Cheng D., Li C. (2013). Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus*. *Oncology Letters* 5: 1787–1792.

Charousová I., Medo J., Halenářová E., Javoreková S. (2017). Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 8(2): 46-51.

Colegate S., Molyneus R. (2007). An Introduction and Overview. En: *Bioactive Natural Products, detection, isolation and structural determination*. 2da Edición. Ed. CRC Press. Eds. Colegate S. y Molyneux pags.1-10.

Cragg G., Newman D. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry* 77: 7–24.

Cragg G., Grothaus P., Newman D. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews* 109(7): 3012–3043.

Cragg G., Grothaus P., Newman D. (2012) Natural products in drug discovery: Recent advances. En: *Plant bioactivities and drug discovery: Principles, practice, and perspectives*. 4ta Edición. Ed. Hohn Wiley & Sons. Eds. Cechinel-Filho V. pags. 1-42.

Cuevas X. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *Ibugana Boletín del Instituto de Biología* 13(1): 27-48.

De Almeida L., Leitão A., Barrett L., Montanari C., Donnici C., Paz M. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. *Química Nova* 28(1): 118-129.

Dekleva M., Trrus J., Strohl W. (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 287–294.

Del Bufalo D., Biroccio A., Soddu S., Laudonio N., D'Angelo C., Sacchi A., Zupi G. (1996). Lonidamine induces apoptosis in drug-resistant cells independently of the p53 gene. *The Journal of clinical investigation*. 98: 1165–1173.

Deng H., Ma L., Bandaranayaka N., Qin Z., Mann G., Kyeremeh K., Yu Y., Shepherd T., Naismith J., O'Hagan D. (2014) Identification of fluorinases from *Streptomyces* sp MA37, *Nocardia brasiliensis*, and *Actinoplanes* sp. N902-109 by genome mining. *Chembiochem Communications* 15: 364–368.

Ding L., Maier A., Fiebig H., Lin W., Hertweck C. (2011). A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Organic & Biomolecular Chemistry* 9: 4029–4031.

Doroghazi J., Metcalf W. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* 14(611): 1-13.

El-Tarabily K. (2003) An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. *Australian Journal of Botany* 51: 257–266.

Erdal H., Berndtsson M., Castro J., Brunk U., Shoshan M., Linder S. (2004). Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *PNAS* 102(1): 192-197.

Flores-Bustamante Z., Rivera-Orduña F., Martínez-Cárdenas A., Flores-Cotera L. (2010) Microbial paclitaxel: advances and perspectives. *The Journal of Antibiotics* 63: 460–467.

Gasco M., Crook T. (2003). p53 family members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know. *Drug Resistance Updates* 6: 323–328.

Genilloud O. (2014). The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106: 173–88.

Gewirtz D. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 57:727–741.

Golinska P., Wypij M., Agarkar G., Rathod D., Dahm H., Rai M. (2015) Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek* 108: 267-289.

Gravitz H. (2012) Turning a new phage. *Nature Medicine* 18(9): 1318-1320.

Grein A. (1987). Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Advances in Applied Microbiology* 32: 203–214.

Gullón S., Olano G., Abdelfattah M., Braña A., Rohr J., Méndez C., Salas J. (2006). Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster of the antitumor anthracycline steffimycin. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6):4172-4183.

Guzmán-Trampe S., Rodríguez-Peña K., Espinosa-Gómez A., Sánchez-Fernández R., Macías-Rubalcava M., Flores-Cotera L., Sánchez S. (2015). Endophytes as a potential source of new antibiotics En: *Current Innovations and Future Trends*. 1a Edición. Ed. Caister Academic Press. Eds. Sánchez S. and Demain A. pags. 175-204.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahafee W., Kloepper J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43(10): 895-914.

Hamilton G., Baskett T., (2000). History of Anesthesia. In the arms of Morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian Journal of Anesthesia* 47(4): 367–374.

Hardoim P., Overbeek L., Berg G., Pirttilä A., Company S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79(3): 294-320.

He H., Shuang-Xi R., Sheng Y., Hai-Feng H. (2015). Comparative analysis of rapamycin biosynthesis clusters between *Actinoplanes* sp. N902-109 and *Streptomyces hycroscopicus* ATCC29253. *Chinese Journal of Natural Medicine* 13(2): 90-98.

He H., Ping G., Qi Z., Hai-Feng H. (2018). Construction of a mutant of *Actinoplanes* sp. N902-109 that produces a new rapamycin analog. *Chinese Journal of Natural Medicines* 16(3): 210-218.

Heydorn A., Suhr-Jessen T., Nielsen J. (1999). Growth and production kinetics of a teicoplanin producing strain of *Actinoplanes teichomyceticus*. *The Journal of Antibiotics* 52(1): 40-44.

Hiramatsu K., Igarashi M., Morimoto Y., Baba T., Umekita M., Akamatsu Y. (2012) Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39: 478-485.

Hobbs G., Frazer C., Gardner D., Cullum J., Oliver S. (1989) Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31: 272–277.

Hopwood D. (1967) Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriological Reviews* 31(4): 373–403.

Hyde K., Soyong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163–173.

IMI (2020). <https://www.imi.europa.eu/projects-results/success-stories-projects>

INEGI. (2017). Pagina web:

<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>

Intaraudom C, Bunbamrung N, Dramaee A, Danwisetkanjana K, Rachtawee P, Pittayakhajonwut P (2015) Antimalarial and antimycobacterial agents from *Streptomyces* sp BCC27095. *Tetrahedron Letters* 56: 6875-6877.

Janso J., Carter G. (2010). Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13): 4377–4386.

Jordaan A., Taylor J., Rossenkhan R. (2006). Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. *South African Journal of Botany* 72: 245–255.

Joseph B., Priya R. (2011). Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1(3): 291-309.

Kandel S., Joubert P., Doty S. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5(77):1-26.

Keller-Schierlein W., Sauerbier, J., Vogler, U., Zähler H. (1970). Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen—Aranciamycin. *Helvetica Chimica Acta* 53(4): 779-789.

Kelly R. (1976). Steffimycinone, 7-deoxysteffimycinone and derivatives. United States Patent 3,976,667.

Kelly R., Schletter I., Koert J., MacKellar F., Wiley P. (1977). Structures of steffimycin and steffimycin B. *The Journal of Organic Chemistry* 42(22): 3591-3596.

Kharwar R., Mishra A., Gond S., Stierle A., Stierle D. (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports* 28: 1208-1228.

Kontro M., Lignell U., Hirvonen M., Nevalainen A. (2005) pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Letters in Applied Microbiology* 41: 32-38.

Koyama N., Shigeno S., Kanamoto A., Tomoda H. (2020). Steffimycin E, a new anti-mycobacterial agent against *Mycobacterium avium* complex, produced by *Streptomyces* sp. OPMA02852. *The Journal of Antibiotics* 73: 581-584.

Kudo F., Kawamura K., Uchino A., Miyanaga A., Numakura M., Takayanagi R., Eguchi T. (2015) Genome mining of the hitachimycin biosynthetic gene cluster: involvement of a phenylalanine-2,3-aminomutase in biosynthesis. *Chembiochem Communications* 16: 909–914.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547-1549.

Kunnari T., Tuikkanen J., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K., Mäntsälä P. (1997). Isolation and characterization of 8-demethoxy steffimycins and generation of 2,8-demethoxy steffimycins in *Streptomyces steffisburgensis* by the nogalamycin biosynthesis genes. *The Journal of Antibiotics* 50(6): 496-501.

Kuroda J., Kimura S., Segawa H., Sato K., Matsumoto S., Nogawa M., Yuasa T., Kobayashi Y., Yoshikawa T., Ottmann O., Maekawa T. (2004). p53-independent anti-tumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid. *Cancer Science* 95(2): 186–192.

Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology* 19: 792–798.

Lage M, Helbach H, Dietel M, and Schadendorf D. (2000). Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *British Journal of Cancer* 82(2): 488–491.

Li J., Zhao G., Chen H., Wang H., Qin S., Zhu W., Xu L., Jiang C., Li W. (2008). Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in Applied Microbiology* 47: 574–80.

Li J., Vederas J. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325: 161–165.

Ludwig-Müller J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters* 37: 1325–1334.

Maga G., Hubscher U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116: 3051–3060.

Makino M., Motegi T., Fijumoto. (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry* 65: 891-896.

Manzoor A., Wani A., Qazi P., Rehman S., Mushtaq S., Abid S., Hussain A., Shah A., Khurshid A., Sharif U., Hamid A., Kumar A. (2016) Isolation and characterization of alborixin from *Streptomyces scabrissporus*: A potent cytotoxic agent against human colon (HCT-116) cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 256: 198-208.

Marshall V., Elrod D., Wiley P. (1980). Dihydrosteffimycin compounds. United States Patent 4,209,611.

Martinez-Klimova E., Rodríguez-Peña K., Sánchez S. (2017). Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology* 134: 1-17.

Mata R., Calzada F., Navarrete A., Del Rio F., Delgado G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 34(2-3): 147-154.

McCarville M., Marshall V. (1977). Partial purification and characterization of a bacterial enzyme catalyzing reductive cleavage of anthracycline glycosides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74(2): 331-335.

Meng L., Zhao J., Tang N., Sun H., Huang J. (2018). Horizontal gene transfer from bacteria and plants to the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Frontiers in Plant Science* 9: 701

Metsä-Ketelä M., Niemi J., Mäntsälä P., Schneider G. (2008). Anthracycline biosynthesis: Genes, enzymes and mechanisms. *Topics in Current Chemistry* 282: 101-140.

Minotti F., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56: 185-229.

Nachtigall J., Schulz D., Beil W., Süssmuth R., Fiedler H. (2010). Aranciamycin anhydride, a new anthracycline-type antibiotic isolated from *Streptomyces* sp. Tü 6384. *The Journal of Antibiotics* 63(7): 397-399.

Nadeem M., Ram M., Alam P., Ahmad M., Mohammad A., Al-Qurainy F., Khan S., Abdin M. (2012) *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. *African Journal of Microbiology Research* 6(10): 2493–2499.

Naganawa H., Wakashiro T., Yagi A., Kondo S., Takita T., Hamada M., Maeda K., Umezawa H. (1970). Deoxynybomycin from a *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics* 23(7): 365-368.

Navarrete A., Oliva I., Sánchez-Mendoza M., Arrieta J., Cruz-Antonio L., Castañeda-Hernández G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenaco in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 1629-1636.

Nett M., Ikeda H., Moore B. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports* 26(11): 1362–1384.

Newman D., Cragg G. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75: 311–335.

Newman D., Cragg G. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 79: 629–661.

Nimal I., Praveen P., Agastian P. (2013). In vitro α -glucosidase inhibition and antioxidative potential of an endophyte species (*Streptomyces* sp. Loyola UGC) isolated from *Datura stramonium* L. *Current Microbiology* 67: 69–76.

Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J., Woyke T., Kyrpides N., Pukall R., Klenk H., Goodfellow M., Göker M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. *Frontiers in Microbiology* 9: 2007.

Olano C., Abdelfattah M., Gullón S., Braña A., Rohr J., Méndez C., Salas J. (2008). Glycosylated derivatives of steffimycin: Insights into the role of the sugar moieties for the biological activity. *ChemBioChem* 9: 624-633.

Olivera A., Soto M., Martínez M., Terrazas T., Arenas S. (1999) Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology* 68: 109–113.

OMS. (2019). Página web: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11: 436-445.

Paunesku T., Mittal S., Protic M., Oryhon J., Korolev S., Joachimiak A., Woloschak G. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation Biology* 77(10): 1007-1021.

Parr A., Peerless A., Hamill J., Walton N., Robins R., Rhodes J. (1988). Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* 7: 309-312.

Perego P., Corna E., De Cesare M., Gatti L., Polizzi D., Pratesi G., Supino R., Zunino F. (2001). Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Current Medicinal Chemistry* 8:31–37.

Ping X., Takahashi Y., Seino A., Iwai Y., Omura S. (2004). *Streptomyces scabrisporus* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54: 577–581.

Rajendran L., Rajagopal K., Subbarayan K., Ulagappan K., Sampath A., Karthik G. (2013). Efficiency of fungal taxol on human liver carcinoma cell lines. *American Journal of Research Communication* 1(6):112–121.

Reusser F. (1967). Mode of action of antibiotic U-20,661. *Journal of Bacteriology* 93(1):65-70.

Sachin N., Manjunatha B., Kumara P., Ravikanth G., Shweta S., Suryanarayanan T., Ganeshiah K., Uma R. (2013). Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites? *Current Science* 104(2): 178-182.

Sánchez S., Demain A. (2014). Valuable products from microbes. En: *Microbes in Process*. 1a Edición. Ed. Nova Science Publishers, Inc. Eds. Garg N. y Aeron A. pags. 23-57.

Sánchez S., Ruiz-Villafán B., Ceapa C., Demain A. (2018). Microbial synthesis of secondary metabolites and strain improvement. Current trends and future prospects. En: *Fermentation microbiology and biotechnology*. 4a Edición. Ed. CRC Press. Eds. El-Mansi E., Nielsen J., Mousdale D., Allman T., Carlson R. pags. 75-90.

Sánchez-Fernández R., Díaz D., Duarte G., Lappe-Oliveras P., Sánchez S., Macías-Rubalcava M. (2015). Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1a: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology* 71(2):347–364.

Sánchez-Ortíz B. (2016). Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de hongos endófitos de *Haematoxylon brasiletto* (Fabaceae) útiles en agricultura. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Schulz B., Boyle C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(6): 661–686.

Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A., Krohn K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106(9): 996–1004.

Schwientek P., Szczepanowski R., Rückert C., Kalinowski J., Klein A., Selber K., Wehmeier U., Stoye J., Pühler A. (2012) The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics* 13(112), 1–18.

Shi L., Myers, T., Fan Y., O'Connor P., Paull K., Friend S., Weinstein J. (1998). Mining the National Cancer Institute anticancer drug discovery database: Cluster analysis of ellipticine analogs with p53-inverse and central nervous system-selective patterns of activity. *Molecular Pharmacology*. 53: 241–251.

Shi Y., Zhang X., Lou K. (2013). Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. *Journal of Insect Science* 13(151): 1-12.

Shirling E, Gottlieb D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3):313–340.

Shweta S., Gurumurthy B., Ravikanth G., Ramanan U., Shivanna M. (2013) Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine. *Phytomedicine* 20:337–342.

Snape T. (2013). Origins of drug molecules. En: *Pharmaceutical chemistry*. Ed. Oxford. 1a Edición. Eds. Barber J. y Rostron C. pags. 270-295.

Scott A. (2013). Europe to boost drug discovery. *Chemical and Engineering News Archive* 91(7): 8.

Solares F., Gálvez M. (2002). Manual para una producción sustentable de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca. INIFAP pags. 1-13.

Soliman S., Trobacher C., Tsao R., Greenwood J., Raizada M. (2013). A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. *BMC Plant Biology* 13(93) 1-10.

Sriram M., Liaw Y., Gao Y., Wang A. (1991). Molecular structure of antitumor drug steffimycin and modelling of its binding to DNA. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 9(2): 251-269.

Staniek A., Woerdenbag H., Kayser O. (2009). *Taxomyces andreanae*: A presumed paclitaxel producer demystified? *Planta Medica* 75: 1561-1566.

Stierle A., Strobel G., Stierle D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260(5105): 214–216.

Strobel G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535–544.

Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. (2004). Natural Products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257-268.

Strzalka W., Ziemienowicz A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107: 1127-1140.

Sturz A., Nowak J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 15: 183-190.

Suárez J., Barbes C., Hardisson C. (1980). Germination of spores of *Micromonospora chalcea*: physiological and biochemical changes. *Journal of General Microbiology* 121: 159–167.

Suzukake-Tsuchiya K., Moriya Y., Yamazaki K., Hori M. (1990). Screening of antibiotics preferentially active against *ras* oncogene-expressed cells. *The Journal of Antibiotics* 43(11): 1489-1496.

Takeuchi T. (1995). Antitumor antibiotics discovered and studied at the Institute of Microbial Chemistry. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 121: 505-510.

Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526.

Tamura T., Hatano K. (2001) Phylogenetic analysis of the genus *Actinoplanes* and transfer of *Actinoplanes minutisporangius* Ruan *et al.* 1986 and “*Actinoplanes aurantiacus*” to *Cryptosporangium minutisporangium* comb. nov. and *Cryptosporangium aurantiacum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2119–2125.

Thirumurugan D., Cholarajan A., Raja S., Vijayakumar R. (2018). An introductory chapter: Secondary metabolites. En: *Secondary Metabolites – Sources and Applications*. Ed. Intech Open. 1a Ed. Eds. Vijayakumar R. pags. 3-21.

Thompson C., Ward J., Hopwood D. (1980) DNA cloning in *Streptomyces* resistance genes from antibiotic producing species. *Nature* 286(5772): 525–527.

Tiwari P., Bae H. (2020). Horizontal gene transfer and endophytes: An implication for the acquisition of novel traits. *Plants* 9(305): 1-13.

Trenado-Uribe M., Silva-Miranda M., Rivero-Cruz J., Rodríguez-Peña K., Espitia-Pinzón C., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. (2018). Antimycobacterial activity of an anthracycline produced by an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Molecular Biology Reports* 45(6): 2563-2570.

Umezawa I., Takeshima H., Komiyama K., Koh Y., Yamamoto H., Kawaguchi M. (1981) A new antitumor antibiotic, stubomycin. *The Journal of Antibiotics* 34(3): 259–265.

Vazquez-Hernandez M., Ceapa C., Rodríguez-Luna S., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. (2017) Draft genome sequence of *Streptomyces scabrisporus* NF3, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Genome Announcements* 5(17): 1-2.

Wahl A., Donaldson K., Fairchild C., Lee F., Foster S., Demers G., Galloway D. (1996) Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature Medicine* 2(1): 72–79.

Wang A. (1992). Intercalative drug binding to DNA. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 361-368.

Wani M., Taylor H., Wall M., Coggon P., McPhail A. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of American Chemical Society* 93, 2325–2327.

Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3(2): 163–175.

Weinberg R. (2014). The rational treatment of cancer. En: *The biology of cancer*. Ed. Garland Science. 2da Ed. Eds. Weinberg R. pags. 797-875.

Wiley P., Koert J., Elrod D., Reischer E., Marshall V. (1977). Bacterial metabolism of anthracycline antibiotics steffimycinone and steffimycinol conversions. *The Journal of Antibiotics* 30(8): 649-654.

Wiley P., Elrod D., Marshall V. (1978). Biosynthesis of the anthracycline antibiotics nogalamycin and steffimycin B. *The Journal of Organic Chemistry* 43(18): 3457-3461.

Wiley P., Elrod D., Harper D. (1987). Chemical modification of steffimycin B. *The Journal of Antibiotics* 41(3): 343-351.

Wiley P., Elrod D., Slavicek J., Marshall V. (1980) Microbial conversion of steffimycin and steffimycin B to 10-dihydrosteffimycin and 10-dihydrosteffimycin B. *The Journal of Antibiotics* 33(8): 819-823.

Williston E., Zia-Walrath P., Youmans G. (1947) Plate methods for testing antibiotic activity against virulent human type tubercle Bacilli. *Journal of Bacteriology* 54: 563–568.

Wu Y., Lu C., Qian X., Huang Y., Shen Y. (2009). Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. *Current Microbiology* 59: 475–482.

Wu Y., He L., Zhang L., Chen J., Yi Z., Zhang J., Liu M., Pang X. (2011). Anicardic Acid (6-Pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases Signaling pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339(2): 403-411.

Yang Y., Zhao H., Barrero R., Zhang B., Sun G., Wilson I., Xie F., Walker K., Parks J., Bruce R., Guo G., Chen L., Zhang Y., Huang X., Tang Q., Liu H., Bellgard M., Qiu D., Lai J., Hoffman A. (2014) Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431. *BMC Genomics*, 15(69): 1-14.

Zhang C., Ondeyka J., Zink D., Basilio A., Vicente F., Salazar O., Genilloud O., Dorso K., Motyl M., Byrne K., Singh S. (2009) Discovery of okilactomycin and congeners from *Streptomyces scabrisporus* by antisense differential sensitivity assay targeting ribosomal protein S4. *The Journal of Antibiotics* 62: 55–61.

Zhang P., Zhou P., Yu L. (2009b). An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3. *FEMS Microbiology Letters* 293: 155-159.

Zhang G., Sun S., Zhu T., Lin Z., Gu J., Li D., Gu Q. (2011) Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry* 72: 1436–1442.

Zhao J., Sun W., Shan T., Mou Y., Lou J., Li Y., Wang M. and Zhou L. 2012. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(11): 2100-2104.

Zhao J., Zhou L., Wang J., Shan T., Zhong L., Liu X., Gao X. (2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 567–576.

Zhou X., Zhu H., Liu L., Lin J., Tang K. (2010). A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1707–1717.

Zia M., Yasmin H., Shair F., Jabeen A., Mumtaz S., Hayat Z., Zia S., Shah H., Afghan S., Hafeez F., Hassan M. (2019). Glucanolytic rhizobacteria produce antifungal metabolites and elicit ROS scavenging system in sugarcane. *Sugar Technology* 21:244-255.

Zunino F., Pratesi G., Perego P. (2001) Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochemical Pharmacology* 61: 933–938.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Recopilación del descubrimiento de las estefimicinas y estefimicinonas a lo largo del tiempo.

REFERENCIA	MICROORGANISMO	COMPUESTO	FÓRMULA CONDENSADA	ORIGEN	C2	C3	C7	C8	C10		C11	C2'	C3'	C4'
					R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Reusser, 1976	<i>S. steffisburgensis</i>	Stef	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₃	PN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	= O	H	CH ₃	OH	H	
Keller-Schierlein <i>et al.</i> , 1970	<i>S. echinatus</i>	ananciamicina	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	PN	H	H	O-Rha	OCH ₃	= O	H	CH ₃	OH	H	
Brodasky y Reusser, 1974	<i>S. elgreteus</i>	StefB	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃	PN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	= O	H	CH ₃	OH	CH ₃	
Kelly 1976 McVile y Marshall, 1977	derivado de Stef	estefimicinona **	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	DQPN DBPN	CH ₃	H	OH	OCH ₃	= O	H	-	-	-	
Kelly 1976 McVile y Marshall, 1977	derivado de Stef	7-deoxiestefimicinona **	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	DQPN DBPN	CH ₃	H	H	OCH ₃	= O	H	-	-	-	
Kelly <i>et al.</i> , 1977	derivado de Stef	estefimicinol	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	DQPN DBPN	CH ₃	H	OH	OCH ₃	H	OH	H	-	-	-
Kelly <i>et al.</i> , 1977	derivado de Stef	7-deoxiestefimicinol	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	DQPN DBPN	CH ₃	H	H	OCH ₃	H	OH	H	-	-	-
Marshall <i>et al.</i> , 1980 Wiley <i>et al.</i> , 1980	derivado de Stef	10-dihidroestefimicina	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₃	DBPN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	H	OH	H	CH ₃	OH	H
Marshall <i>et al.</i> , 1980 Wiley <i>et al.</i> , 1980	derivado de StefB	10-dihidroestefimicina B	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₃	DBPN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	H	OH	H	CH ₃	OH	CH ₃
Brodasky y Mizesak, 1985	aguas madres de la StefB	StefC	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₂	PN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	OH	CH ₃
Wiley <i>et al.</i> , 1987	derivado de StefB	Derivados Químicos en C3	---	DQPN DBPN	CH ₃	X	O-Rha	OCH ₃	= O	H	CH ₃	OH	CH ₃	
Suzukake-Tsuchiya <i>et al.</i> , 1990	<i>Streptomyces</i> sp. MH 538-30F7	StefD	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₂	PN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	OH	H
Suzukake-Tsuchiya <i>et al.</i> , 1990	<i>Streptomyces</i> sp. MH 538-30F7	2-demetilestefimicina D	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	PN	H	H	O-Rha	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	OH	H
Kunnari <i>et al.</i> , 1997	<i>S. steffisburgensis</i>	8-demetoxiestefimicina C	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	H	H	H	CH ₃	OH	H
Kunnari <i>et al.</i> , 1997	<i>S. steffisburgensis</i>	8-demetoxiestefimicina	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₂	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	= O	H	CH ₃	OH	H	
Kunnari <i>et al.</i> , 1997	<i>S. steffisburgensis</i>	8-2'-demetoxiestefimicina C	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	H	H	H	H	OH	H
Kunnari <i>et al.</i> , 1997	<i>S. steffisburgensis</i>	2-8-2'-demetoxiestefimicina C	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	DGPN	H	H	O-Rha	H	H	H	H	H	OH	H
Gullón <i>et al.</i> , 2006	<i>S. steffisburgensis</i> <i>S. albus</i>	2-O-demetil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona	C ₁₉ H ₁₆ O ₇	DBPN PN	H	H	OH	H	H	H	H	-	-	-
Gullón <i>et al.</i> , 2006	<i>S. steffisburgensis</i> <i>S. albus</i>	8-demetoxi-10-deoxiestefimicinona	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	DBPN PN	CH ₃	H	OH	H	H	H	H	-	-	-
Gullón <i>et al.</i> , 2006	<i>S. steffisburgensis</i> <i>S. albus</i>	8-demetoxi-2'-demetil estefimicina D	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	H	H	H	H	OH	H
Gullón <i>et al.</i> , 2006	<i>S. steffisburgensis</i> <i>S. albus</i>	8-demetoxi-estefimicina D	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	H	H	H	CH ₃	OH	H

Continuación Anexo 1. Recopilación del descubrimiento de las estefimicinas y estefimicinonas a lo largo del tiempo.

REFERENCIA	MICROORGANISMO	COMPUESTO	FÓRMULA CONDENSADA	ORIGEN	C2	C3	C7	C8	C10		C11	C2'	C3'	C4'
					R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	D-boivinosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	D-boivinososa	H	H	H	H	H	OH	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	3'-O-metil-D-boivinosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	O-metil-D-boivinososa	H	H	H	H	H	OCH ₃	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	D-olivosisil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	D-olivosa	H	H	H	H	H	OH	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	β-D-digitoxosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	D-digitososa	H	H	H	H	H	OH	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	L-olivosisil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	L-olivosa	H	H	H	H	H	OH	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	L-oleandrosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	L-oleandrosa	H	H	H	H	H	OCH ₃	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	L-digitoxosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	L-digitososa	H	H	H	H	H	OH	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	3'-O-metil-L-digitoxosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	3'-O-metil L-digitoxosa	H	H	H	H	H	OCH ₃	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	α-L-amicetosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₈ O ₉	DGPN	CH ₃	H	L-amicetosa	H	H	H	H	H	H	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	α-L-micarosil-8-demetoxi-10-deoxiestefimicina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	DGPN	CH ₃	H	L-micarosa	H	H	H	H	H	CH ₃	OH
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	D-boivinosil-8-demetoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₁	DGPN	CH ₃	H	D-boivinososa	H	= O	H	H	OH	OH	
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	α-L-digitoxil-8-demetoxiestefimicina	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₁	DGPN	CH ₃	H	L-digitososa	H	= O	H	H	OH	OH	
Olano <i>et al.</i> , 2008	<i>S. albus</i>	3'-O-metilestefimicina	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₃	DGPN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	= O	H	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	
Nachtigall <i>et al.</i> , 2010	<i>Streptomyces</i> Tü 6384	aranciamicina anhidro	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₆	PN	H	H	O-Rha+ANH	OCH ₃	= O	H	CH ₃	OH	O-ANH	
Intaraudom <i>et al.</i> , 2015	<i>Streptomyces</i> sp. BCC27095	StefC*	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₄	PN	CH ₃	H	O-Rha	OCH ₃	= O	OH	CH ₃	OH	CH ₃	
Komaya <i>et al.</i> , 2020	<i>Streptomyces</i> sp. OPMA02852	StefE	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	H	OH	H	CH ₃	OH	OH
Rodríguez-Peña, 2020	<i>Embleya</i> sp. NF3	8-demetoxi-estefimicina B	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₂	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	= O	H	CH ₃	OH	CH ₃	
Rodríguez-Peña, 2020	<i>Embleya</i> sp. NF3	8-demetoxi-10 deoxiestefimicina B	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₁	PN	CH ₃	H	O-Rha	H	H	H	H	CH ₃	OH	CH ₃
Rodríguez-Peña, 2020	<i>Embleya</i> sp. NF3	7-deoxi-10 deoxiestefimicinona	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	PN	CH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	H	-	-	-
Rodríguez-Peña, 2020	<i>Embleya</i> sp. NF3	7-deoxi-8 demetoxi estefimicinona	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	PN	CH ₃	H	H	H	= O	H	-	-	-	

ANEXO 2. Secuencias del gen 16S rRNA de las actinobacterias

Actinoplanes sp. YF4

5'-

GCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTTCCGGGGTACTCGA
GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGGACTTTGGGATAACCCTCGG
AAACGGGGGCTAATACCGGATACGACATCCTGCCGCATGGTGTGGGTGTGGAAAGTTTTT
TCGGTCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGG
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAA
GCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGC
TTGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGCCGATACGGGCA
GGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGC
GCTAGGTGTGGGGGACCTCTCCCGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATCA
CTCGAAAACCTCGCAGAGATGCGGGGTCTTCGGGGCGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTG
TCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCG
ATGTTGCCAGCGCGTGATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAA
TGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTC
AGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA
AAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTGGAAGT
GGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3'

Embleya sp. NF3

5'-

GGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATCCTCCTCCGCATGGTGGGG
GGTTGAAAGTTCCGGCGGTGCAGGATGGGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTA
GTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGC
GAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTT
TCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGA
GCTCGTAGGCGGCCTGTGCGTCCGATGTGAAAACCTCGGGGCTTAACCCCGAGCCTGCA
TTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGNTAGTCCACGCC
GTAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGC
ATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGAGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA
AGGCTTGACATACACCGGAAACATCTGGAGACAGGTGCCCTTTTGGTCCGTGTACAGGT
GGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTCGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGTGGGACTCACAGGAGACTG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCGAAGTCATCATGCCCTTATGTCTT
GGGCTGCACACGCTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCG
AATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGG

GGGACCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCAT
 GCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATCACTCGAAAATC
 GCAGAGATGTGGGGTCTTCGGGGCGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCAG
 CGCGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
 GGACGTCAAGTCATCATGCCCGTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTA
 CAAACGGTTGCGATGCCGTGAGGCGGAGCGAATCCCAAAAANCCGGTCTCAGTTCGGAT
 CGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACG
 CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACCCCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGC
 AACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCAAGGTGGGGCTG
 GCGATTGG-3'

ANEXO 3. Estudio Antismash del genoma de la cepa NF3

Utilizando el genoma de la cepa NF3 encontrado por Vazquez-Hernández *et al* (2017), se encontró el clúster de la estefimicina D con un 63% de similitud con el reportado previamente. (ver Clúster Region 1.12).



Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	PKS-like	48,084	87,874	caboxamycin	60%
Region 1.2	terpene	343,200	363,226		
Region 1.3	terpene	584,817	606,685	polyoxyypeptin	8%
Region 1.4	T1PKS	940,986	1,011,730	abyssomicin C / atrop-abyssomicin C	32%
Region 1.5	NRPS-like, betalactone	1,155,105	1,198,144	nybomycin	55%
Region 1.6	betalactone, terpene	1,282,000	1,327,149	hopene	46%
Region 1.7	bacteriocin	1,416,333	1,427,145	ashimides	12%
Region 1.8	siderophore	1,465,102	1,475,719		
Region 1.9	siderophore	1,617,574	1,633,298	ficellomycin	9%
Region 1.10	lanthipeptide	1,673,741	1,696,764	labyrinthopeptin A2 / labyrinthopeptin A1 / labyrinthopeptin A3	40%
Region 1.11	hgI-E-KS, T1PKS, NRPS-like, lassopeptide	1,751,748	1,829,915	zorbamycin	4%
Region 1.12	T2PKS	2,000,286	2,072,774	stefimycin D	63%
Region 1.13	ladderane, NRPS	2,791,431	2,858,147	ishigamide	100%
Region 1.14	other	5,743,212	5,783,934	himastatin	12%
Region 1.15	T3PKS	5,814,229	5,854,597	alkylresorcinol	100%
Region 1.16	NRPS	5,884,534	5,931,335	streptobactin	41%
Region 1.17	NRPS, T1PKS	6,034,221	6,141,122	polyoxyypeptin	75%
Region 1.18	PKS-like	6,153,449	6,194,462	rustmicin	33%
Region 1.19	LAP, thiopeptide	6,861,346	6,889,943	toxoflavin / fervenulin	7%
Region 1.20	NRPS	6,890,945	6,942,265	quartromicin A1	5%
Region 1.21	T3PKS	6,949,905	6,991,119	merochlorin A / merochlorin B / deschloro-merochlorin A / deschloro-merochlorin B / isochloro-merochlorin B / dichloro-merochlorin B / merochlorin D / merochlorin C	14%



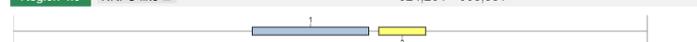
Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 2.1	NRPS	2	61,566	himastatin	12%
Region 2.2	siderophore	64,531	78,075		
Region 2.3	NRPS, lanthipeptide	89,884	144,909		
Region 2.4	lanthipeptide	190,145	212,657		
Region 2.5	T1PKS, NRPS	234,254	302,447	sanglifehrin A	13%
Region 2.6	lanthipeptide	420,056	443,097		
Region 2.7	terpene	458,948	479,110		
Region 2.8	terpene	586,115	607,257		
Region 2.9	NRPS	645,871	693,342	aurantimycin A	6%
Region 2.10	lanthipeptide	1,010,215	1,031,696	ulleungmycin	5%
Region 2.11	lanthipeptide, NRPS	1,056,841	1,106,929	s56-p1	15%



Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 3.1	CDPS	63,182	83,979		
Region 3.2	NRPS	153,147	209,663	salinichelins	30%
Region 3.3	lassopeptide	282,373	305,197		
Region 3.4	hgIE-KS	393,404	444,343		
Region 3.5	T1PKS	529,911	628,539	ebelactone	13%
Region 3.6	NRPS-like	634,866	677,766	kanamycin	2%
Region 3.7	T3PKS, T2PKS	983,806	1,096,234	spore pigment	83%



Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 4.1	NRPS-like	127,529	168,805		
Region 4.2	linaridin	278,957	299,873	legonaridin	41%
Region 4.3	T1PKS, NRPS, betalactone	317,030	397,643	triostin A	11%
Region 4.4	terpene, other, NRPS-like, bacteriocin	586,557	677,808	ebelactone	5%
Region 4.5	butyrolactone	703,790	714,749		
Region 4.6	NRPS-like	924,264	968,331		



Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 5.1	NRPS, lassopeptide	134,779	200,447	A54145	5%
Region 5.2	lanthipeptide	206,124	232,596		

ANEXO 4. Artículo publicado.

Streptomyces scabrisporus, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens* as producer of an anthracycline active against different cancer cell lines

Karol Rodríguez-Peña¹, Martha Lydia Macías-Rubalcava², Leticia Rocha-Zavaleta¹, Miriam Trenado-Uribe¹, Romina Rodríguez-Sanoja¹ and Sergio Sanchez^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tercer Circuito Exterior s/n, Ciudad de México 04510, México

²Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM), México

Abstract

The search for bioactive compounds against cancer cell lines produced by endophytes led to the isolation of an actinomycete identified by 16S rDNA as *Streptomyces scabrisporus*. The organic extracts of this microorganism were evaluated in a bioassay-guided study for cytotoxic activity against breast adenocarcinoma MCF7 and human cervical carcinoma HeLa cell lines. The major and also more active compound was isolated and completely characterized as steffimycin-B (StefB). This compound showed cytotoxic activity against HeLa cells and caused morphological changes in MCF-7 cells with an IC50 value of 2.56 μM. StefB also affected other breast cancer cell lines, including the triple negatives HCC1806 and DU4475 (IC50 values of 18.2 and 4.82 μM, respectively) and exhibited low activity against the non-cancerous line of keratinocytes HaCaT (IC50 156 μM). Besides, StefB decreased expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), induced morphological changes and apoptosis on MCF7 cells, which increased with the exposure time, supporting this compound as a promissory drug for breast cancer treatment.

Introduction

Screening and isolation of soil Actinomycetes with potential pharmacological properties has been explored for more than 50 years. Owing to the movement of the pharmaceutical industry away from natural products, in recent years the number of drug approvals has drastically dropped down [1]. However, microbial products with pharmaceutical applications are still big business and the search for new drugs cannot be stopped. Therefore, new screening approaches including new metagenomic and genome-mining techniques and the exploration of non-conventional sources of potentially producer microorganisms, are still being studied [2].

Endophytes are microorganisms that inhabit plants without causing visible disease symptoms [3]. Along the past few years they have become an important source of novel molecules with interesting biological characteristics [4].

Discovery of anticancer compounds in endophytes started with the isolation of taxol from *Taxomyces andreanae*, a molecule widely used in chemotherapy [5]. Towards 2010, 57 fungal and 13 bacterial endophytes producing taxol or some of its precursors were reported [6], reaching over 80 fungi by 2014 [7,8]. A similar story has been observed for other commercially important anticancer compounds. Thus, 11 fungal endophytes able to produce camptothecin and 14 yielding podophyllotoxin, were isolated from different host-plants [9-11].

Diversification of novel compounds produced by endophytes increases every day. Thus, 100 anticancer molecules were isolated between 1990 and 2010, belonging to 19 different chemical classes and showing activity against 45 different cell lines [11]. Additional

compounds recently isolated from endophytes exhibited antibiotic [12], antifungal [13], antiparasitic [14] and antiviral activities [15].

Actinomycetes have the potential to produce a huge number of compounds that differ greatly between genera. Some of them contain more than 60 clusters for secondary metabolites, mostly unknown [16]. Screening and isolation of endophytic actinomycetes is important, due to the interaction and evolution developed between host plants and endophytes. The use of medicinal plants as source of actinomycetes has gained interest due to the biotechnological potential in the production of different and novel compounds [17].

The plant selected for this study was *Amphipterygium adstringens*, traditionally known as “Cuachalalate”. This is a medicinal tree widely used in Mexico for a variety of human affections like circulatory problems, stomach cancer, urinary disorders, gastrointestinal, lung and respiratory diseases, among others. It is an endemic Mexican tree, resinous and dioecious, inhabiting in regions with deciduous or sub-deciduous tropical forest [18]. Phytochemical studies of its bark have revealed the presence of a wide variety of compounds like

*Correspondence to: Sergio Sánchez MD, PhD, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tercer Circuito Exterior s/n, Ciudad de México 04510, México, E-mail: sersan@biomedicas.unam.mx

Key words: *Amphipterygium adstringens*, *Streptomyces scabrisporus*, endophytes, steffimycin B, cytotoxicity

Received: October 09, 2018; **Accepted:** October 22, 2018; **Published:** October 24, 2018

masticadienonic acid, 3 α -hidroximasticadienonic acid, alkyl phenolic acids, alkyl phenolic aldehydes, tirucallane-type triterpenes, anacardic acids and β -sitosterol, which exhibit different biological activities [19-21].

This report deals with the evaluation of the cytotoxic activity of an endophytic actinomycete isolated from *A. adstringens* and the chemical characterization of the most active compound to finally discuss its possible mechanism of action.

Materials and methods

Plant material and collection site

Plant material was collected in Barranca Honda, municipality of Tlaltizapan, Morelos, Mexico (18°48'33.4476"N, 99°07'13.944"W). The first collection was in February 2013 (drought) by sampling stem vascular tissue and seeds from female trees and stem vascular tissue from male trees. There were no leaves on the trees at this season. The second collection was carried out in August 2013 (rainy), taking leaves, stem and seeds from the female trees as well as leaves and stems tissue from the male trees. Samples were identified by a specialist at the National Herbarium of Mexico as *A. adstringens* and incorporated as Herbarium specimens under numbers 1366483 for the female tree and 1366484 for the male tree.

Samples for microbiological analysis were sprayed with a 70% ethanol solution and stored in sterile bags at low temperature for transportation. Leaves and branches were also collected for plant identification.

Sample treatment and isolation of endophytes

A stem sample of *A. adstringens* was exhaustively washed in running water. Then cut out in a small piece and subject to a four-step surface sterilization procedure by sequential immersion (one minute each) in sterile water, 65% ethanol, 3.4% NaClO and sterile water (modified from Sanchez Fernández et al.). A 500 μ l sample of the fourth wash was used to inoculate Nutrient agar to test for sterility of the sample surface. The sample was cut out into 0.3 cm² pieces and placed in a Petri dish containing Nutrient agar Difco™ 213000 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) for at least 60 days at 29°C. Complete isolation of the actinomycete was possible by sub-culturing the colonies in ISP-2 medium [22].

Molecular characterization of endophytic actinomycetes

The Actinomycete DNA was isolated using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA) commercial kit, following manufacturer's instructions. 16S ribosomal DNA sequence of the actinomycete was amplified using universal primers fwd5' -CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG and rev 3' -CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTTTGT TACGACTT, following PCR amplification conditions PCR amplification conditions were five min initial activation of Taq-DNA-Polymerase for five min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s denaturation at 94°C, annealing for 1 min at 56.5°C and extension for 2 min at 72°C, with a final extension step at 72°C for four min [14]. PCR product purification was accomplished using the commercial kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and sent to Laragen, Inc. (CA, USA) for sequencing.

The 16s rDNA sequence was deposited in GeneBank under the accession number KU579247. The sequence was compared using BLAST analysis with sequences in the existing 16S rDNA database at

NCBI [23]. Phylogenetic tree of NF3 was built in Mega6 [24] using the Maximum Likelihood method based on the Jukes-Cantor model and a bootstrap value of 1000 and comparing with the strains that presented the closest proximity at the time of computation. The isolated actinomycete NF3, is maintained in viable conditions at the UNAM-48/WFCC (Mexico City).

Microscopic characterization of NF3 strain

Erlenmeyer 250-mL flasks containing 50 mL ISP-2 liquid medium was inoculated with NF3 strain and incubated for 8 days at 29 °C, at 180 rpm. After that time, 200 μ l of the culture were used to inoculate Petri dishes containing ISP-2 semi-solid culture media, gently dispersing with glass beads over the whole surface.

Microscopic slides were prepared from Gram stained colonies grown for 8 days in semi-solid ISP-2 medium. Preparations were observed in a bright field Primo Star Zeiss Microscope and stereoscopic Spencer microscope.

Colonies were also handled for visualization by Scanning Electron Microscopy (SEM) following a modified protocol from [25]. A colony was sampled with a 5 mm puncher and placed in 1.5 mL microcentrifuge tube containing 3% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) during 24h. Sample was washed with PBS and dehydrated using an ethanol gradient 30%, 50%, 70% 85% and 100 and, were placed in a Samdri-795 for drying at CO₂ critical point and finally covered with gold in a Jeol ion sputter JFC-1100. Samples were observed with a JEOL JSM-6360LV Microscope.

Fermentation and purification of the major compound from strain NF3

A 14-L New Brunswick bioreactor fitted with Rushton Turbines and air diffusion was used, containing 10 liters ISP-2 medium. The sterilized medium was inoculated with a 10% v/v (3 days inoculum) of the strain NF3 and the fermentation was conducted at 60 rpm and 0.5 vvm for 8 days at 29°C. After fermentation, the culture media was centrifuged at 10,000 x g for 10 min. Supernatant was exhaustively extracted by partition and Biomass by maceration, both with ethyl acetate (EtOAc) until no color appeared in the extraction solvent. The organic solvent extracts were evaporated under reduced pressure in a Büchi rotary evaporator R-215 coupled to the vacuum pump V-700 and mixed, yielding approximately 1 g of crude extract, which was subjected to a 77 cm long open column chromatography, packed with 169 g of silica gel 60 (70-230 mesh) from Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). The column was eluted with a gradient of n-hexane/CH₂Cl₂ (100:0 to 0:100) and CH₂Cl₂/MeOH (99.9:0.1 to 0:100) resulting in 14 primary fractions.

The more active fraction was analyzed by HPLC/UV/ESI-MS in an Agilent 1200 Binary SL pump (Santa Clara, CA, USA) coupled with an ESI-MS Mass Spectrometer Esquire 600 (Bruker, Billerica, MA, USA) and a Waters 2996 PDA detector (Milford, MA, USA). For High-performance liquid chromatography (HPLC), a Synergi 4u Polar RP 80A 150 X 2.0 mm column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used with MeOH:H₂O (80:20, v/v) to 100% MeOH at 0.2 mL/min flow. The major compound was purified in a Millipore preparative TLC Silica gel 60 F254 Glass plates 20 X 20 cm (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), being the elution system CH₂Cl₂/MeOH (99:1), yielding 20 mg of an orange powder. Nuclear Magnetic Resonance spectrometry (NMR) was done in a Bruker 400 MHz Spectrometer using deuterated chloroform as solvent. A Xevo G2-XS QTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) was used to compare the fragmentation

pattern of the isolated compound with a commercial standard of Steffimycin B from Enzo Life Sciences ALX-380-220-M001 (Ann Arbor, MI, USA).

Cell lines culture

Breast adenocarcinoma (MCF-7 ATCC HTB-22), human cervical carcinoma (HeLa ATCC CCL-2) and immortal keratinocytes (HaCaT) were donated by Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, and authenticated by Instituto Nacional de Medicina Genómica, México. MCF-7 and HaCaT cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine Caisson RPL03 (Caisson Laboratories, East Smithfield, UT, USA), 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with high glucose, L-glutamine, and sodium pyruvate Caisson DML10, 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% (w/v) penicillin/streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 98% humidity and a 5% CO₂ gas environment.

For the pure compound evaluation, different breast cancer cell lines including triple negative were also tested, with HCC1806 ATCC crl-2335, HCC1937 ATCC CRL-2336, DU4475 ATCC HTB-123 and MBDC5 (kindly donated from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición), all of them cultured in RPMI-1640 medium as described above.

In Vitro cytotoxicity assay

Cell survival and proliferation were determined by a Cell Counting Kit-8 WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) in a 96-well plate containing 5000 cells per well and incubated for 24hr. Crude extract, fractions and the pure compound were added from DMSO-diluted stocks to achieve different concentrations of the extract per well (0.1 to 100 µg/mL). In all cytotoxic assays, DMSO was tested as the diluent control (vehicle); sterile media was used as a negative control and doxorubicin at the same concentrations was tested as a positive control. After 48 h incubation with treatments, 10 µL of WST-8 was added to each well and 2h later, the absorbance was measured at 450 nm in a Thermo Scientific Multiscan[®] FC Microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). When the final concentration of DMSO was higher than 0.5% v/v (only in concentrations at 100 µg/mL), the activity for DMSO was subtracted from the result, being 20% mortality for MCF7 and 22% for HeLa cells, not DMSO mortality was detected for HaCaT cells at any concentration. A calibration curve was prepared with known cell numbers and the percent of mortality calculated based on the number of untreated cells. IC50 values were determined from the plot's percent mortality against extract concentration and calculated by logarithmic regression analysis. Results are representative of three individual experiments.

Detection of the apoptotic cells by flow cytometry

A million of MCF7 cells were incubated for 24h and treated with the purified steffimycin B (StefB) at the IC50 value for 12, 24 and 48h. Doxorubicin treated cells at IC50 value for 48h were tested as positive apoptotic control and vehicle and not treated cells were evaluated at 48h as negative controls. Cells were harvested using a versene solution for cell dissociation and washed with PBS, without any previous wash. Cell pellet were treated with the APC Annexin V Apoptosis detection kit with 7-AAD Cat 640930 (BioLegend, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were analyzed in an Attune acoustic focusing cytometer measuring 10,000 cells using the Attune cytometric software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Proliferation by Western blot analysis

MCF7 cells were incubated and treated as in the flow cytometry analysis. Cells were resuspended in 75 µl lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM EDTA; 1 mM Na3VO4) containing 40 µL/mL of protease inhibitors cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and 10 µL/mL of phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were kept under stirring for 20 min at 4°C, then centrifuged at 14,000 rpm for 3 min. Supernatant was recovered and stored at -20°C until use. Protein concentration was calculated using the DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Protein (30 µg/well) was separated on 12% SDS-PAGE and electro-transferred onto Immobilon-PSQ (polyvinylidene fluoride) membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with 3% skimmed milk powder in Tris-buffered saline (TBS) for 30 min and incubated for 24h with Anti-PCNA antibody [EPR3821] ab92552 (Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:1000 at 4°C. As an internal control, a rabbit anti-GAPDH GTX100118 (Genetex Inc., Irving, CA, USA) was used. After incubation with the first antibody, membrane was washed three times with TBS-Tween 5% and then incubated for 1h at room temperature with the goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004 Secondary Antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:15,000 dilution. Chemiluminescent bands were detected using the kit Trident ECL plus GTX400006 (Genetex Inc., Irving, CA, USA) and images were obtained in a Carestream Kodak BIOMAX Light Film CAT 178 8207 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Evaluation of senescence and morphological changes

24-well plates containing 10,000 MCF7 cells per well were treated as flow cytometry assay. To detect senescence cells, a β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, INC., Danvers, MA, USA) was used following manufacturer's instructions. Plates were observed in an Olympus IX-71 microscope (Olympus Corporation, Tokio, Japon) adapted with an Olympus LUCPlanFL N 20x (N.A. 0.45) objective. Images were acquired with an Evolution VF camera (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Results

Isolation and identification of the NF3 strain

The NF3 strain was isolated from a small piece of a female stem of *A. adstringens* incubated in nutrient agar medium. The strain presented small mycelium at X1000 magnification and irregular shape colonies at X250, a morphology characteristic of actinomycetes. The 16S ribosomal DNA from NF3 strain with 1272 bp (base pairs) showed 99% identity with different strains of *Streptomyces scabrisporus*. The phylogenetic tree of the NF3 (Figure 1), exhibited this strain in a clade where all the *S. scabrisporus* reported up today are included, with a high value of bootstrap, supporting its identity with this species. Its identification was corroborated as *S. scabrisporus* via 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* and *recG* genes [26].

Figure 2 shows the *S. scabrisporus* NF3 strain growing as soft pink colonies in rough aggregates, changing to darker colonies with white spores that appeared at the time of incubation, as well as producing a red pigmentation in agar. Gram-positive mycelia formation was observed under optic microscopy while in SEM micrographs lineal spore chains presenting some areas with free spores were found.

Identification of the major bioactive compound of *S. scabrisporus* NF3.

The *S. scabrisporus* NF3 crude extract obtained from a 10-liter bioreactor was evaluated against MCF7, HeLa and HaCat cell lines

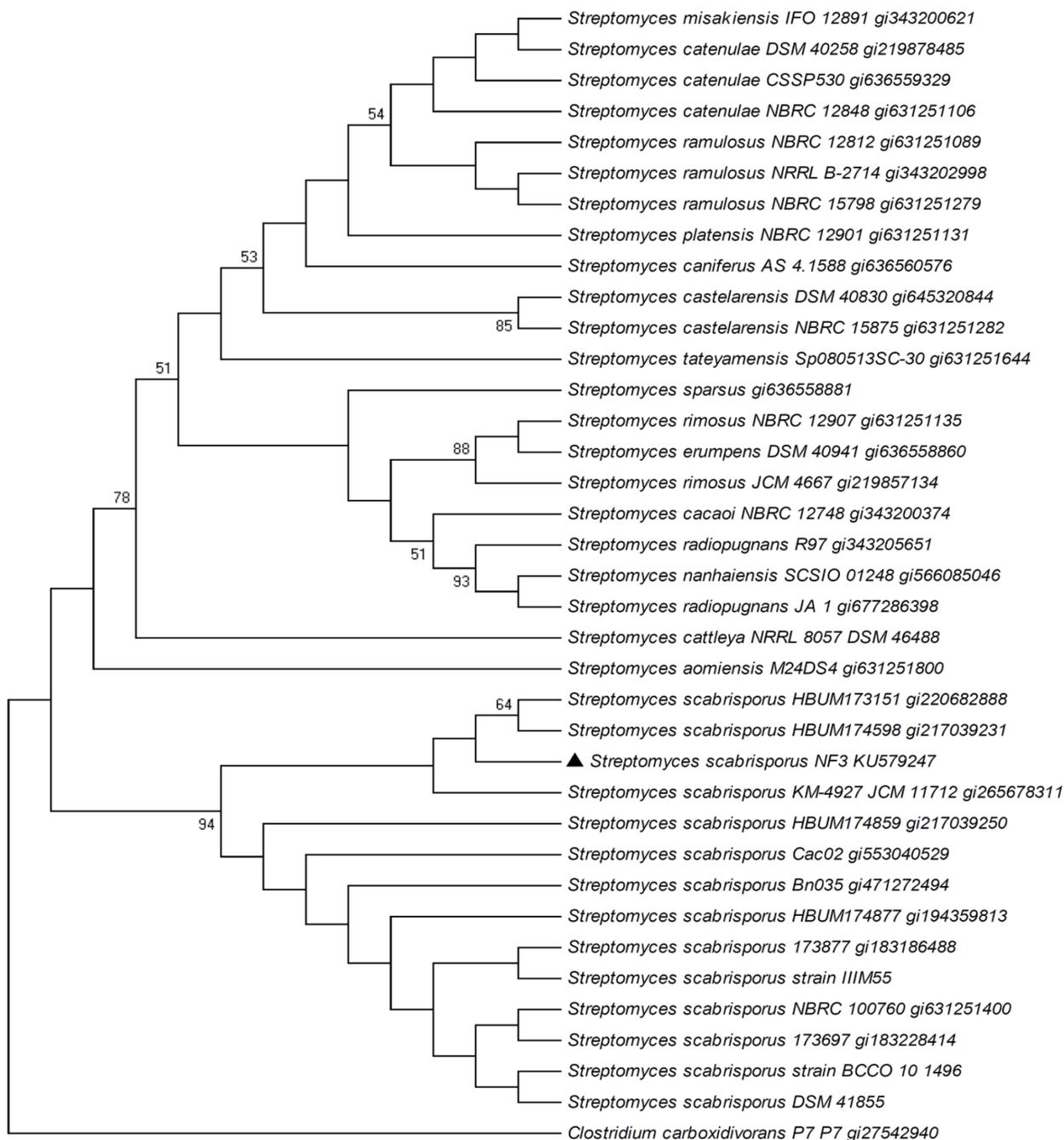


Figure 1. Phylogenetic tree of the NF3 strain using the maximum likelihood method based on the Jukes-Cantor model. Bootstrap values were calculated from 1,000 re-samples with values over 50% shown at the respective node

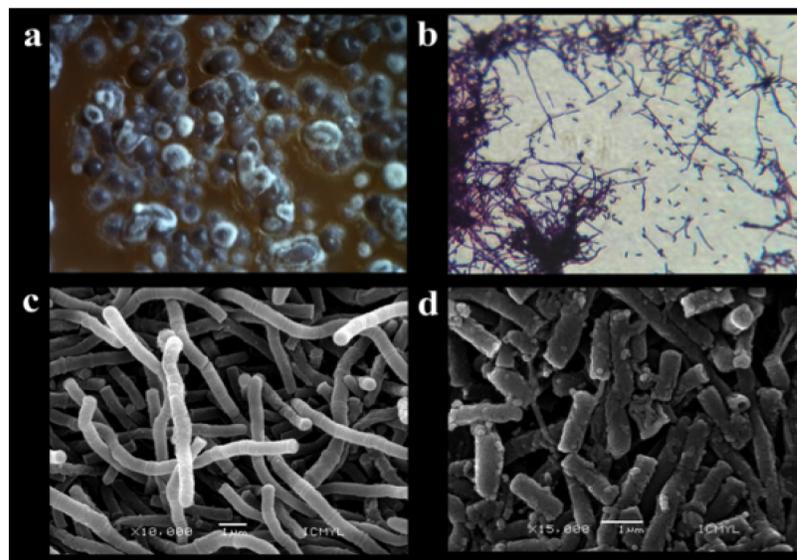


Figure 2. Micrographs of *S. scabrissporus* at: **a)** stereoscopic microscope (X250); **b)** Optical microscope (X1,000); **c)** SEM micrograph (X10,000) of linear mycelia; **d)** SEM micrograph (X15,000) of spore formation

(Table 1) finding a high cytotoxic activity when compared with the positive control Doxorubicin. Fractions obtained in the open chromatography column were also evaluated, finding that 9 out of 14 fractions showed high activity against the same three cell lines (Table 2).

Because of its high activity against the cancer cell lines and low activity against keratinocytes, fraction 4 was chosen for subsequent purification. Besides, 197.6 mg were obtained from this fraction. The HPLC/UV/ESI-MS analysis showed 10 peaks in the chromatogram, being the peak 8 the major compound (Figure 3a) and the other compounds in that fraction seemed to be closely related because of its yellow color and proximity of mass profiles (data not shown). The mass and the UV spectra of this compound can be seen in Figures 3b and 3c, respectively. These data and the ^1H and ^{13}C NMR spectra supported StefB as the active molecule (Figure 3d). The ESI-MS results are as follow: m/z 587.5 [M-H]; UV in methanol: λ_{max} at 235.5 nm. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 12.91 (s, 1H), 12.0 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.35 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.69 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.56 (s, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.47 (dd, J = 3.6, 1H), 3.00 (t, 9.4 Hz, 1H), 2.34 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.33 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz): δ 198.94, 190.64, 180.41, 167.5, 165.85, 162.15, 135.53, 135.07, 133.55, 133.52, 118.77, 117.59, 110.18, 109.27, 106.75, 100.6, 85.67, 83.3, 80.46, 76.68, 71.95, 71.27, 69.00, 60.94, 59.98, 58.85, 56.29, 22.9, 17.95. Fragmentation patterns of the compound isolated in this study, named 4D along the purification steps (Figure 3e), and a commercial standard of StefB (Figure 3f) were acquired, obtaining similar results.

Cytotoxic activity of StefB and its effect on MCF7 cells

Cytotoxic activity of the pure compound was tested against different cell lines, including three triple negative breast cancer cell lines (HCC1806, HCC1937 and DU4475). As shown in Table 3, StefB affected MCF7, DU4475, HCC1806 and MBCD5 cell lines, with MCF7 as the most sensitive one. As seen in the same table, although the IC_{50}

Table 1. Cytotoxic effect of NF3 crude extract grown in ISP-2 medium and the positive control Doxorubicin, against different cell lines

EXTRACTS	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	MCF7	HeLa	HaCaT
NF3 EtOAc	0.96	1.98	2.7
Doxorubicin	0.72	2.4	2.5

Table 2. Cytotoxic effect of the fractions obtained from an open chromatography column from the *S. scabrissporus* NF3 strain

Fractions*	% Mortality (at 100 $\mu\text{g/mL}$)			Total fraction (mg)
	MCF7	HeLa	HaCaT	
F1	0	8.9 \pm 1.7	45.7 \pm 0.9	16.0
F2	0	0.7 \pm 1.0	34.8 \pm 1.3	58.5
F3	0	7.1 \pm 2.0	35.1 \pm 2.8	25.1
F4	69.4 \pm 0.2	66.9 \pm 1.2	44.5 \pm 0.9	197.6
F5	80.8 \pm 0.4	78.3 \pm 0.6	61.4 \pm 0.4	20.7
F6	77.5 \pm 1.3	78.8 \pm 0.1	61.6 \pm 0.2	148.7
F7	79.1 \pm 0.6	78.7 \pm 0.5	60.0 \pm 0.5	132.1
F8	79.1 \pm 0.8	79.0 \pm 0.5	60.9 \pm 0.6	116.7
F9	80.0 \pm 0.2	100.0 \pm 0.3	61.3 \pm 0.7	59.0
F10	0	32.9 \pm 4.9	3.5 \pm 1.0	46.9
F11	0	9.1 \pm 1.3	0	55.6
F12	97.6 \pm 0.3	94.2 \pm 2.2	58.6 \pm 0.3	109.1
F13	97.0 \pm 0.4	98.3 \pm 0.1	58.3 \pm 0.4	19.8
F14	89.4 \pm 1.1	69.9 \pm 2.3	55.3 \pm 0.3	60.7

*Fractions 1 to 8 were diluted in DMSO, and DMSO activity was subtracted to the final result. Fractions 9 to 14 were diluted in water.

values were higher than doxorubicin, this commercial compound also affected normal keratinocytes.

To elucidate the possible effects of StefB, treated MCF7 cells were analyzed by flow cytometry and Western blot. Figure 4a shows the presence of apoptotic cells, after treating the cell line with 2.56 μM StefB, with 48 h exposure as the time to get the maximum value. Furthermore,

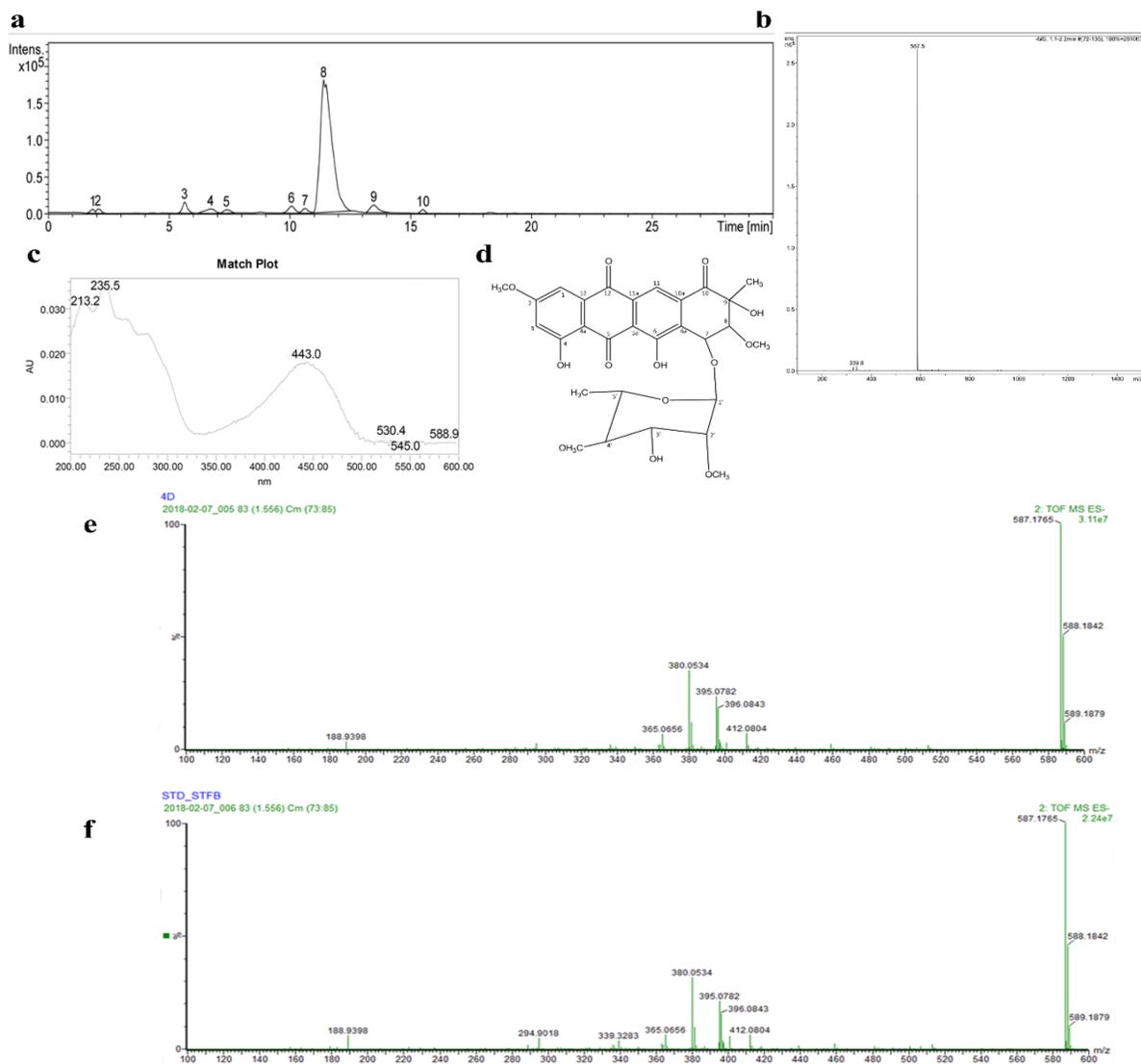


Figure 3. Chemical characterization of fraction 4 and structure confirmation of StefB. **a)** HPLC chromatogram; **b)** Mass spectra of compound 8; **c)** UV spectra of compound 8; **d)** Chemical structure of major compound StefB; **e)** Fragmentation pattern of the major compound 4D identified as StefB; **f)** Fragmentation pattern of commercial standard of StefB

Table 3. IC₅₀ values of the cytotoxic activity of StefB in different cell lines

CELL LINE	IC ₅₀ μM	
	StefB	Doxorrubicin
HeLa	71.90	4.34
MCF7	2.56	1.32
HaCaT	156.00	4.67
HCC1806	18.20	0.07
HCC1937	456.00	0.45
MBCD5	25.70	1.59
DU4475	4.81	<0.09

the presence of StefB, negatively affected cell proliferation, as judged by a Figure 4 western blot analysis of the PCNA protein (Figure 4b). Finally, strong morphological changes were microscopically detected after StefB treatment with the presence of senescence cells (stained in blue), with a maximum effect at 48 h treatment (Figure 4c).

Discussion

In this study, an actinomycete (NF3 strain) isolated from a female stem from the medicinal tree *A. adstringens* was selected by their ability to produce secondary metabolites, property frequently found

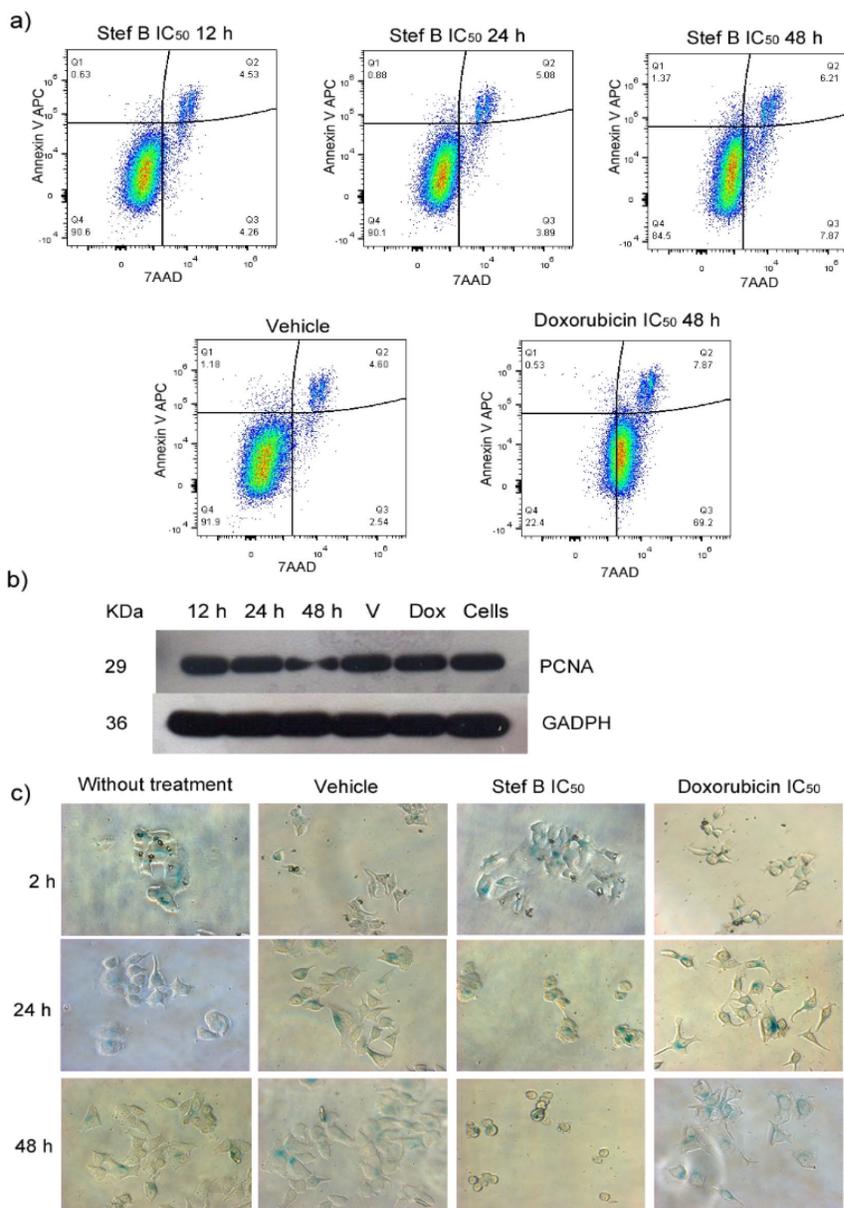


Figure 4. Effect of StefB on MCF7 cells. **a)** Flow cytometry analysis evaluating apoptosis and necrosis; **b)** Western Blot analysis of the expression of the proliferation marker PCNA (found at 29 KDa) using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) as positive control (at 36 KDa); **c)** Micrographs showing morphological changes of the cells stained with β-galactosidase

in endophytic actinomycetes [27-29]. Its molecular identification highlighted NF3 strain as *S. scabrisporus*, a species never reported as a plant endophyte.

The first report on *S. scabrisporus* KM-4927^T (=JCM 11712^T = NRRL B-24202^T) described this microbe as a gray aerial cell mass producer with spiral spore chains and a rough spore surface [30] unable to produce soluble pigments on ISP-2 medium and other solid media. A recent study also reported another strain of *S. scabrisporus* with spiral aerial mycelium and unable to produce soluble pigments when grown in ISP-2 medium [30,31]. Contrary to the *S. scabrisporus* NF3 strain, those strains were isolated from soil. Interestingly, the NF3 strain produced pigments in different media, including ISP-2. Regarding its morphology, SEM micrographs showed lineal spore chains formation instead of the multiple-spiral spore chains reported for other *S. scabrisporus* strains [30], further supporting differences between these microbes. These differences could be related to the activation of pathways used in the symbiotic relationship between NF3 strain, and *A. adstringens*.

The genome sequence of various *S. scabrisporus* strains, have been already released. Their analysis suggested variations between KM-4927^T and DSM 41855 strains with changes in some of their polyketide biosynthetic genes [32]. Furthermore, a recent comparison made by our research group between the strains DSM 41855 and NF3, suggested important differences in their putative gene clusters encoding for secondary metabolites production [33]. Finally, the presence of 2 clades in the *S. scabrisporus* phylogenetic tree, with more than 60% bootstrap value, may support significant dissimilarities within this species.

Chromatography and HPLC/UV/ESI-MS analysis of the *S. scabrisporus* NF3 organic extracts identified the major fraction with cytotoxic activity as StefB, a bioactive anthracycline initially reported in 1974 in *Streptomyces elgreteus* [34]. Similar fragmentation patterns of the isolated compound with those of a commercial standard of StefB, supported further the authenticity of the cytotoxic compound.

Other *S. scabrisporus* strains have been reported to produce bioactive compound like the macrocyclic hitachimycin [32], the polyketide okilactomycin [35] and the polyether ionophore alborixin [36], all of them colorless compounds with antibiotic and cytotoxic activities. In addition to StefB, *S. scabrisporus* NF3 was found to produce two uncharacterized bioactive pigments (red and yellow), not previously described for this species.

The activity of StefB has been reported against Gram-positive bacteria with low inhibitory effect on L.1210 mouse leukemia cells [34]. Antimalarial and antimycobacterial activities have also been reported for this molecule, as well as against both malignant (KB, NCI-H187) and non-malignant (Vero) cells [37,38]. On the contrary, antifungal activity against fourteen human pathogenic fungi was not detected [34]. Studies to improve the activity and solubility of this molecule either via chemical, microbiological or molecular biology have also been performed by different groups [39-41]. Furthermore, isolation, characterization and heterologous expression of the StefB gene cluster, was also explored [42].

When StefB was tested over different cell lines not previously evaluated, this compound affected from major to minor scale the breast adenocarcinoma MCF7, the triple breast cancer cell lines DU4475, HCC1806, MBCD5 and Hela, showing a high IC50 value against the non-tumor cell line HaCaT. Among them, the triple negative HCC1806 and DU4475 have gained importance in the last years mainly due to its resistance to targeted treatments. When compared to doxorubicin, StefB resulted less aggressive or toxic than the above anticancer compound,

making it an attractive drug for further studies. Doxorubicin was selected as positive control in this study since also belongs to the anthracycline's family of bioactive compounds [43].

Regarding to its mechanism of action, StefB binds to double-stranded DNA as showed by difference spectroscopy and an increase of the DNA thermal stability in the presence of the anthracycline [44]. Furthermore, the molecular and crystal structure of StefB has been described and used for modeling the intercalative binding with DNA, finding that StefB has a higher CpG sequence specificity over the TpA step, similar to that of daunorubicin and nogalamycin [45].

The behavior of the tumor cells to the presence of StefB has not been characterized. In our study we evaluated this response in the MCF7 cell line, as this was the most sensitive to the StefB effect. In this line, a decrease of cell proliferation via PCNA expression was observed with the presence of apoptotic cells and strong morphological changes with the presence of senescence cells that increased with the exposure time to StefB. Although apoptosis seems to be the cell death pathway as occurs with doxorubicin, the extremely morphological changes caused by StefB makes necessary to perform additional studies to know why these structural modifications occur in the cells and their subsequent implications.

Conclusion

In conclusion, an actinomycete with potential to produce bioactive compounds was isolated from *Amphipterygium adstringens*. This strain identified as *S. scabrisporus* was selected by a bioassay-guided study showing a strong cytotoxic potential against various cancer cell lines (breast and cervical carcinoma). A major compound purified from crude extracts of this strain and responsible of the biological activity was identified as StefB. This compound, formerly known for its different biological activities, strongly affected different breast cancer cell lines, including triple negative ones, with low toxicity against keratinocytes, making it a promissory drug for breast cancer treatment.

Acknowledgments

Karol Rodríguez-Peña is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). She was recipient of the fellowship 161183 from CONACYT, México. We are grateful to G. Sánchez-Ruiz, R. González-Moguel, L. Tovilla-Coutiño, C. Aguilar-Zacarias and B. Ruiz-Villafán for their valuable participation in this work. We thank Y. Hornelas-Orozco from ICMYL-UNAM, for the scanning electronic micrographs, K. Bermudez-Torres from CEPROBI-IPN for her advice in the collection of the plant samples, R. Medina-Lemos from Instituto de Biología-UNAM, for plant identification, Abel Blancas for the Biorreactor facilities, M.A. Ortiz-Jiménez for the actinomycete preservation and M. Tapia for the microscopic images.

Competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Ethical statement

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors

Authorship and contributor ship

KRP, SS, MLMR, LRZ and RRS contributed equally to conception and design of the project, data analysis and interpretation. KRP and

MTU contributed to acquisition data. All authors revised the manuscript and gave the final approval of it and agree to act as guarantors of the work.

Funding information

This work was supported by the DGAPA, PAPIIT grant UNAM IN-202216 and the NUATEI program from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. We thank the support of CONACYT project number INFR-2017-01 279880, which allowed the acquisition of an HPLC masses.

References

1. Gravitz H (2012) Turning a new phage. *Nat Med* 18: 1318-1320. [Crossref]
2. Demain AL, Sanchez S (2015) The need for new antibiotics: *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends* 1st Eds. Caister Academic Press, 65-82.
3. Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycol Res* 109: 661-686. [Crossref]
4. Guzmán-Trampe S, Rodríguez-Peña K, Espinosa-Gómez A, Sánchez-Fernández RE, Macías-Rubalcava ML, Flores-Cotera LB, Sánchez S (2015) Endophytes as a potential source of new antibiotics: *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends* 1st Eds. Caister Academic Press, 175-204.
5. Stierle A, Strobel G, Stierle D (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260: 214-216. [Crossref]
6. Flores-Bustamante ZR, Rivera-Orduña FN, Martínez-Cárdenas A, Flores-Cotera LB (2010) Microbial paclitaxel: advances and perspectives. *J Antibiot* 63: 460-467. [Crossref].
7. Rajendran L, Rajagopal K, Subbarayan K, Ulagappan K, Sampath A, et al. (2013) Efficiency of fungal taxol on human liver carcinoma cell lines. *Am J Res Commun* 1: 112-121.
8. Yang Y, Zhao H, Barrero RA, Zhang B, Sun G, et al. (2014) Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431. *BMC Genomics* 15: 1-14. [Crossref]
9. Nadeem M, Ram M, Alam P, Ahmad MM, Mohammad A, et al. (2012) *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophylotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. *African J Microbiol Res* 6: 2493-2499.
10. Shweta S, Gurumurthy BR, Ravikanth G, Ramanan US, Shivanna MB (2013) Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine. *Phytomedicine* 20: 337-342. [Crossref]
11. Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes : their importance and future challenges. *Nat Prod Rep* 28: 1208-1228. [Crossref]
12. Martínez-Klimova E, Rodríguez-Peña K, Sánchez S (2017) Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem Pharmacol* 134: 1-17. [Crossref]
13. Sánchez-Fernández RE, Diaz D, Duarte G, Lappe-Oliveras P, Sánchez S, et al. (2015) Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. strain GS4d2II1a : a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microb Ecol* 71: 347-364. [Crossref]
14. Guzmán-Trampe S, Lemus D, Jiménez O, Ruiz-Villafán B, García-Carrancá A, et al. (2015). Evaluation of the potential bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Magnolia dealbata* Zucc. *Intl J Curr Microbiol Appl Sci* 4: 515-525.
15. Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, et al. (2011) Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceracorniculatum*. *Phytochemistry* 72: 1436-1442. [Crossref]
16. Doroghazi JR, Metcalf WW (2013) Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC genomics* 14: 611-624. [Crossref]
17. Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, et al. (2015) Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Ant van Leeuw* 108: 267-289. [Crossref]
18. Cuevas X (2005) A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *Ibugana* 13: 27-48.
19. Mata R, Calzada F, Navarrete A, Del Rio F, Delgado G (1991) Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol* 34: 147-154.
20. Oviedo-Chávez I, Ramírez-Apan T, Soto-Hernández M, Martínez-Vázquez M (2004) Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianiaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11: 436-445. [Crossref]
21. Makino M, Motegi T, Fujimoto Y (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry* 65: 891-896. [Crossref]
22. Shirling E, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Sys Bacteriol* 16: 313-340.
23. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402. [Crossref]
24. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. [Crossref]
25. Bozzola JJ, Russell LD (1992) Electron Microscopy, principles and techniques for biologists, 1st edn. Jones and Burtlett Publishers USA.
26. Ceapa C, Vázquez-Hernández M, Rodríguez-Luna SD, Cruz-Vázquez AP, Jiménez-Suárez V, et al. (2018) Genome mining of *Streptomyces scabrisporus* NF3 reveals symbiotic features including genes related to plant interactions. *PLoS One* 13: e0192618. [Crossref]
27. Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, et al. (2015) Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Ant van Leeuw* 108: 267-289. [Crossref]
28. Wu Y, Lu C, Qian X, Huang Y, Shen Y (2009) Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. *Curr Microb* 59: 475-482. [Crossref]
29. Janso JE, Carter GT (2010) Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl Environ Microbiol* 76: 4377-4386. [Crossref]
30. Ping X, Takahashi Y, Seino A, Iwai Y, Omura S (2004) *Streptomyces scabrisporus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:577-581. [Crossref]
31. Charousova I, Medo J, Halenárová E, Javorekova S (2017) Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *J Adv Pharm Technol Res* 8: 46-51. [Crossref]
32. Kudo F, Kawamura K, Uchino A, Miyayama A, Numakura M, et al. (2015) Genome mining of the hitachimycin biosynthetic gene cluster: Involvement of a phenylalanine-2,3-aminomutase in biosynthesis. *Chembiochem* 16: 909-914. [Crossref]
33. Vázquez-Hernández M, Ceapa CD, Rodríguez-Luna SD, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S (2017) Draft genome sequence of *Streptomyces scabrisporus* NF3, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Genome Announce* 5: 1-2. [Crossref]
34. Brodasky TF, Reusser F (1974) Steffimycin B, a new member of the steffimycin family: isolation and characterization. *J Antibiot* 27: 809-813. [Crossref]
35. Zhang C, Ondeyka JG, Zink DL, Basilio A, Vicente F, et al. (2009) Discovery of okilactomycin and congeners from *Streptomyces scabrisporus* by antisense differential sensitivity assay targeting ribosomal protein S4. *J Antibiot* 62: 55-61. [Crossref]
36. Manzoor A, Wani A, Qazi PH, Rehman S, Mushtaq S, et al. (2016) Isolation and characterization of alborixin from *Streptomyces scabrisporus*: A potent cytotoxic agent against human colon (HCT-116) cancer cells. *Chem Biol Interact* 256:198-208.
37. Intaraudom C, Bunbamrung N, Dramaee A, Danwisetkanjana K, Rachtawee P, et al (2015) Antimalarial and antimycobacterial agents from *Streptomyces* sp BCC27095. *Tetrahedron Lett* 56: 6875-6877.
38. Olano C, Abdelfattah MS, Gullón S, Brana AF, Rohr J, et al. (2008) Glycosylated derivatives of steffimycin: Insights into the role of the sugar moieties for the biological activity. *Chembiochem* 9: 624-633. [Crossref]
39. Wiley PF, Elrod DW, Slavicek JM, Marshall VP (1980) Microbial conversion of steffimycin and steffimycin B to 10-dihydrosteffimycin and 10-dihydrosteffimycin B. *J Antibiot* 33: 819-823. [Crossref]
40. Kelly RC, Schletter I, Koert JM, MacKellar FA, Wiley P (1977) Structures of steffimycin and steffimycin B. *J Org Chem* 42: 3591-3596.
41. Wiley PF, Elrod DW, Harper D (1987) Chemical modification of steffimycin B. *J Antibiot* 41: 343-351. [Crossref]
42. Gullón S, Olano G, Abdelfattah MS, Brana AF, Rohr J, et al (2006) Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster of the antitumor anthracycline steffimycin. *Appl Environ Microbiol* 72: 4172-4183. [Crossref]

Rodríguez-Peña K (2018) *Streptomyces scabrisporus*, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens* as producer of an anthracycline active against different cancer cell lines

43. Rabbani A, Finn RM, Ausió J (2004) The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays* 27: 50-56. [[Crossref](#)]
44. Reusser F (1974) Steffimycin B, a DNA binding agent. *Biochim Biophys Acta* 383: 266-273.
45. Sriram M, Liaw YC, Gao Y-G, Wang H-J (1991) Molecular structure of antitumor drug steffimycin and modeling of its binding to DNA. *J Biomol Struct Dyn* 9:251-269. [[Crossref](#)]

Copyright: ©2018 Rodríguez-Peña K. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

OTRAS PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO:

2018: Antimycobacterial activity of an anthracycline produced by an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. Trenado-Uribe M., Silva-Miranda M., Rivero-Cruz J., Rodríguez-Peña K., Espitia-Pinzón C., Rodríguez-Sanoja R. Sánchez S., Molecular Biology Reports <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4424-0>.

2017: El hábitat de los Microbios, en: El mundo de los Microbios, Karol Rodríguez-Peña, Ciencia, Vol. 8(2) Pag. 18-25.

2016: Endophytes as sources of antibiotics. Martinez-Klimova E., Rodríguez-Peña K., Sánchez S. Biochemical Pharmacology Vol.134 Pag.1-17.

2016: Draft Genome Sequence of an Endophytic Actinoplanes Species, Encoding Uncommon trans-Acyltransferase Polyketide Syntases. Centeno-Lejía S., Vinuesa P., Rodríguez-Peña K., Trenado-Uribe M., Cárdenas-Conejo Y., Serrano-Posada H., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. Genome Announcements Vol.4 Pag.1-2.

2016: Different approaches for searching new microbial antibiotics controlling bacterial growth, En: New Weapons to Control Bacterial Growth; Centeno-Lejía S, Guzmán-Trampe S, Rodríguez-Peña K, Trenado-Uribe M, Espinosa A y Bautista-Tovar D; Eds. Villa Tomas G, Vinas Miguel; Springer International Publish, Pags. 552.

2015: Endophytes as a potential source of new antibiotics, En: Antibiotics: Current Innovations and Future Trends; Silvia Guzman-Trampe, Karol Rodriguez-Peña, Allan Espinosa-Gomez, Rosa E Sánchez-Fernandez, Martha L Macias-Rubalcava, Luis B Flores-Cotera y Sergio Sánchez; Eds. Sergio Sánchez Esquivel y Arnold L. Demain; Caizer Academic Press, Pag. 175-204.